

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENİZ BİLİMLERİ VE İŞLETMECİLİĞİ ENSTİTÜSÜ

ALGLERİN SİTOSTATİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Yöneten
Prof.Dr. Selami GÖZENÇ

Hazırlayan
Biyolog V. Selma ÜNLÜ

İstanbul, 1993



ÖNSÖZ

Kansere karşı değişik kökenli ilaç hazırlanmasına ait, literatürde sayısız çalışma kayıtlıdır. Bu kaynaklar bitkisel ve hayvansal menşeli olup, bunun dışında yapay organik maddeler denenmiştir. Bugün daha ziyade, yapay organik maddeler üzerinde durulmaktadır. Bu organik maddelerin hazırlanmasının miktar açısından kolaylığı dolayısıyla, tedavi bu yöne kaymıştır. Yalnız bu maddelerin, istenmeyen birçok yan etkileri olduğu görülmüştür. Ayrıca etkileri de genelde olmayıp, kanser tiplerine göre farklılaşma göstermektedir. Denenen yüzbinlerce maddenin arasında, tedavide kullanılan yapay madde sayısı 50'yi geçmez. Bu sınırlı durum karşısında, doğal kaynaklı maddelere eğilim bugün fazladır. Bu yüzden hemen bütün dünyada bu sahaya yönelme görülmektedir.

Biz bu alanda, ülkemiz alglerinden bazılarını araştırma konusu yaptık.

Danışmanım Prof.Dr. Selami GÖZENÇ'e, yardımlarından dolayı Prof.Dr. Kasım Cemal GÜVEN'e ve İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'nde Uzm.Dr. Ferda KALEAĞASIOĞLU'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖNSÖZ.....	i
GİRİŞ.....	1
MATERYAL.....	22
METOD.....	24
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	54
ÖZET.....	56
İNGİLİZCE ÖZET.....	57
KAYNAKLAR.....	58

A- GİRİŞ

1. Genel Bilgiler

Kansere karşı ilaç olarak, ilk defa kara bitkilerinin denenmesi 2000 yıl öncesine dayanır. Bu arada algler de denenmiş ve 3000'den fazla bitki arasında yalnız 16 alg'e ait bilgiye rastlanmıştır [1]. Alglerin kansere karşı kullanılması, Eski Çin medeniyeti dönemine aittir.

Dünya literatüründe alglerin antitümör aktiviteleri üzerinde yapılan çalışmaları derleyen yazıda [2] 151 algden bazılarında aktivite bulunmuş, bir kısmında da aktivite bulunamamıştır.

1.1. Alglardan Antitümör Madde Elde Edilmesi Üzerine Çalışmalar

Türkiye algleri üzerinde bugüne kadar yapılan çalışmada, 3 alge ait farklı 6 ekstralarında kısmi aktivite bulunmuş [3] ve 3 alg ekstresinin Sephadex G-25 kolonundan geçirilmesiyle elde edilen fraksiyonlarda ise aktivite saptanamamıştır [4].

Yukarıda belirtilen çalışmalar [2,3] karşılaştırılınca, Türkiye'de mevcut 229 alg türü üzerinde bir çalışma yapılmadığı görülmüştür.

Alglerin antitümör etkilerine ait çalışmaların özetleri aşağıdadır.

1.1.1. Cyanophyta

Lyngbya gracilis'in kloroform ile yapılan ekstraksiyonu sonunda ele geçen ekstraktın, sıçanlarda P-388 Lymphocytic leukemia'da aktif olduğu ve (T/Cx100) sayısının 144-147 olduğu saptanmıştır. Bu ekstraktın florosil üzerinde yapılan kolon kromatografisinde, kloroform-metanol (9:1) karışımı ile yapılan elüsyonu sonunda toksik fraksiyon elde edilmiştir. Bunu takiben Sephadex LH-20 gel kromatografisinde kloroform ve metanol (1:1) karışımı ile yapılan elüsyonda, P-388 üzerinde aktif olan saf bir madde elde edilmiştir. Daha ileri bir saflaştırma işlemi silicagel kolonu üzerinde yapılmış ve sonuçta saf bir madde elde edilmiş ve

bu maddenin antitümör etkide debromoaplysiatoxin'in mono ve diasetat derivesi olduğu saptanmıştır [5,6].

Lyngbya majuscula, üzerinde yapılan çalışmada iki ayrı metod kullanılmış, organik solvan ile yapılan ekstraksiyonu takiben gel filtrasyonu ve iyon değiştirici reçine kromatografisi kullanılmıştır. İkinci metoddan etanol, butanol veya kloroform çözücü olarak kullanılmış ve bunu gel kromatografisi takip etmiştir. Bu ekstraktların, Ehrlich ascites tümörü ve lymphocytic leukemia üzerinde aktivite gösterdiği saptanmıştır [6]. Lyngbya converfoides, L.majuscula, Lyngbya.sp. üzerindeki çalışmada P-388 lymphocytic leukemia üzerinde aktivite bulunmuştur [7].

Oscillatoria nigroviridis üzerinde aynı şekilde yapılan çalışma ile, yukarıda belirtilen debromoaplysiatoxin elde edilmiştir. Bunun aktivitesi (T/Cx100) 122 olarak saptanmıştır Keza, O.annae, ve O.sp. ekstraktının P-388'e aktif olduğu tesbit edilmiştir [7]. Bir diğer çalışmada Oscillatoria sp. ekstraktının, P-388 üzerinde aktif olduğu bildirilmiştir [8].

Schizothrix calcicola'da da benzer aktiviteye rastlanmıştır. Bu gruba ait diğer algler [6,7] Symploca muscorum, Microcoleus tenerimus da da benzer aktivite bulunmuştur [6].

Entophysalis deusta, Anacystis dimidata, Tolypothrix conglutina ekstraktlarının P-388 lymphocytic leukemia'da aktivite gösterdiği bulunmuştur [7].

Phormidium sp. üzerindeki çalışmada P-388 lymphocytic leukemia'da aktivite bulunmuştur [8].

Oscillatoria nigroviridis'in lipofilik ekstraktı, diklorometan ile tüketimini takiben Sephadex LH-20 kolonundan diklorometan-2 propanol (1:1) karışımı ile elue edilmiştir. Bunu takiben, florosil ile yapılan kolon kromatografisi sonunda diklorometan ile elüsyondan acutiphycin ve 20,21-didehidroacutiphycin adı verilen maddeler elde edilmiş ve bu maddelerin sitotoksik olduğu ve antineoplastik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu denemeler KB ve NiH/3T₃ hücreleri üzerinde yapılmıştır [9].

Chlorella vulgaris'ten elde edilen glukoprotein antitümör etkisi P-388 üzerinde denenmiş ve aktif olduğu bulunmuştur. Bunun için sıcak su ile yapılan ekstraksiyon sonunda ele geçen ekstraktın, alçak baskıda uçurulması sonucu kalan bakiyenin Sephadex G-25 kolonuna uygulanması ile elde edilen glikoprotein P-388 tümörü taşıyan sıçanlara tatbiki sonucu, yaşam süresini %24 arttırdığı saptanmıştır [10]. Keza, *Chlorella vulgaris*'in sıcak su ekstraktının, Meth-A tümör hücreleri aşılmiş BALB/c sıçanlarına enjekte edilmesi sonucu bu sıçanların yaşam süresinin uzadığı saptanmıştır [11].

Diğer taraftan *Chlorella* sp.'nin *Spirulina* sp. *Scenedesmus* sp.'den elde edilen glukoprotein bileşiğinin, α -amilaz ile yapılan hidrolizi sonunda ele geçen mahsülün sıçanlarda, lymphocytic leukemia'da aktivite gösterdiği belirtilmiştir [12,13].

Caulerpa üzerindeki çalışmada *Caulerpa taxifolia*'nın, butanol-su ile hazırlanan ekstresinin P-388 lymphocytic leukemia'da, Ehrlich ascites tümörde aktivite gösterdiği saptanmıştır [14].

1.1.2. Chlorophyta

Enteromorpha acanthophora, *Cladophora delicatula*, *Caulerpa peltata* üzerinde yapılan çalışmada, toluen-metanol (1:3) karışımı ile soğukta yapılan ekstraksiyon sonunda santrifüje edilmiş ve üst kısmın içerdiği organik halojenli bileşiklerin sitotoksik aktivitesi olduğu araştırılmıştır. Bu ekstraktın (100,50,10) mcg/ml KB cell line denemesi sonunda, *E.acanthophora*'nın KB hücrelerinin gelişmesinin inhibisyonunun %100'den küçük, *C.delicatula* ve *C.peltata*'nın ise inhibisyonunun %200'den küçük olduğu saptanmıştır. Bu ekstraktların içerdiği organo halojen bileşiklerinin miktarı ise, *C.peltata*'da 8mcg/g, *C.delicatula*'da 3mcg/g olarak bulunmuştur [15].

Enteromorpha sp., *Codium vermiculare*., *Ulva* sp. sulu etanol (%30) ile 16 saat oda temperaturünde çalkalanmasından sonra, santrifüje edilmiş ve üst kısım alınmış, dialize edilmiştir (12 saat adi su ile ve 6 saatte distile su ile). Elde edilen dializi 41°C'den düşük temperaturde, alçak baskıda distillenmesi sonucu ele geçen ham ekstrenin, P-388 lymphocytic leukemia ve Ehrlich ascites carcinoma üzerindeki denemelerde P-388'de bir aktivite bulunmamış, buna karşı Ehrlich

ascites carcinoma'da 30 günden az yaşam sürecinin kontrole yakın bir değer gösterdiği, *Enteromorpha* sp.'de ise bir deneme yapılmadığı belirtilmiştir [16].

Caulerpa racemosa var. *peltata* (%30 etanol), *Halimeda* sp. (butanol ve hekzan), *Udotea geppii* (metilenklorid), *Tyemania expeditionis* %30 etanol ve kloroform ile yapılan ekstraksiyonu sonunda (soğukta 24 saat bekletme veya 4-5 saat karıştırma) yapılan santrifüj ile ele geçen üst kısım alçak baskıda uçurulmuş, elde edilen ham lipofilik ekstrakt kurutulmuş ve sonra su ile karıştırılmış, 4-5 saat sonra tekrar 24 saat veya daha fazla karıştırılıp, santrifüje edilmiş, üst kısmın liyofilizasyonunu takiben Sephadex G-25 üzerinde amonyum bikarbonat ile elue edilmiştir. Bunu takiben iyon değiştirici reçineden geçirilmiş sonra amonyum asetat ile elue edilmiştir. Eluatlar UV 288 nm'de okunmuştur. Diğer bir teknikte de, %30 etanol ile yukarıda yazıldığı gibi alçak baskıda distillenmiş, kuru bakiye kloroform ile karıştırılmış, yağda çözünen kısım distillenmiş, suda çözünen kısım yukarıda belirtildiği gibi gel ve iyon değiştirici reçineden geçirilip, temizlenmiştir. Bu ekstraktlar, P-388 lymphocytic leukemia'ya ve Ehrlich ascites sisteminde denenmiştir. Bunun sonunda; Ehrlich ascites tümörde *Caulerpa racemosa* ve *Udotea geppii*'de 100, *Tydemennia*'da sıfır aktivite saptanmıştır [7].

