

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**ENDOMETRİYUM KANSERİ HÜCRE HATTINDA
(RL95-2) ENDEMİK *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS.
HELDR. BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Rümeysa KORUBAŞI**

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN**

**II. Danışman
Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA**

**Yüksek Lisans Tezi
Mayıs 2024
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**ENDOMETRİYUM KANSERİ HÜCRE HATTINDA
(RL95-2) ENDEMİK *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS.
HELDR. BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Hazırlayan
Rümeysa KORUBAŞI**

**Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TYL-2023-12839 kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

**Mayıs 2024
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Rûmeysa KORUBAŞI

İmza:

X X X X

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Endometriyum Kanseri Hücre Hattında (RL95-2) Endemik *Centaurea lycaonica* Boiss. Heldr. Bitkisinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Rümeysa KORUBAŞI

Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra
KARABOĞAARSLAN

Ana Bilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Mükerrerem Betül AYCAN

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN danışmanlığında **Rümeysa KORUBAŞI** tarafından hazırlanan “**Endometriyum Kanseri Hücre Hattında (RL95-2) Endemik *Centaurea lycaonica* Boiss. Heldr. Bitkisinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

31.05.2024

JÜRİ

İmza

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

Üye: Doç. Dr. Gökhan ÜNAL

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hatice BEKÇİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bana sabırla ve ilgi ile yardımcı olan, her türlü desteği ve fedakârlığı gösteren, bilgi ve tecrübelerini paylaşan kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda yer alan bitki temininde ve ekstraları hazırlamamda yardımlarını eksik etmeyen, bitki ile ilgili referans çalışmalar yaparak araştırmalarımın ışık tutan ve tüm süreç boyunca destek olan ikinci danışman hocam Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA'ya,

Tez çalışmamda kullandığım bitkinin toplamasında yardım eden sayın Prof. Dr. Osman TUGAY'a,

Tez çalışmamı TYL-2023-12839 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Tez savunma jürimde yer alan sayın hocalarım Doç. Dr. Gökhan ÜNAL ve Öğretim Görevlisi Dr. Hatice BEKÇİ'ye,

Çalışma boyunca bana yol gösteren, yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Nuh Mehmet BOZKURT'a,

Laboratuvarında beraber çalıştığım ve tez yazım aşamasında birbirimize desteklerimizi sunduğumuz, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Ecz. Safa EMİNOĞLU, Ecz. Eylül GÜNGÖRENLER ve Ecz. Hatice KÖRKOCA'ya,

Bu süreçte bana maddi manevi desteği sunan, her zaman yanımda olan aileme, beni sabırla dinleyen ve ilgilenen ablam Hazel İLGÜN'e ve zorlu deney süreçlerinde bana her zaman iyi gelen sevgili yeğenim Ekin İLGÜN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Rümeysa KORUBAŞI

Kayseri, Mayıs 2024

**ENDOMETRİYUM KANSERİ HÜCRE HATTINDA (RL95-2) ENDEMİK
CENTAUREA LYCAONICA BOİSS. HELDR. BİTKİSİNİN SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rümeysa KORUBAŞI