Anadyomene menziesii, *A.stellata*, *Caulerpa mexicana*, *C.prolifera*, *C.sertularioides*, *C.verticillata* üzerinde yapılan çalışmada önce bu algler kloroform ile bir karıştırıcıda karıştırılmış, sonra süzölmüş, bakiye kloroform ve su ile aynı şekilde tekrar ekstre edilmiştir. Ele geçen ekstraktlar alçak baskıda distillenmeyi takiben kurutulmuştur. Sulu ekstre liyofilize edilmiş, KB ve PS testlerine tabi tutulmuştur. Efektif doz, ED₅₀ (g ml⁻¹) değerleri *Anadyomene stellata* (balıklar için zehirdir.) sulu ekstraktının denenilen testlerde sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır [17].

Monostroma nitidum üzerindeki çalışmada alg, kaynar suyla 4 saat bekletilmiş ve ele geçen sulu kısım, liyofilize edilmiştir. Diğer teknikte sulu ekstre 2,3 gün diyalize edilmiş ve klorür testinin (-) olduğu saptandıktan sonra, diyalize olmayan kısım konsantre edilmiş ve sonra liyofilize edilmiştir. Antitümör aktivite testi, L-1210 hücreleri süspansiyonun sıçana entraparitoneal enjeksiyonu sonucu meydana gelen tümör üzerinde yapılmıştır. Antitümör aktivite tayini, yaşama süresi uzaması (ILS) (T-C)/cx100 üzerinden hesaplanmış ve ILS değeri %25'in üstü aktif olarak tesbit edilmiştir. *Monostroma nitidum* da ise, bu deney sonunda %24-26 sınır değeri elde edilmiştir [18].

Codium pugniformis üzerindeki çalışmada hazırlanan sulu ekstraktın dört misli alkol ilavesiyle çökeltilmiş ayrılan kısım CM Sephadex G-25 ve CPC] kolonunda fraksiyone edilmiş ve her iki kolondan elde edilen fraksiyonun Ehrlich ascites carcinoma ve solid tümöründe ve Sarcoma-180'de aktif olduğu saptanmıştır [19].

1.1.3. Phaeophyta

Sargassum polycystum %30'luk etanol ekstresinin lymphocytic leukemia'da aktif olduğu buna karşı, Ehrlich ascites tümörde aktivite göstermediği bildirilmiştir [7].

Dictyota johnstonii, *Zonaria farlowa*'nın toluen-metanol (1:3) ekstraktının KB hücrelerinde yapılan sitotoksikite testinde, aktif oldukları saptanmıştır [15]. *D.cranulata*'nın metilenklorid ve etilasetat ile ekstraksiyonu sonunda P-388 lymphocytic leukemia ve Ehrlich ascites tümöründe yapılan denemede, %135 aktivite bulunmuştur. Buna karşı *D.patens*, *D.friabilis*, *D.divariacata*, *D.acutiloba*'da ise aktivite bulunmamıştır [7].

Macrocystis pyrifera, %30'luk etanol ile yapılan ekstraksiyonu takiben, santrifüj sonunda ele geçen üst kısmın dializini takiben, 41°C'de alçak baskıda distillenmiş ve P-388 leukemia ile Ehrlich ascites carcinoma da yapılan denemede P-388 ve Ehrlich ascites tümörü üzerinde *Macrocystis pyrifera* aktivite gösterdiği bildirilmiştir [16].

Padina vichersiae, *Sargassum cymosum*, *Spatoglossum schroederi*, *Stytopodium zonale* 'nin KB ve PS tümörü testinde, toksik etki gösterdiği saptanmıştır [17].

Ecklonia cava kjellmanni, *Eisenia bicyclis*, *Hizikia fusiforme*, *Laminaria angustata*, *Laminaria japonica*, *L.japonica* var. *ochotensis* ekstraktlarının L-1210 leukemia testinde ILS değeri, (yaşam süresini arttırma değeri) sırasıyla en yüksek olarak 37, 27, 25, 29, 39 bulunmuştur. Bu değerler dikkate alındığı zaman %25 üst sınırının yakınında olduğunu dolayısıyla büyük bir aktivitenin saptanmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada *Hizikia fusiforme*, *Undaria pinnatifida* da ise bir aktivite saptanamamıştır [18].

Sargassum sp. üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Sargassum fulvellum, sıcak su ekstraktı alkol ile çöktürülmüş ve santrifüjle ayrılmış, alkol ile yıkanmış, alkollü kısım liyofilize edilmiştir. İlk alkolle çöktürmede ayrılan alkollü kısım alınmış ve alkol önce distillenmiş, sonra liyofilize edilmiştir. Bunun ile Sarcoma-180 üzerinde yapılan deneyde, antitümör aktivite saptanmıştır. Buna karşı ilk alkolle muamelede ayrılan alkollü kısmın liyofilizatı ise, aktivite göstermemiştir [20]. Bu maddenin yapısının, uronik asid içeren polisakkarid olduğu tespit edilmiştir. S.fulvellum üzerinde yapılan bir diğer çalışmada sıcak su ekstraktı, Sepharose 4B üzerinde gel kromatografisine tabi tutulmuş ve bunun Sarcoma-180 üzerinde aktif olduğu ve bu aktif maddenin sodyum alginat olduğu tespit edilmiştir [21,27].

Sargassum kjellmanianum sıcak su ekstraktının alçak baskıda uçurulması sonunda bakiye, Visking tüp'de dialize edilmiş ve bunun Sarcoma-180 üzerinde antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır [22].

S.kjellmanianumun sıcak su ekstraktının S-180 üzerinde aktif olduğu bildirilmiştir [23,24]. S.kjellmanianum'dan elde edilen L-fucose içeren polisakkarid fraksiyonu ve sülfat esterinin L-1210 üzerine aktif olduğu saptanmıştır [25].

S.thunbergii sıcak su ekstraktının filtratının santrifigasyondan sonra üstteki kısmı dialize edilmiş ve alkolle çöktürülmüş, elde edilen çökelti alkolle yıkanmıştır. Bunun kurutulmasından sonra ele geçen kısmın Ehrlich ascites tümörde aktif olduğu bulunmuştur. Bu aktif maddenin, sülfat grubu içeren alg polisakkaridi olduğu ve bunun içinde galaktoz, glukuronik asit, fruktoz, glukoz ve mannoz bulunduğu saptanmıştır [26].

S.hornerii'den elde edilen sülfat grubunca zengin polisakkaridin, Ehrlich ascites Sarcoma'da aktivite gösterdiği bildirilmiştir [28].

S.hornerii, S.hemiphyllum'dan hazırlanan sulu ekstratlar -dializ, gel-filtrasyonu sonunda fraksiyone edilmiştir. Ham protein içeren fraksiyon ve düşük moleküllü fraksiyon ayrılmıştır. Her bir fraksiyon, sıçanlarda hem deri altına hemde karın boşluğuna transplate edilmiş, Sarcoma-180 ve Ehrlich ascites carcinoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır [29].

S.tortile metanol ekstraktı üzerinde yapılan çalışmada, P-388 kültür hücreleri üzerinde büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır. Sephadex LH-20 ve Silicagel kolonu üzerindeki çalışmada dihydroxysargaquione ve sargatriol adlı iki madde izole edilmiştir [30].

S.tortile üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, metanollü ekstraksiyon bakiyesi; hekzan, karbontetraklorür ve kloroform ile önce partitüsyon fraksiyonlamasına tabi tutulmuş ve sonra Sephadex LH-20 ve Silicagel kolon kromatografisi ile chromenes grubundan sargaol, sargadiol, sargasal, sargasal I ve II, hydroxysargaquinone ve kjellmanianone adı verilen maddeler izole edilmiştir. Bunların arasında hydroxysargaquinone ve sargasal'ün P-388 lymphocytic leukemia'da aktivite gösterdiği saptanmıştır [31].

S.tortile'nin su ekstratının Sephadex G-50 kolonundan fraksiyonlanması ile ele geçen dört farksiyon kuruluşuna kadar uçurulmuş bakiye etanol ile muamele edilmiş ve bunun Ehrlich ascites carcinoma'da aktif olduğu saptanmıştır [32].

S.fulvillum ve *S.kjellmanium* dialize olmayan fraksiyonun Sarcoma-180 üzerine aktivite gösterdiği bildirilmiştir [33].

S.tortile ve *S.hemiphyllum* bazı fraksiyonlarının transplate edilmiş tümör üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. *S.fulvillum* sıcak su ile yapılan ekstraktın dializ olmayan kısmı uçurulmuş ve liyofilize edilmiştir. Sarcoma-180'de denemede, zayıf aktivite gösterdiği bildirilmiştir [34].

Laminaria angustata, *L.japonica*'nın *S.fulvillum*'da [33] üzerinde yapılan çalışmada *L.angustata*'nın yüksek, buna mukabil *S.fulvillum*'un düşük aktivite gösterdiği saptanmıştır. Buna karşın, *L.angustata*, *L.japonica*'nın L-1210 üzerinde aktif olduğu bildirilmiştir. *L.angustata*, *L.japonica*'dan elde edilen fucoidan ile L-1210 üzerinde yapılan çalışmada *L.angustata*'nın ILS değerinin %40, buna karşı *L.japonica* ve *L.japonica* var. *ochotensis*in %23-24 olduğu bildirilmiştir [35].

L.angustata'dan aseton, etanol, kloroform, kloroform-metanol, sıcak ve soğuk su ile hazırlanan ekstraktların mutagenitesi incelenmiştir. Sıcak ve soğuk su ekstratlarının dışındaki diğer ekstraktların aktif olduğu ve aktif maddenin tetrasiklik bir halka taşıdığı ve bunun tümör inhibisyonuna sebep olduğu bulunmuştur [36].

Eisenia bicyclis'ten elde edilen fucoidan'ın neoplazmia müdafa mekanizmasında yardımcı olduğu, retikuloendotelial sistemin fonksiyonunu arttırdığı, içerisinde doğal katil hücre aktivitesi, T hücreleri ile teşvik edilmiş hücrel immünite hususu teyid edilmiştir [35,37].

Colpomenia peregrina eterli ekstraktının iki fraksiyonu, HeLa testinde (human cervical carcinoma) aktif olduğu ve bunun birinci fraksiyonunun doymuş ve doymamış yağ asitleri içerdiği, buna karşı ikinci fraksiyonun fucoksantin sınıfı karotinoid taşıdığı bulunmuştur [38].

Spatoglossum schmittii, kloroform-metanol ekstraktında izole edilen diepoksit yapısındaki Spatol adlı maddenin Urchin egg assay ve T-244 melanoma, 224C Astrocytoma neoplastic cell lines'da aktivite gösterdiği saptanmıştır. Spatol, bir terpen yapısında olup (Seskitерpen) aromatik halkaya bağlı brom içerir [39].

Schizophyllum commune'den elde edilen suda çözünen polisakkarid'in, (Schizophyllan) sıçanlar üzerinde Sarcoma-180 ascites'li aktivite gösterdiği bildirilmiştir [40].

1.1.4. Rhodophyta

Gracilaria verrucosa, %30'luk etanol ekstraktı üzerinde yapılan çalışmada P-388 lymphocytic leukemia'da aktif olmadığı, Ehrlich ascites tümörde ise, denenen hayvanlarda farklı derecede antitümör aktivite saptanmıştır [16].

Gracilaria salicornia'nın %30'luk etanol ekstraktının P-388 lymphocytic leukemia'da zayıf aktivite gösterdiği, buna karşı Ehrlich ascites tümörde aktif olmadığı bildirilmiştir [7].

Bangia sp. %30'luk etanol ekstraktının P-388 lymphocytic leukemia, Ehrlich ascites tümöre aktif olduğu bildirilmiştir. *Cryptonemla cranulata* %30 etanol ekstraktını P-388'de zayıf bir aktivite gösterdiği, Ehrlich ascites tümörde ise bir etkisi olmadığı saptanmıştır [7].

Herposiphonia arcuata %30 etanol ekstraktı, denenen Ehrlich ascites tümörde aktivite göstermiştir. *Spyridia filamentosa*'nın metilen klorid ekstraktı, P-388 ve Ehrlich ascites tümörde aktivite göstermiştir [7].

Kırmızı alg polisakkaridlerinden Karageenan BALB/c sıçanlarına, mesane sarcoma virüsü inoküle edilmiş ve bu sıçanlar üzerinde 200mg/ml konsantrasyonunda karageenan verilmiş, tümör hücresi yaşam süresi üzerine belirli bir etki göstermediği saptanmıştır. Sonuç olarak karageenan'ın bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir [41].

1,2 Dimethylhydrazin kullanarak farelerde bağırsak kanserinin teşekkülünde degrade karageenan ilave edilerek ya da ilave edilmeden yapılan denemede, degrade karageenan'ın çoğalmayı değiştirdiği, degrade karageenan'ın dimethylhydrazin ile birlikte verilmesinde, glandüler sahada çoğalmayı arttırdığı, degrade karageenan'nın tek başına ise mukozomal epitelin üzerinde değişme meydana getirdiği tespit edilmiştir [42].

Diğer bir çalışmada degrade karageenan (asit ile hidrolize edilmiş) farelerde kolorektumda, kanser meydana getirdiği saptanmıştır. Karageenan tipleri üzerinde yapılan bir çalışmada, invitro deneylerde immün sistemi baskı altına aldığı ve tümör teşekkülünü arttırdığı saptanmıştır [43].

Degrade karageenan'ın kolorektumda squamous'lü hücre karsinomasını Adenokarsinomayı ve Adenomas'ı tahrik ettiği, buna göre degrade karageenan'ın farelerin kolorektumunda kanser meydana getirdiği tespit edilmiştir [44].

Bir diğer çalışmada, uzun süre ağız yolu ile degrade karageenan'ın verilmesi ile farelerde kolonda adenomatous polyp ve squamous metaplasia meydana getirdiği bildirilmiştir [45]. Doğal karageenan'ın deri altına enjeksiyonu ile, farelerde Sarcoma meydana getirdiği saptanmıştır [46]. Doğal karageenan'ın azotometan ve methylnitrosoure ile, kolo rektal kanseri meydana getirdiği bildirilmiştir [48].

Karageenan'ın makrofaja selektif sitotoksik etkisi, immünosüpresif etkisi hipotezinin doğru olmadığı bildirilmiştir [47].

Şili bitkilerinin antikanser çalışmasında denenen Chlorophyta (Ulva, Lactuca, U.nematoides), Phaeophyta (Myriogloia grandis, Desmarestia herbacea, Glossophora kunthii, Durvillea antarctica, Lessonia fuscescens, L.nigrescens, Macrocystis integrifolia, M.pyrifer), Rhodophyta (Porphyra columbina, Corallina chilensis, Chondrus canaliculatus, Gigartina chamissol, Gigartina papillosa, Iridea

boryana, *Gracilaria confervoides*, *G.foliifolia*, *G.lemanaeformis*, *G.verrucosa*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Rhodymenia corallina*, *Agardhiella tenera*, *Halopteris hordacea*'da bir aktivite saptanmamıştır [49].

2. Antitümör Madde Araştırması İçin Ekstraksiyon Yöntemleri

Amerikan Milli Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute, NCI) araştırma programı için istediği şartlar arasında; bitkinin adı, genus, species, otör adı, familyası, toplanan kısımları, toplandığı yer ve tarihi ve ekstraksiyon için kullanılan solvanın belirtilmesini istemektedir. NCI, ekstraksiyon tekniği için metanol–metilen klörüd ile (1:1) 12-18 saat oda temperaturünde bekletmeyi ve keza aynı şekilde %95 etanol ile çalışmayı önermektedir. Bunun dışında klasik yöntemi de dikkate alarak, soğuk suda ya da sıcak suda tutma gibi ekstraksiyon metodlarında önermektedir. Distilasyon için genel olarak alçak baskıda distilasyon uygulanmasını istemektedir [50].

Genel tekniklere bitkiden maddenin izolasyonu için ise, yukarıda yazılı teknikle elde edilen ham ekstrakta, değişik yöntemler (kolon kromatografisi, TLC, değişik solvanla tüketme gibi.) uygulanır.

3-Antitümör Ajanların Taranmasında Kullanılan Yöntemler

3.1. Artemia salina testi

Artemia salina testi, toksite tayininde kullanılan bir metottur. Bu Artemia salina'nın ölümüne dayanan bir biyolojik tayin metodudur. (Brine shrimp lethality bioassay). Bu metod; pestisid, mycotoxin, akarsu kirletenleri, anestezikler, dinoflagellat biotoksinleri, morfin benzeri bileşikler, yağ, di-n-alkil flatlar, cocarsinojenik forbol esterlerinin toksisitelerinin tayininde kullanılır. Ayrıca bu biyolojik tayin metodu, sitotoksik aktivite tayininde de kullanılmaktadır. Genel olarak sitotoksite tayininde kullanılan KB testi yanında 9PS testleri ile olan korelasyonu bildirmiştir [51].

Artemia salina testi ucuz ve kolay bir deney olup, tekrarlanması mümkündür. Deney, üç paralel tayinle yürütülür. 24 saat sonra canlı kalım ve her dozdaki ölüme kaydedilir. Deneyin yapılmasında Artemia salina yumurtaları (kuru şartta muhafaza edilirse yıllarca canlı kalabilir.) 22x32 cm'lik dörtgen suni deniz suyu ile doldurulmuş bir kap içine konur. Bu plastik kap, ikiye bölünür. Bölme 2 mm deliklere sahip plastik bir levha ile yapılır. Kabin bir bölümü karanlıkta, diğer bölümü ışıklandırılır. 30°C'lik sıcaklık tavsiye edilmektedir. 50 mg Artemia salina yumurtası, karanlık bölüme konur. Aydınlatılmış bölüm ise ışıklandırılır. 48 saat sonra, fototropi etkisi ile deliklerden aydınlık kısma geçen canlanmış yumurtalar pipetle alınır. Denemeye uygulanır. Deneme için, her 10 canlıya 5 ml suni deniz suyu ilave edilir. Kaplar ışıklandırılır. Belli konsantrasyonlarda madde ilavesinden sonra, canlı kalan sayısı bir pertavsızla sayılır. Sayım 6 ve 24 saatte bir yapılır. Ekseriya 24 saat uygulanır ve ölü sayısı Abbott formülü ile düzeltilir.

$$\text{Abbott formülü : \% Ölüm : } \frac{\text{Test - Kontrol}}{\text{Kontrol}} \times 100$$

3.2. In Vitro Deneyler

3.2.1.(HeLa)

İnsan dokusundan elde edilen ilk anöplöid, epitel-benzeri hücre soyudur. 1951 şubat'ında Grey ve arkadaşları tarafından, zenci bir kadının serviks kârsinomundan elde edilmiştir ve kadının isminin baş harflerini belirtmek üzere HeLa denmiştir [52].

3.2.2. KB cell line (NCI'nın kullandığı in vitro sistem)

Bu metod, KB hücre kültürünün (Nasopharynx human epidermoid carcinoma) denenecek etkili madde ortamında gelişmesinin durmasını tayine dayanır [52]. Bu gelişme durması, Lowry ve arkadaşlarının [53] protein miktarını tayin metodu ile takip edilir. Lowry metodu, proteine ait amino asitlerden fenol grubu içerenlerin Folin-Ciocalteu reaktifine [54] verdiği rengin ölçümü ile yapılır.

Oyama ve Eagle metoduna göre Earle çözeltisi ile hücre kültür yüzeyi yıkanır. Lowry çözeltisi (A- Na_2CO_3 , NaOH, B- CuSO_4 , Na K tartarat, C-Cu alkali çözeltisi, D-Karbonat bakır çözeltisi, E-Çözeltisi dilue Folin reaktifi'dir.) günlük hazırlanır. Kristal bovin albumini standart olarak kullanılır.

Deneyde [55] steril kabin kullanılır. Enkübyasyon, 37°C 'ye hassas $\pm 1^\circ\text{C}$ etüvde yapılır. Petri kutuları steril olup, uygun kapasiteye sahiptir. Petri kutularına veya özel denenecek kapa 1 ml medyum, 0.5 ml hücre çözeltisi (hücre sayıları denenecek kaba göre ayarlanır, her kuyuya 30.000 hücre hesap edilir.) konur. Denenecek madde çözeltisinin konsantrasyonu 1, 10, 20, 50 ve 100 μg olarak hesaplanır. Denenecek madde çözeltisi denenecek medyum ortamına, 0.2 μpor çapındaki milipor filtreden süzülerek, ilave edilir. Kontrol için serum fizyolojik %10'luk steril alkol çözeltisi ve 25mg/1ml flurourosil çözeltisi (uygun konsantrasyonda seyreltilmiş) 37°C 'de etüv içinde 3 gün 10 derece aç meyilli bekletilir. Protein analizi 3. günün sonunda yapılır. Petri kutusu, steril odadan alınır. Petri içindeki medyum dökülür. Dibe yapışmış hücreler, alkali bakır tartarat ile yıkanır. Petri ters çevrilir, kurumaya bırakılır. Üzerine Lowry çözeltisi ilave edilir. 10 dakika temasta bırakılır. Hafif sarsılır. Her bir kuyudan 100 μl alınır. Tüplere konur. Üzerine 100 μl folin reaktifi eklenir, çalkalanır. 37°C 'de 30 dakika etüvde bekletilir. Blankte aynı şekilde hazırlanır, 37°C 'de adsorbanslar

spektrofotometrede okunur. Evvelce hazırlanmış standart eğri ve buna ait denklemden, protein miktarı bulunur. Burada μg cinsinden protein hesaplanır. Hesapların yapılabilmesi için ayrıca Baseline (Bl) hesabı yapılır. Bunun esası, deney sonunda hücrelerin ne kadar ürediğini saptamaktır. En az üreme katsayısı 6 olmalıdır. 6'nın altındaki sayılar, değerlendirmeye alınmaz. Bunun hesaplanmasında ekim sayısına göre yapılır. Sonuçların değerlendirilmesinde (Student' T) Test uygulanır.

$$S^2 = \frac{\sum (x - x_1) + \sum (x - x_1)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t = \frac{S^2}{\frac{S^2}{n_1} + \frac{S^2}{n_2}}$$

Büyüme ve sağ kalımı belirlemek üzere kullanılan yöntemler, popülasyondaki canlı hücrelerin sayısı üzerine kurulmuştur.

Sitotoksositevi belirlemek üzere kullanılan yöntemler

1- Koloni oluşturma testi (Plating efficiency)

Hücreler, 50-60 mm'lik petri kutusuna ekilir. 7-10 gün sonra, fikse edilir ve Jenner-Giemsa ile boyanır. Koloniler sayılır.

Koloni sayısı

_____ %

Ekilen hücre sayısı

2- Hücrelerin sayılması

2.1- Hemasitometrede

2.2- Elektronik sayaçta

3-DNA miktarının ölçülmesi

3.1- İndol yöntemi

3.2- Difenilamin yöntemi

3.3- Timidin inkorporasyonu-otoradyografi

spektrofotometrede okunur. Evvelce hazırlanmış standart eğri ve buna ait denklemden, protein miktarı bulunur. Burada µg cinsinden protein hesaplanır. Hesapların yapılabilmesi için ayrıca Baseline (Bl) hesabı yapılır. Bunun esası, deney sonunda hücrelerin ne kadar ürediğini saptamaktır. En az üreme katsayısı 6 olmalıdır. 6'nın altındaki sayılar, değerlendirmeye alınmaz. Bunun hesaplanmasında ekim sayısına göre yapılır. Sonuçların değerlendirilmesinde (Student' T) Test uygulanır.

$$S^2 = \frac{\sum (x - x_1) + \sum (x - x_1)^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t = \frac{S^2}{\frac{S^2}{n_1} + \frac{S^2}{n_2}}$$

Büyüme ve sağ kalımı belirlemek üzere kullanılan yöntemler, popülasyondaki canlı hücrelerin sayısı üzerine kurulmuştur.

Sitotoksositevi belirlemek üzere kullanılan yöntemler

1- Koloni oluşturma testi (Plating efficiency)

Hücreler, 50-60 mm'lik petri kutusuna ekilir. 7-10 gün sonra, fikse edilir ve Jenner-Giemsa ile boyanır. Koloniler sayılır.

$$\frac{\text{Koloni sayısı}}{\text{Ekilen hücre sayısı}} \%$$

2- Hücrelerin sayılması

2.1- Hemasitometrede

2.2- Elektronik sayaçta

3-DNA miktarının ölçülmesi

3.1- İndol yöntemi

3.2- Difenilamin yöntemi

3.3- Timidin inkorporasyonu-otoradyografi

4- Protein miktarının ölçülmesi

4.1- Nessler reaktifi ile

4.2- Lowry yöntemi

4.3- Bromsülfaftalein

4.4- Lösin inkorporasyonu

5- Hücre canlılığının belirlenmesi

Tripan mavisi ile boyayı tutmama testi yapılır.

3.2.3.Allium testi

1-2 cm. uzunluğunda kökleri olan soğancıklar, yarıya bölünür. Bir yarı, araştırılacak maddenin eklendiği solüsyona, diğerleri ise musluk suyuna konur. 24 saat sonra, boyları yeniden ölçülür. Her iki grup karşılaştırılarak, inhibisyon oranı belirlenir. Deney 5 kez tekrarlanır.

3.2.4. Lepidium testi

Lepidium çekirdeklerinin köklerindeki büyüme izlenir. Burada Allium testinde belirtilen yöntem uygulanır [56].

3.2.5. Patates diski testi

Patates diski yöntemi güvenilir, basit, zaman kazandıran, ucuz bir yöntemdir. Yanlış pozitif cevaplar verebilirse de, yanlış negatif cevaplar az sayıda alınır. Sonuçlar, 3PS ile alınana çok yakındır [57].

4. Antitümör Ajanların Taranmasında Kullanılan İn Vivo Deneyler

4.1. Ehrlich Ascites Tümörü

İlk defa 1907'de Ehrlich tarafından uygulanmıştır. Bu neoplazmalardan biri spontan bir meme türü olan Ehrlich tümörüdür. 1932'de Löwenthal ve John bu hücreleri periton içine vererek, Ehrlich tümörünün asit tipini geliştirmişlerdir [58].

Epitelyal karakterini kaybetmiş farklılaşmamış bir tümördür. Cilt altına verilince solid nodüler şeklinde, periton içine verildiğinde asitten zengin tümör hücreleri şeklinde gelişir. Latent dönemi 4-6 gündür. İnokülasyon periton içine yayılırsa fareler 10-16 gün, cilt altına yapılırsa 16-20 gün yaşarlar.

Tümörün gelişmesini izlemenin en iyi yolu, hayvanların ağırlıklarını ölçmektir. Bileşiğin etkinliği üç şekilde değerlendirilebilir :

- a-Bileşiğin enjeksiyonundan sonra asit tümör hücrelerindeki sitolojik değişiklikleri inceleyerek,
- b-Sağ kalımdaki artışı ölçmek,
- c-Tedaviden sonra oluşan asit miktarını ölçmek.

Kanser hücrelerinin inokülasyonundan 7-10 gün sonra, verici bir fare seçilir. Anestezi uygulandıktan sonra 20 no.lu 5 ml'lik enjektörle 1-5 ml kadar sütü andıran veya kanlı asit sıvısından çekilir. Bir kısmı, serum fizyolojik ile 1:5 oranında sulandırılır. Hücreler hemasitometrede sayılır. Steril serum fizyolojik ile pH 7.2 olan uygun bir sulandırma yapılır ve 0.1 ml. (1-2 milyon kanser hücresi) sıvı, sağlıklı genç farelerin inguinal bölgesinden periton içine 27 no.lu 1/4'lük enjektörle verilir. Her enjeksiyondan önce iğnenin ucu alkollü pamukla silinerek, enjeksiyon yerinde solid tümörlerin oluşması önlenir.

Asit sıvısının enjeksiyonundan 24 saat sonra madde verilir (7 gün süreyle günde 1 kez). Asidin enjeksiyonundan 10 gün sonra, sıvı hacmi ölçülerek bileşiğin etkinliği değerlendirilir. Hayvanlar eterle öldürülür, tartılır. Aradaki fark sıvı hacmidir.

Değerlendirme:

- Etki yok (ileri derecede karın distansiyonu) 12 ml. asit.
- ± Hafif inhibisyon (orta derecede karın distansiyonu.) 8 ml. asit.
- + Orta derecede inhibisyon (hafif derecede karın distansiyonu.) 4 ml. asit.
- ++ İleri derecede inhibisyon (Karın distansiyonu yok.) 1 ml. asit.
- +++ Tam inhibisyon veya asidin yok olması.

4.2. Sarcoma-180 (S-180)

1914'te transplantabl bir meme karsinomundan elde edilmiş, farklılaşmamış bir tümördür. Spontan gerileme çok enderdir. Latent dönemi 4-5 gündür.

Erkek fareler tartılır. Kontrol grubu iki deneme gruplarından her biri beş fareden oluşur. S-180 Bulgaria suşundan 8 mm³'lük bir parça makasla küçük parçalara bölünür, serum fizyolojik içinde sırt derisinin altına şırınga edilir. Tümör implantasyonundan 24 saat sonra, 0.5 ml. serum fizyolojik içinde (kontrol grubuna ise sadece 0.5 ml serum fizyolojik verilir) bileşiğin her dozu periton içine uygulanır ve 5 gün süreyle bu işlem her gün tekrarlanır. Tedavinin bitmesinden 5 gün sonra tüm fareler öldürülür, tümörler çıkarılır ve tartılır. Ekstrenin verildiği gruptaki ortalama tümör ağırlığı, kontrol grubu ile oranlanır (T/K) [59]. Buna ait değerlendirme :

$T/K \geq 0.45$ bırak.

$T/K < 0.45$ devam et 1.basamak.

$T/K_1 \times (T/K)_2 \geq 0.2$ bırak.

$(T/K)_1 \times (T/K)_2 < 0.2$ devam et.

4.3. Walker Karsinomu-256

1928'de meme tümöründen elde edilmiş, transplantabl bir karsinomdur. Latent dönemi 2-10 gündür. Tümör hızla büyür ve (Wistar tipi) sıçanlar 2 hafta-2 ay içinde ölürler. İnfiltratiftir. Lenf düğümlerine ve daha çok akciğere metastaz yapar. Spontan gerileme çok nadirdir.

4.4. Bragg-Jackson Adenokarsinomu

1956'da spontan bir meme tümöründen elde edilmiş olup, C557 farelerinde üretilmiştir. Latent dönemi 7-10 gündür. Fareler 42- 45 gün içinde ölürlər, akciğere metastaz yapar.

4.5. NCI'nın Sectiği İn Vivo Modeller [60].

4.5.1.P-388 Leukemia : (3PS31-Intraperitoneally 3PS37-Intracranially P-388 Leukemia) Ön tarama için en duyarlı tümördür.

1955'te DBA/2 farelerinde, deriyi 3-metilkolantrenle boyayarak oluşturulmuştur. Deneyde her grup için 6 hayvan kullanılır. 0.1 ml.'de 1×10^6 hücre içeren asit sıvısı hazırlanır ve periton içine (her hayvana) 0.1 ml. uygulanır. Test ajanının uygulanmasına, tümör implantasyonundan 1 gün sonra başlanır. Her gün olmak üzere sentetik ajanlar için toplam beş doğal kaynaktan elde edilenler için toplam 9 enjeksiyon yapılır. Parametre ortalama yaşamda kalma süresidir.

Etkinlik Kriteri :

$T/C \geq \%130$ Orta derecede etkinlik (+) doğal kaynaklardan elde edilenler için.

$T/C \geq \%120$ Orta derecede etkinlik (+) sentetikler için.

$T/C \geq \%175$ Anlamlı etkinlik.

4.5.2.L-1210 Leukemia (3LE31/3LE21)-İntraperitoneally implanted L-1210 Leukemia) Yine ön taramada kullanılan duyarlı bir tümördür.

0.1 ml.'de 1×10^5 hücre içeren asit sıvısı periton içine verildikten 1 gün sonra, test maddesi verilmesine başlanır. Her gün olmak üzere toplam 9 enjeksiyon yapılır. Parametre ortalama yaşamda kalma süresidir. Sonuçlar kontrol grubunun yaşamda kalma süresinin yüzdesi olarak ifade edilir.

Etkinlik Kriteri :

$T/C \geq \%125$ Orta derecede etkin.

$T/C \geq \%150$ Anlamlı derecede etkin.

4.5.3.B-167 Melanoma (38131 İntraperitoneally implanted B₁₆₀ melanoma) Ön (birincil) taramada bir sonuç elde edilirse, ilacın in vivo antitümör özelliklerini saptayabilmek için kullanılır. Bu amaçla en sık kullanılan solid tümördür.

Birçok ilaç lösemi testlerinde aşağı yukarı aynı sonucu verirken, solid tümörlerde anlamlı farklar kaydedilmektedir.

1 gramlık tümör dokusu, soğuk serum fizyolojik ile 10 ml. 'ye tamamlanır. Böylece 1/10'luk tümör homojenatı hazırlanmış olur. Her deney grubu için 10 hayvan alınır. 1/10'luk homojenattan 0.5 ml. alınarak (her hayvan için) periton içine verilir. Kontrol grubunun yaşam süresi 15-22 gündür. Tümör implantasyonundan 1 gün sonra test ajanının uygulanmasına başlanır ve her gün olmak üzere toplam 9 enjeksiyon yapılır. Parametre ortalama yaşamda kalan yaşam süresidir. Sonuçlar, kontrol grubunun yaşam süresinin yüzdesi olarak ifade edilir.

Etkinlik Kriteri :

$T/C \geq \% 125$ Orta derecede etkinlik.

$T/C \geq \% 150$ Anlamlı derecede etkinlik.

4.5.4.Lewis Akciğer Karsinomis (3LL32-Subcutaneously implanted Lewis Lung Carcinoma veya 3LL39-Intravenously implanted Lewis Lung Carcinoma)

Tümör fragmenti s.c. olarak $B_6D_2F_1$ aksiliar regiona implante edilir. 1 gün sonra test maddesi her gün enjekte edilir. Total 9 enjeksiyon yapılır. Sağ kalım zamanı tayin edilir. Diğer testler; meme adenocarcinoma, human colon CX-1 adenocarcinoma, kolon 26 adenocarcinoma, ependymoblastoma insan akciğer LX-1'dir.

5.Kanser İle İlgili Bilgiler

Kanser hücresi, herhangi bir vücut dokusunda ve her yaşta oluşabilen bir şekildir. Tümör (neoplazm), dokuda hızla büyüyen ve değişikliğe yol açan anormal doku kütesidir. Neoplazmda hücreler aşırı ve durmaksızın çoğalırlar. Yetersiz derecede olgunlaştıkları için bu hücreler, anaplastik veya indifferansiye olarak tanımlanırlar. Bunlar değişik faktörlerle kimyasal, fiziksel ve virüs uyarılarından sonra ve genellikle uzun bir latent dönemi gösterebilirler. Neoplazmlar genişleyerek, çevredeki dokuda atrofi meydana getirirler. Bundan sonrada yerel basınç artması, tümör hücrelerin hareketliliği, hücre çeperlerinin kaybı, dokunun gelişmeyi kontrol altına alamaması ve litik maddelerin açığa çıkması sonucu metastaz ortaya çıkar. Burada direkt yayılma ile yerel dokulara geçme veya lenf ve kan damarları yolu ile tüm vücuda yayılma görülebilir. Kanser hücrelerinde normalde histopatolojik farklar görülür. Ayrıca metabolik farklarda mevcuttur. Kanser hücresinde nükleik asit yapı benzerliği vardır. Solunum enzimleri sitokromlar, sitokrom oksidaz gibi hayati proteinler kanser hücresinde azdır. İnsanda 270 tür neoplazm, histopatolojik olarak tanımlanmıştır. Bir tek tümör türündeki çeşitlilik, sonsuz olarak ifade edilir. Kanser diye adlandırılan hastalık, daha çok o kişideki kanser hücrelerinin devamlı değişen histolojik özelliklerini tamamlamasıdır. Bu nedenle, habis neoplazm olarak tanımlanan vaka sayısı kadar kanser türü vardır. Çabuk ölümden, spontan gerilemeye kadar değişiklikler gösterir. Tümör, selim veya habis olmak üzere iki gruba ayrılır. Bunlara ait değişik yerleşim yerine göre farklı adlandırmalar mevcuttur. Örneğin; epitelial tümör tiplerinden yüzey epiteline ait selim tümörün adı papillo, habis tümörün adı karsinom, bağ dokusu tümörüne ait fibröz dokudaki selim tümörün adı fibrom, habis tümörün adı fibrosarcom, sinirsel dokudaki glial selim tümörün adı meningioma, habis tümörün adı glioma gibi.

Kansere ait tanımlamalardan birisi de, displazi'dir. Displazi, hücre dokularının olağan düzgün organizasyonundaki bozukluk olarak tanımlanır. Birçok neoplazmın gelişme döneminin ilk evresidir. Neoplazm ise eksofitik papilloma iyi huylu tümör, papilloma ise envazif karakterli bir tümördür. Patolojik olarak kanser oluşumunda değişik kimyasal etkenlerin yanında hücre içi olaylara gelince,

- 1- Normal büyümeyi kontrol eden mekanizmanın sakatlanması.
- 2- Bölünme potansiyeli olan hücrelerden oluşan dokularda bilinmeyen nedene bağlı hastalık grubu.
- 3- Somatik hücrelerin eskiden normal iken habis hücreye dönüşümü.

- 4- Doku organizasyonu hastalığı.
- 5- Dokunun bir ana hücredeki rastgele gen mutasyonu ile başlatılan ve nedeni belli olmayan otoagresif hastalığı

Bugün bilinen husus, kanser için tek bir tanımlama yapılamamasıdır. Kanser hücreleri uzun zaman latent kalabilirler. Değişik uyarıların sonucu ise ortaya çıkabilirler. Selim gelişmeler, genişleme ve çevredeki dokularda atrofi ve çoğunlukla kapsülleşme ile olur. Kanseröz gelişmeler ise, envazyon ve metastaz için ilk adımdır.

Tedaviye gelince, tedavi üç şekilde yapılır.

- 1- Kemoterapi.
- 2- Radyoterapi.
- 3- Cerrahi.

Kemoterapi için, sitotoksik maddeler kullanılır. Bunun yanında değişik yan etkiler karşımıza çıkar. Kemoterapide tümör kitlesi küçükse, tedavi o kadar etkilidir. Vücudun herhangi bir yerinde tümör hücresi saptanabilmesi için en az 10^9 tümör hücresi gereklidir. Sitostatik maddeler, hücre siklusunun bir fazında bölünen hücreyi durdururlar veya öldürürler. Çoğalan hücreyi, istirahat halindekiinden fazla öldürürler. Çoğalan ve istirahat halindeki hücrelerin tümüne etki ederler. Kemoterapi sonunda tümör hücresindeki kitle sayısı 10^4 'e indirilebilir. Bu seviyede immünolojik mekanizmaların daha etkili olacağı kabul edilir. Kemoterapik maddelerin bağışıklığı önleyebileceği (immünosüpressif) bildirilmiştir.

Bugün tedavide kullanılan maddeler, sentetik ve doğal olarak iki ana gruba ayrılabilir. Doğal grup içinde alkaloidler (Vinka alkaloidleri), antibiyotikler (değişik mikroorganizmlerde elde edilen) ve deniz kaynaklı bu madde Cytosin, Arabinozid, Cryptothia crypta (sünger) 'den elde edilmiştir. Ayrıca sentez yolu ile de hazırlanır.

B-MATERYAL

1. Algler

Toplandığı Yer

Toplandığı Yıl

1.1. Chlorophyta

Ulvaceae

Ulva lactuca L.

Büyükada

1991

1.2. Phaeophyta

Cystoseiraceae

Cystoseira barbata J. Agard.

Büyükada

1991

1.3. Rhodophyta

Ceramiceae

Ceramium rubrum (Huds.) C. Ag.

Botaş

1992

Corallinaceae

Corallina mediterraneae Syn. Areschoug.

Antalya

1992

Grateloupiaceae

Grateloupia dichotoma J.A. Agardh.

Büyükada

1991

Phylloporaceae

Phyllopora nervosa (D.C) Grev.

Şile

1991

Rhodomenialeceae

Vidalia volubilis (L.). J. Agard.

İzmir

1992

2. İnce Tabaka Kromatografisi

Kromatografi tankları

3. Absorbanlar

3.1. Kieselgel 60 G (Merck)

3.2. Silicagel HF₂₅₄

4. Solvan Sistemleri

4.1. Butanol-asetik asit-su (30:10:10)

4.2. Metanol-metilenklorid (1:1)

4.3. Etanol (Tekel)

4.4. Petrol eteri (Delta Kimya)

4.5. Kloroform (Merck)

4.6. Eter (Merck)

5. Spotları Görünür Hale Getirme

5.1. Dragendorff reaktifi

5.2. U.V. Kabini

6. Aletler

6.1. Rota evaporatör (Buchi)

6.2. İnce tabaka film yayıcısı (Camag)

6.3. Etüv (Aymes)

6.4. Değirmen (Wiky)

6.5. Santrifuj (Hettich)

6.6. Silicagel (60-200 Mesh)

6.7. Sütun kromatografisi kolonu (Boy: 38 cm., Çap: 2 cm.)

6.8. Mekanik çalkalayıcı (VEM, Turm; Germany)

6.9. Distilasyon cihazları

C-METOD

1-Ekstraktın Hazırlanması

1.1. Suyla Yapılan Ekstraksiyon

Öğütülmüş 50g alg, 100 ml sıcak su ile ağzı kapaklı bir kapta 1 saat kadar su banyosu içinde arasıra çalkalanarak, bekletildi. Süzüldü. Üzerine 50 ml alkol kondu. Santrifüje edildi. Üst kısım alındı. Rota evaporatörde distillendi ve 4. te yazılı deneylere uygulandı.

1.2. Alkolle Yapılan Ekstraksiyon

1.2.1. Soğukta Yapılan Ekstraksiyon

Kurutulmuş öğütülmüş 50 g alg, %95'lik etanol ile 1 kg'lık geniş ağızlı, ağzı plastik kapaklı şişede 4 saat mekanik çalkalayıcıda çalkalandı. (hız 145 /dak.) Bu süre sonunda süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü alındı. Rota evaporatörde temperaturü 42°C olan su banyosunda alçak baskıda koyu kıvamlı bakiye kalana kadar distillendi.

1.2.2. Sıcakta Alkolle Yapılan Ekstraksiyon

50g kurutulmuş öğütülmüş alg üzerine 1 kg. etanol kondu ve geri çeviren soğutucuda su banyosu içinde 3 saat ısıtıldı. Süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü rota evaporatörde temperatur 42°C olan su banyosundan alçak baskıda distillendi.

1.2.3. Metanol-metilen klorid İle Yapılan Ekstraksiyon

Kurutulmuş, öğütülmüş 50 g alg metanol ve metilen klorid (1:1) ile 1 kg 'lık geniş ağızlı şişede 4 saat çalkalandı. Süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü rota evaporatörde temperatur 42°C olan su banyosundan alçak baskıda koyu kıvamlı bakiyekalana kadar distillendi.

2-Fraksivonlama

Elde edilen ekstraktlar, 2cm. apta cam kolonda 60-200 mesh partikül boyutuna sahip Silicagel içeren kolona uygulandı. Elüsyon için aşağıdaki solvan karışımları kullanıldı:

Petrol Eteri : Eter

90 / 10

80 / 20

70 / 30

60 / 40

50 / 50

40 / 60

30 / 70

20 / 80

10 / 90

Yukarıda yazılı teknikle elde edilen elüatların adi distilasyon ile solvanları distillendi, bakiyeler alındı. Bakiye üzerinde ince tabaka kromatografisi ve Artemia salina ve KB cell line testleri uygulandı.

3-İnce Tabaka Kromatografisi

30 g Silicagel tartıldı, üzerine 15 ml distile su kondu, karıştırıldı. İki, üç dakika şişmeye bırakıldı. Camag ince tabaka yayıcısı ile 3x10 ve 5x10 cm'lik cam plaklar üzerine absorban film yayıldı. Plaklar alındı. Etüvde 110°C'de 3 saat kurutuldu. Hazırlanmış olan bu plaklar üzerine sütün kromatografisinden elde edilen elüatların distilasyon bakiyeleri uygulandı ve butanol-asetikasit-su (3:1:1) solvanında sürüklenmeye tabi tutuldu. Bunun sonunda plaklar alındı. Açıkta veya sıcak hava püskürtücüsü ile adsorban filmin emdiğı solvandan kurtarıldı. Bunu takiben plaklar UV kabininde incelendi ve Dragendorff reaktifi püskürtüldü. Kromatogram üzerinde görülen lekelerin tespiti yapıldı ve R_f değerleri hesaplandı.

4-Sitostatik Etki Tayini

4.1.Artemia salina Testi

Metot kısmında belirtilen şekilde yapılan çalışma sonunda ele geçen ekstre veya fraksiyonlar üzerinde giriş kısmında yazılı uygulama ile aktivite tayini yapıldı. Bu uygulamaya ait özel durum aşağıdadır.

24 kuyulu plakaların her doz için toplam 3 kuyu olmak üzere her kuyuya 10 adet Artemia larvası ekildi. (10 larva/ml, % 0.0034 NaCl) Her kuyuya 1ml DMSO'de çözülmüş 10µl madde eklendi. 24 saat sonra hayatta kalan larva sayısı (sağ kalım) saptandı.

4.2.KB cell line

Buna ait çalışma tekniği giriş kısmında verilmiştir. Uygulamaya ait özel bilgi aşağıdadır.

Bu çalışma için gerekli malzemeler:

Doku hücre kültür şişeleri, petri kapları, pipetler (temizlenmiş ve steril edilmiş), steril filtrasyon enjektörü, steril membran filtre, KB hücreleri, steril saha ve medyum'dur.

Deneyin yapımı: Steril petri kutularına ölçülü medyum konur ve üzerine ölçülü KB hücresi eklenir. 24 saat sonra Dimetilsülfoksitte çözüldürülmüş aktivitesi denenecek ekstrakt veya ekstraktan elde edilen fraksiyonlar ölçülü miktarlarda (µg) (steril filtrasyondan geçirilmiş çözeltide) ekilir.

Kontrol için, etkin madde içermeyen yapılan aynı uygulamalar kullanılır.

D-BULGULAR

I-Ulva lactuca

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TCL Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Değişik Çözücü Ekstraktına Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R_f Değeri
Sıcak su	0.571
Soğuk alkol	0.75
Sıcak alkol	0.913

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.U.lactucanın soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktına ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1	0.926	5	0.937
2	0.846	6,9	0.875
3	0.807	7,8,10	0.892
4	0.939		

1.2.2.U.lactucanın sıcakta alkol ile hazırlanan ekstraktına ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1	0.962	5	0.925
2	0.955	6	0.978
3	0.918	7,8,9	0.956
4	0.940	10	0.939

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu:

Sağkalım : %90

Buna göre ekstraktta aktivite bulunamadı.

2.1.2.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu:

Sağkalım : %68.38

Buna göre ekstraktta aktivite bulunamadı.

2.2.Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 4. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,2,10,11	80-90
4,5,6,7,8,9	0
Kontrol	90

Buna göre 4-9 arası fraksiyonlarda aktivite bulunmuştur.

2.2.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 5'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 5. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,2,10,11	80-100
3	0
4	30
5,6,7	50-90
Kontrol	90

Buna göre Fraksiyon 3'te aktivite görülmüştür. Fraksiyon 4'te ise zayıf aktivite bulunmuştur.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10µl/ml	2µl/ml
4	0	0
5	0	0
6	0	49.1 ± 0.7
7	0	56.95 ± 5.3
8	0	51.6 ± 4.2
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 4 ve 5 10 μ l/ml ve 2 μ l/ml'de aktivite bulunmuştur. Fraksiyon 6, 7, 8 'de ise %48-60 arasında sağkalım görüldü.

2.3.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %	
	10 μ l/ml	2 μ l/ml
1	47.6 $\pm$ 0.7	99.5 $\pm$ 2.7
3	0	26.4 $\pm$ 5.1
4	0	33.9 $\pm$ 1.9
8	22.04 $\pm$ 2.2	89.9 $\pm$ 11.5
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 3 ve 4 10 μ l/ml'de aktivite bulundu. Fraksiyon 8'de %22 ve diğerlerinde %46-99.5 arasında sağkalım görülmüştür.

2.3.3.Fraksiyonlara ait Artemia salina testi ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 8.1 ve 8.2'de verilmiştir.

Tablo 8.1. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10 μ l/DMSO	Sağkalım %	
		10 μ l/ml	(KB cell line) 2 μ l/ml
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	49.1 $\pm$ 0.7
7	0	0	56.95 $\pm$ 5.3
8	0	0	51.6 $\pm$ 4.2
Kontrol	10	100	100

Tablo 8.2. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım % 10µl/ml	(KB cell line.) 2µl/ml
1	8.7 ± 0.6	47.6 ± 0.7	99.5 ± 2.7
3	0	0	26.4 ± 5.1
4	4.7 ± 2.9	0	33.9 ± 1.9
8	2.7 ± 0.6	22.04 ± 2.2	89.9 ± 11.5
Kontrol	10	100	100

Artemia salina ve KB cell line testlerine ait bulguların karşılaştırılmasıyla soğukta hazırlanan ekstraktta sonuçların tam bir uyum gösterdiği, sıcakta hazırlanan ekstraktta ise Fraksiyon 3 tam bir uyum, Fraksiyon 4'te küçük bir fark ile uyum elde edilmiştir.

II-Cystoseria barbata

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstraktta ait sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Değişik Çözücü Ekstraktına Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R _f Değeri
Sıcak su	0
Soğuk alkol	0.96
Sıcak alkol	0.95

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.C.barbata'mın soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,2	0.869	6	0.912
3	0.934	7,10	0.984
4	0.978	8,9	0.976
5	0.913		

1.2.2.C.barbata'nın sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,2	0.979	6	0.999
3	1	7,8,9	0.912
4,5	0.96	10	0.98

2-Sitostatik aktivite sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %90

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamadı.

2.1.2. Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %100

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamamıştır.

2.1.3. Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %70

Buna göre ekstrakta zayıf aktivite bulundu.

2.2. Alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 12'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 12. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,6,7,8	10-20
2	30
3	20-40
4,5	0
9	50
Kontrol	100

Buna göre Fraksiyon 4 ve 5 aktiftir. Diğerlerinde zayıf aktivite görülmüştür. Fraksiyon 10 ise aktivite göstermemiştir.

2.2.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 13'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 13. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
2,4	0
Kontrol	100

Buna göre Fraksiyon 2 ve 4'te aktivite bulunmuştur.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1. Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 14. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %	
	10µl/ml	2µl/ml
1	0	45.67 ± 2.7
2	0	92.5 ± 2.25
3	0	4.77 ± 3.1
4	0	52.1 ± 2.52
5	0	90 ± 4.4
6	0	18.8 ± 2.7
7	0	9.1 ± 6.6
8	0	57.3 ± 15.1
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 1-8'de aktivite bulunmuştur.

2.3.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %	
	10µl/ml	2µl/ml
2	0	0
4	0	42.1 ± 12.9
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 2-4'de aktivite bulunmuştur.

2.3.3.Fraksiyonlara ait Artemia salina testi ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 16.1 ve 16.2'de verilmiştir.

Tablo 16.1. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım %	
		10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
1	2 ± 1	0	45.67 ± 2.7
2	3	0	92.5 ± 2.25
3	2.7 ± 1.2	0	4.77 ± 3.1
4	0.3 ± 0.6	0	52.1 ± 2.52
5	0	0	90 ± 4.4
6	1.3 ± 0.6	0	18.8 ± 2.7
7	1.7 ± 0.6	0	9.1 ± 6.6
8	3 ± 2.6	0	57.3 ± 15.1
Kontrol	10	100	100

Buna göre Fraksiyon 5 tam uyum, Fraksiyon 1-4 ve 6-8 arası fraksiyonlarda kısmi uyum görülmüştür.

Tablo 16.2. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım % 10µl/ml	2µl/ml
2	0	0	0
4	0	0	42.1 ± 12.9
Kontrol	10	100	100

Buna göre Fraksiyon 2 ve 4 arasında her iki test sonuçları tam uyum göstermiştir. Fraksiyon 1,3,5,6,7,8 inaktif olduğu için listeye alınmamıştır.

III-Ceranium rubrum

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 17. Değişik Çözücü İle Hazırlanan Ekstrakta Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R _f Değeri
Sıcak su	0
Soğuk alkol	0.96

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.C.rubrum'un sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 18'de verilmiştir.

Tablo 18. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1	0.935	5	0.972
2	0	6,7	0.961
3,4	0.926	8,9,10	0

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %100

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamadı.

2.1.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %100

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamadı.

2.2.Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 19.1 ve 19.2'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 19.1. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
3	0
1,4,5,6,7,8,9	60-100
Kontrol	100

Buna göre Fraksiyon 3 aktivite göstermiştir.

Tablo 19.2. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO
1	8.3 ± 2.1
2	7.7 ± 3.2
3	0
4	8.3 ± 1.5
5	9 ± 1
6	7.7 ± 1.2
7	8 ± 1
8	8.3 ± 0.6
9	9 ± 1
10	9.3 ± 1.2

IV-Corallina mediterraneae

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. Değişik Çözücü İle Hazırlanan Ekstrakta Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R _f Değeri
Sıcak su	0
Soğuk alkol	0.98

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.C.mediterraneae'nın soğuk alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri
1,5,7,8	0.95
2	0.90
3,4	0.93
6,9,10	0.97

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %82

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamadı.

2.1.2.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %70

Buna göre ekstrakta aktivite bulunamadı.

2.2.Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 22'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 22. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
2	20-50
4	20-40
1,3,5,6,7,8,9,10	80-100
Kontrol	100

Buna göre Fraksiyon 2 ve 4'te zayıf aktivite bulunmuştur.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 23'te verilmiştir.

Tablo 23. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10µl/ml	2µl/ml
3	0	17.23 ± 1.6
4	0	44 ± 0.8
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 3 ve 4 aktivite göstermiştir.

2.3.2.Fraksiyonlara ait Artemia salina ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina Testi ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım% 10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
3	3.7 ± 1.5	0	17.23 ± 1.6
4	3 ± 1	0	44 ± 0.8
Kontrol	10	100	100

Buna göre Artemia salina ve KB cell line testi ile elde edilen fraksiyonlara ait sonuçlar arasında bir uyum görülmemiştir. Artemia salina testinde aktivite göstermeyen fraksiyonlar KB cell line testine alınmamıştır.

V-Grateloupia dichotoma

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1. Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 25'de verilmiştir.

Tablo 25. Değişik Çözücü Ekstraktına Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R _f Değeri
Sıcak su	0.81
Soğuk alkol	0.93
Sıcak alkol	0.94

1.2. Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar.

1.2.1. G.dichotoman'ın soğuk alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 26'da verilmiştir.

Tablo 26. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1	0.54	5,6	0
2,10	0.98	7	0.95
3	0.90	9	0.99
4,8	0.93		

1.2.2.G.dichotoma'nın sıcakta alkol ile hazırlanan ekstraktına ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,5	0.90	4	0.81
2,10	0	6	0.97
3	0.93	7,8,9	0.94

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %100

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.1.2.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %0

Buna göre ekstrakt aktiftir.

2.1.3. Sıcak alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %0

Buna göre ekstrakt aktiftir.

2.2. Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1. Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 28'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 28. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
6	20-40
7	0
1,2,3,4,5,8,9,10	100
Kontrol	80-90

Buna göre Fraksiyon 7 aktif bulunmuştur.

2.2.2. Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 29'da verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 29. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
5	0
1,2,3,4,6,7,8,9,10	100
Kontrol	80-90

Buna göre Fraksiyon 5 aktif bulunmuştur.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10 μ l/ml	2 μ l/ml
5	0	61.89 $\pm$ 5.98
6	0	79.19 $\pm$ 7.34
7	0	88.59 $\pm$ 0.75
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 5, 6, 7 aktif bulunmuştur.

2.3.2.Fraksiyonlara ait Artemia salina ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina Testi ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10 μ l/DMSO	Sağkalım % 10 μ l/ml	(KB cell line) 2 μ l/ml
4	3 $\pm$ 1	31.68 $\pm$ 9.1	79.5 $\pm$ 8.9
5	4.3 $\pm$ 1.2	0	61.89 $\pm$ 5.98
6	3 $\pm$ 1	0	79.19 $\pm$ 7.34
7	0	0	88.59 $\pm$ 0.75
Kontrol	10	100	100

Buna göre Fraksiyon 7'de tam uyum ve Fraksiyon 5 ve 6'da zayıf bir uyum görülmüştür. Artemia salina testinde aktif olan fraksiyonlar KB cell line testine alınmıştır.

V-*Phyllophora nervosa*

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 32'de verilmiştir.

Tablo 32. Değişik Çözücü Ekstraktına Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R_f Değeri
Sıcak su	0.909
Soğuk alkol	0.961
Sıcak alkol	0.833

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.P.nervosa'nın soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 33'de verilmiştir.

Tablo 33. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,5,6	0	7,8,9	0.972
2,4	0.952	10	0.930
3	0.961		

1.2.2.P.nervosa'nın sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 34'de verilmiştir.

Tablo 34. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,2	0.99	7	0.966
3,6	0.952	8,9	0.937
4	0.942	10	0.938
5	0		

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina Testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %90

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.1.2.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %70

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.1.3.Sıcak alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %58

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.2.Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 35'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 35. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,2,5,8,9,10,11	90-100
4	10-20
6	30-40

Buna göre Fraksiyon 4'te zayıf aktivite görülmüştür.

2.2.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 36'da verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 36. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,2,3,4,6,7,8,9,10	100
5	10-20

Buna göre Fraksiyon 5'te zayıf aktivite görülmüştür.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1.Soğukta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 37'de verilmiştir.

Tablo 37. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10µl/ml	2µl/ml
3	0	1.22 ± 0.1
4	0	0.4 ± 0.2
6	0	0.8 ± 0.4
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 3,4,6 aktivite göstermiştir.

2.3.2.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 38'de verilmiştir.

Tablo 38. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
4	0	0.39 ± 1.4
5	0	1.21
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 4 ve 5 aktivite göstermiştir.

2.3.3.Fraksiyonlara ait Artemia salina ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 39.1 ve 39.2'de verilmiştir.

Tablo 39.1. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina Testi ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım % 10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
3	5.3 ± 0.6	0	1.22 ± 0.1
4	1.7 ± 0.6	0	0.4 ± 0.2
6	3.7 ± 0.6	0	0.8 ± 0.4

Buna göre KB cell line'da aktivite gösteren fraksiyon 3 ve 6 Artemia salina testine uyum göstermemiş fakat Fraksiyon 4 ise uyum göstermiştir.Artemia salina testinde aktif olmayanlar KB cell line testine alınmamıştır.

Tablo 39.2. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina Testi ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım % 10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
4	6 ± 1	0	0.39 ± 1.4
5	1.7 ± 0.6	0	1.21
Kontrol	10	100	100

Buna göre Artemia salina testi Fraksiyon 5'te KB cell line'a uyum göstermiş fakat Fraksiyon 4 uyum göstermemiştir.Artemia salina testinde aktif olmayanlar KB cell line testine alınmamıştır.

VII-Vidalia volubilis

Metod kısmında belirtilen tekniklerle yapılan çalışmalara ait sonuçlar aşağıdadır.

1-TLC Sonuçları

1.1.Değişik çözücü ile hazırlanan ekstrakta ait sonuçlar Tablo 40'da verilmiştir.

Tablo 40. Değişik Çözücü Ekstraktına Ait R_f Değerleri.

Ekstrakt	R _f Değeri
Sıcak su	0
Soğuk alkol	0.950
Sıcak alkol	0.980

1.2.Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

1.2.1.V.volubilisın soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktına ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 41'de verilmiştir.

Tablo 41. Soğukta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,2,6	0.958	7	0.980
3,5	0.979	8	0.976
4	0.937	9,10	0.990

1.2.2.V.volubilisın sıcakta alkol ile hazırlanan ekstraktına ait fraksiyonların R_f değerleri Tablo 42'de verilmiştir.

Tablo 42. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların R_f Değerleri.

Fraksiyon	R_f Değeri	Fraksiyon	R_f Değeri
1,8	1	5	0.982
2	0.931	6	0.994
3	0.954	7,10	0.973
4	0.977	9	0

2-Sitostatik Aktivite Sonuçları

2.1.Artemia salina testi

2.1.1.Sıcak su ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalm : %90

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.1.2. Soğukta alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %100

Buna göre ekstrakt aktif değildir.

2.1.3. Sıcak alkol ile hazırlanan ekstraktın Artemia salina testi sonucu

Sağkalım : %70

Buna göre ekstrede aktivite bulunamadı.

2.2. Alkol İle Hazırlanan Ekstraktların Fraksiyonlarına Ait Sonuçlar

2.2.1. Soğukta alkol ekstraktına ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 43'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 43. Soğuk Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	100
Kontrol	90

Buna göre denenen bütün fraksiyonlar inaktif bulunmuştur.

2.2.2. Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların Artemia salina testi sonuçları Tablo 44'de verilmiştir. Sonuçlar üç deney ortalamasıdır.

Tablo 44. Sıcak Alkol Ekstraktına Ait Fraksiyonların Artemia salina Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım %
3	0
4	10-30
1,2,5,6,7,8,9,10	100
Kontrol	100

Buna göre Fraksiyon 3 aktif, Fraksiyon 4'te ise zayıf bir aktivite görülmüştür.

2.3.KB cell line Testi Sonuçları

2.3.1.Sıcakta alkol ile hazırlanan ekstrakta ait fraksiyonların KB cell line testi sonuçları Tablo 45'de verilmiştir.

Tablo 45. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstrakta Ait Fraksiyonların KB cell line Testi Sonuçları.

Fraksiyon	Sağkalım % 10µl/ml	2µl/ml
3	0	28.4 ± 1.9
6	0	107.1
Kontrol	100	100

Buna göre Fraksiyon 3 ve 6 aktivite göstermiştir.

2.3.2.Fraksiyonlara ait Artemia salina ve KB cell line testi sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 46'da verilmiştir.

Tablo 46. Sıcakta Alkol İle Hazırlanan Ekstraktın Artemia salina Testi ve KB cell line Testi Sonuçlarının Karşılaştırması.

Fraksiyon	Artemia salina 10µl/DMSO	Sağkalım % 10µl/ml	(KB cell line) 2µl/ml
3	0	0	28.4 ± 1.9
6	2.3	0	107.1
Kontrol	10	100	100

Buna göre Fraksiyon 3'te uyum görülmüştür. Artemia salina testinde aktif olmayanlar KB cell line testine alınmamıştır.

E-TARTIŞMA ve SONUÇ

Algler üzerinde antitümör aktivite çalışmaları ilk defa sıcakta su ile hazırlanan ekstrenin Çin'de kullanılması ile başlanmıştır [1]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda su, etanol, kloroform-metanol, diklorometan, diklorometan-2 propanol, toluen-metanol, kloroform, aseton solvanları kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Direkt bu ekstraktlar veya Sephadex LH-20, CM Sephadex G-25 ve CPC], Sepharose 4B, Sephadex G-50 kolonlarından geçirilerek elde edilen elüatlar üzerinde çalışılmıştır. Antitümör testi için ise P-388 Lymphocytic leukemia, Meth-A tümör hücreleri aşılınmış BALB/c sıçanları, Ehrlich ascites tümör, KB cell line ve PS test, L-1210, Sarcoma-180, Urchin egg assay, T-244 melonoma, HeLa, KB testleri uygulanmıştır.

Bu çalışmada ekstraksiyon için özellikle NCI'nın verdiği teknik uygulanmıştır. Bu teknik soğuk ve sıcak su ile yapılan ekstraksiyon, etanol ekstraksiyonu, metanol-metilen klorid ekstraksiyonudur. Çalışmalar bütünüyle NCI'nın önerdiği yönteme göre yapılmıştır. Bu açıdan bundan evvel yapılan çalışmalar ile farklılık gösterir. Fraksiyonlama için ise Silicagel kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan testler bundan evvel yapılan çalışmalardan farklı olarak, ilk defa bu denemede kullanılan *Artemia salina* testi [51] ve bir çalışmada kullanılan [3] ve sadece Amerika'da yapılan KB cell line testi bu çalışmada Türkiye'de uygulanmıştır. Ayrıca bu test sonuçlarının birbiri ile olan korelasyonunda hesaplanmıştır. Bundan önceki çalışmada belirtilen *Artemia salina* ve KB cell line arasındaki paralellik bu çalışmada bazı sonuçlarda görülmüş. Buna karşı bazılarında ise bir beraberlik bulunamamıştır.

Denenen algler ise 1 yeşil, 1 kahverengi, 5 kırmızı alge aittir.

Denenen algler arasındaki mukayeseye gelince yeşil alglerden bu çalışmada ele alınan *Ulva lactuca* [2] ilk denemelerdir. Kahverengi alglerden *Cystoseira barbata* daha önce denenmiş [2] bir aktivite bulunamamıştı. Fakat bu çalışmada ele alınan her iki testte de aktivite bulunmuştur. Kırmızı alglerden ele alınan *Phyllophora nervosa*'da daha evvelce bir aktivite görülmemesine karşı bu çalışmada ele alınan şekil içersinde her iki testte de aktivite bulunmuştur. Daha evvelce ele alınan *Corallina chilensis* [2] bir aktivite görülmemesine karşı bu çalışmada ele alınan *Corallina mediterraneae* 'de aktivite bulunmuştur. Ayrıca daha önce ele

alınmayan *Grateloupia dichotoma*, *Ceramium rubrum*, *Vidalia volubilis*'te bu çalışmada aktivite tespit edilmiştir.

Böylece ele alınan alglerin hemen bütününde evvelki çalışmalardaki gibi aktivite tespiti yapılmış bütün bunların yanında fraksiyonlama ile aktif maddenin hangi fraksiyona geçtiği saptanmıştır. Çalışmanın bir özelliğide denemelerin tek bir antitümör testine tabi tutulmayıp paralel iki teste tabi tutulmasıdır.

Sonuç olarak bu çalışma bu sahada yapılan diğer çalışmalardan büyük farklılıklar göstermektedir. Bundan sonraki işlem aktif olan maddenin saptanmasına kalmaktadır.

ÖZET

Alglerin antitümör etkisi üzerinde Çin medeniyetinden beri çalışma yapılmıştır. Bu gaye ile değişik alglerden hazırlanan ekstrelerin antitümör etkileri aranmıştır. Ekstraksiyon için değişik solvanlar kullanılmıştır. Bu çalışmada ise NCI'nın önerdiği metod kullanılmıştır. Solvan olarak alkol, su, metanol, metilen klorid karışımı kullanılmıştır. Antitümör metod olarak literatürde kayıtlılardan farklı *Artemia salina* ve KB cell line testleri kullanılmıştır. Ayrıca bu iki test arasındaki bağıntı tespitinede çalışılmıştır. Diğer taraftan ekstreler silicagel kolonunda fraksiyone edilmiş, fraksiyonların antitümör etkileride araştırılmıştır. Bunun sonunda ele alınan alglerde daha önceki çalışmalarda antitümör etki saptanmayan *Cystoseira barbata* ve *Phyllophora nervosa* ve daha önce ele alınmayan *Ulva lactuca*, *Corallina mediterranea*, *Grateloupia dichotoma* ve *Vidalia volubilis*, *Ceramium rubrum* üzerinde denenen her iki testte sitostatik aktivite tespit edilmiştir.

SUMMARY

Antitumor activity of marine algae has been investigated since Chinese civilization. Different solvents have been used for the preparation of the algae extracts. In this work the method proposed by NCI was used. Water ethanol and methanol-methylene chloride were used as solvent. The antitumor assay used in this investigation using *Artemia salina* and KB cell line tests differed from earlier studies. The two tests were correlated. Meanwhile the extract was fractionated on silicagel column and their antitumor activity was also assayed. Unlike the earlier finding *Cystoseira barbata* and *Phyllophora nervosa* showed cytotoxic activity. The antitumoractivity by *Ulva lactuca*, *Corallina mediterraneae*, *Grateloupia dichotoma*, *Vidalia volubilis* and *Ceramium rubrum* was observed first time in this investigation.

KAYNAKLAR

- [1] Hartwell, L.J. :Plants Used Against Cancer Quartman Publication, Inc. Lawrence Massachusetts (1982)
- [2] Güven, K.C., Güvener, B., Güler, E.: In Introduction to Applied Phycology. (Ed.I.Akatsuka) pp.67-92
- [3] Güven, K.C.:Personal Communication 30 May 1972
- [4] Güven, K.C., Bergişadi, N.:Acta Pharm.Turc. 27.61 (1985)
- [5] Güven, K.C., Zeybek, N., Çirik, Ş.:İ.Ü. Deniz Bilimleri ve Coğrafya Bülteni 7.51 (1991)
- [6] Mynderse, J.S., Moore, R.E., Kashiwagi, M.:Science, 196.538 (1977)
- [7] Kashiwagi, M., F.S. Mynderse., Moore, R.E., Norton, T.R.: J. Pham. Sci. 69.735 (1980)
- [8] Moore, R.E. : Pure Appl. Chem. 54.1919 (1982)
- [9] Bachi, F.F., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. : J. Am. Chem. Soc. 106.8197 (1984)
- [10] Chlorella Industry Co. Ltd. Jpn. Kokai Tokkyo Koho,81. 18, 923; C.A : 94.180665 (1981)
- [11] Konishi, F., Tanaka, K., Himeno, K., Taniuchi, K., Nomoto, K. : Cancer Limmunol İmmuno Ther. 19.73 (1985)
- [12] Shinho, K. :Jpn. Kokai Tokkyo Koho Jp 6169, 728 C.A:105. 30034 (1986)
- [13] Shinho, K.: Eur.Pat.Apl. EP. 209.078 C.A : 106 118166 (1987)
- [14] Patterson, G. M. L., Norton, T.R., Fususawa, E.,Fursawa, S., Kashiwagi, M., Moore, R.E. Bot. Mar. 17.485 (1984).
- [15] Nemanich, J. W., Theiler, R.F., Hagen, L. P.: Int. Sym. on Drugs Food from the Oceans, Normon, OK. (U.S.A), (Ed. P.N. Koul, Ct. Sindesman), Sept.1977. p.123-136
- [16] Mayer, A. M. S., Panick, B.: Hydrobiologia 116/117. 529 (1984)
- [17] Hodgson, L. M.: Bot. Mar. 27.387 (1984)
- [18] Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., Maruyama, H.: Bot. Mar.25.455 (1982)

- [19] Nakazawa, S., Abe, F., Kuroda, N., Kohno, K., Higashi, T.: Chemotherapy. 24.448 (1976)
- [20] Yamamoto, I., Nagumo, T., Fujihara, M., Takahashi, M., Ando, Y., Okada, M., Kawai, K.: Japan. J. Exp. Med. 47.133 (1977).
- [21] Fujihara, M., Iijima, N., Yamamoto, I., Nagumo, T.: Carbohydrate Research. 125.97 (1984)
- [22] Yamamoto, I., Nagumo, T., Takahashi, M., Fujihara, M., Suzuki, Y., Iizima, N., Japan. J. Exp. Med. 51.187 (1981)
- [23] Liang, Y.J., Lin, Z. K.: J. Mar. Drugs. 5.17. (1986): ASFA 18.7637 (1988)
- [24] Mizui, I.N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I., Nagumo, T.: Arch. Exp. Med. 58.59 (1985)
- [25] Yamamoto, I., Takahashi, M., Takahashi, S., Hafime, S.: Japan. J. Exp. Med. 54.143 (1984)
- [26] Ito, H., Sugiura, M.: Chem. Pharm. 24.1114 (1976)
- [27] Yamamoto, I.T., Nagumo, T., Yagi, K., Tominago, H., Aoki, M.: Jap. J. Exp. Med. 44.543 (1974)
- [28] Nakazawa, S., Kuroda, H., Abe, T.: 33th Annual Meeting of Japan Cancer Ass., Sendai., Oct., 1974. p.103; Lit 27^e göre.
- [29] Nakazawa, S., Kuroda, H., Abe, T., Nishino, T., Ohtsuki, M.: Chemotherapy. 22.1435 (1974)
- [30] Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Fujita, E., Nabeshima, Y.: Chem. Pharm. Bull. 39.2129 (1991)
- [31] Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Usami, Y., Fujita, T.: Phytochemistry. 31.1209 (1992)
- [32] Nakazawa, S., Ikeda, O.: Jap. 72.33.122; C.A. 77.130580 (1972)
- [33] Yamamoto, I., Nagumo, T., Yagi, K., Taminaga, H., Aoki, M.: Jap. J. Exp. Med. 44.543 (1974)
- [34] Nakazawa, S.: Ann. Rep. Co-op. Res. (Can.) Minist. Educ. 460 (1972)
- [35] Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E., Maruyama, H., Mori, H.: Hydrobiologia 116/117. 145 (1984)
- [36] Reddy, B. S., Sharma, C., Laurel, M.: Mutat. Res. 127.113 (1984)
- [37] Takahashi, M.: J. Jpn. Soc. Reticuloendothel. Syst. 22.269 (1983)
- [38] Biard, J.F., Verbist, J.F.: Plant. Med. Phytother. 15.167. (1981): Biol. Abst; 76.66619 (1983)
- [39] Bino, A.: J. Am. Chem. Soc. 102.7991 (1980)
- [40] Tabata, K., Wataru, I., Takemasa, K., Kawabata, S., Misaki, A.: Carbohydr. Res. 89.121 (1981)

- [41] Pollack, S., Nelson, K.: J. Immunology. 110.1440 (1973)
- [42] Iatropoulos, M.J., Goldberg, L., Coulston, F.: Experimental and Molecular Pathology 23.386 (1975)
- [43] Thompson, A. W. T., Fowler, E.F.: Agents and Actions. 11.265 (1981); ASFA: 12.26 (1982)
- [44] Wakabayashi, K., Inagaki, T., Fujimoto, Y., Fukuda, Y.: Cancer Letters. 4.171 (1978)
- [45] Fabian, R. F., Abraham, R., Coulston, F., Golberg, L.: Gastroenterology 65.265 (1973)
- [46] Cater, D.B. : Br. J. Cancer. 15.607 (1961)
- [47] Sawicki, J. E., Catanzaro, P. : Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 49.7909 (1975)
- [48] Watanabe, K., Reddy, B. S., Ching, Q. W., Weisburger, J. H. : Cancer Research. 38.4427 (1978)
- [49] Bhakuni, D. S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E., Hoeneisen, M. : Lloydia 39.225 (1976)
- [50] Guidelines for Provision of Natural Product Extracts for Anticancer and Anti-Aids Screening in the NCI Program., Natural Product Branch, Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment, National Cancer Institute. (NCI). (1972)
- [51] Mayer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin.: Planta Medica 45.31 (1982)
- [52] Oyama, V.I., Eagle, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91.305 (1972)
- [53] Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193.265 (1951)
- [54] Folin, O., Ciocalteu, V.: J. Biol. Chem. 73.627 (1927)
- [55] Cancer Chemotherapy Reports part 3 Vol. 3 No. 2 Sept 59. 1972
- [56] Oswiecimska, M.: Herba Hungarica 19. No. 1 (1980)
- [57] Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Anderson, B., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Moore, D.S., McLaughlin, J.L.: J. Nat. Prod. 45.679 (1982)
- [58] Larionov, L.F.: Cancer Chemotherapy 3
- [59] Abbott, B.J.: Drug Research and Development Program N.C.I. Cancer Treatment Reports 60. No. 8 Aug. 1976
- [60] In Vivo Cancer Models, 1976-1982, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Developmental Therapeutics Program Division of Cancer Treatment, N.C.I. Publication No. 84-2635, Feb. 1984