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Farmakoloji Ana Bilim Dalı,

Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2024

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

ÖZET

Endometriyum kanseri, kadınlarda görülme sıklığı en fazla olan genital kanser türlerinden biridir. Tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler kullanılmaktadır. Endometriyum kanserinin oluşum mekanizmalarını aydınlatmak ve yeni tedavi seçeneklerini artırmak amacıyla hedefe yönelik kanser araştırmaları ortaya konmaktadır. Bilimsel çalışmalarda kanser tedavisi için bitkisel kaynaklı ürünlere yer verilmektedir. Bu amaçla bu tez çalışmasında Türkiye’de endemik olarak yetişen *C. lycaonica* bitkisinin RL95-2 endometriyum kanser hücre hattında potansiyel sitotoksik etkinliği incelendi. Kanser hücrelerinde sıklıkla gözlenen azalmış apoptoz aktivitesinden dolayı kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların çoğu apoptotik yolları aktive etmektedir. Bu sebeple apoptotik yolda görev alan Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 üzerine *C. lycaonica* bitkisinin potansiyel etkisi araştırıldı. Çalışma kapsamında *C. lycaonica* bitkisinin kök kısımlarından elde edilen metanol (CRM) ve diklorometan (CRD) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkinliği 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlendi ve Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü (GZHA) ile IC₅₀ değerleri hesaplandı. CRD ve CRM’nin apoptoz etkinliği, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 apoptozla ilişkili proteinleri üzerinden değerlendirildi. Proteinlere ait ifadeler ELISA kiti kullanılarak tayin edildi. Elde edilen bulgular neticesinde, IC₅₀ değeri 60,02 µg/ml bulunan CRM en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdi. Ayrıca 48 sa. uygulamadan sonra 240 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığın %14,66’ya düşürdü. Uygulanan CRM 100 µg/ml konsantrasyonunda kontrole kıyasla Kaspaz-3’ü 3,62 kat; Kaspaz-9’u 4,32 kat artırdı. Ek olarak Bax/Bcl-2 oranını 3,63 kat artırarak apoptoz üzerinde aktivite gösterdi. Bu veriler ile *C. lycaonica* metanol ekstresinin diklorometan ekstresine göre daha sitotoksik ve apoptotik aktiviteye sahip olduğu gösterildi. Elde edilen sonuçların kanser araştırmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Literatürde *C. lycaonica* bitkisinin RL95-2 üzerindeki etkilerinin araştırılmasına yönelik ilk çalışma olması önem arz etmektedir. Fakat etki mekanizmasının aydınlatılması için kaspaz ve Bax/Bcl-2’ye bağlı apoptoz çalışmalarının genişletilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; *Centaurea lycaonica*; MTT; Sitotoksitesite; RL95-2.

**THE INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF
ENDEMIC *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. HELDR. ON ENDOMETRIAL
CANCER CELL LINE (RL95-2)**

Erciyes University Institute of Health Sciences

Department of Pharmacology Pharmacology,

Master's Thesis, May 2024

Advisor: Assoc. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

ABSTRACT

Endometrial cancer is one of the most commonly occurring genital cancers in women. Treatment typically involves a combination of chemotherapy, radiotherapy, and surgical procedures. Nowadays, targeted cancer research aims to elucidate the mechanisms of endometrial cancer formation and expand treatment options using plant-based products. In this thesis, the potential cytotoxic activity of the endemic Turkish plant *C. lycaonica* was examined on RL95-2 endometrial cancer cell line. Many drugs used in cancer treatment activate apoptotic pathways after decreased apoptosis activity commonly observed in cancer cells. Therefore, the potential effect of *C. lycaonica* on caspase-3, caspase-9, Bax, and Bcl-2 which play role in the apoptotic pathway, was investigated. Methanol (CRM) and dichloromethane (CRD) extracts obtained from the root parts of *C. lycaonica* were evaluated for their efficacy on cell viability using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, and IC₅₀ values were calculated using Real-Time Cell Analyzer (RTCA). The apoptotic activity of CRD and CRM was assessed through apoptotic proteins caspase-3, caspase-9, Bax, and Bcl-2. Protein expressions were determined using an ELISA kit. As a result, CRM with an IC₅₀ value of 60.02 µg/mL exhibited the highest cytotoxic activity. Moreover, it reduced cell viability to 14.66% at a concentration of 240 µg/mL after 48 hours of application. CRM at a concentration of 100 µg/mL increased caspase-3 by 3.62-fold and caspase-9 by 4.32-fold compared to the control. Additionally, it increased the Bax/Bcl-2 ratio by 3.63-fold, indicating activity on apoptosis. These findings suggest that the methanol extract of *C. lycaonica* is more cytotoxic and apoptotic compared to the dichloromethane extract. The results are expected to contribute to cancer research. This study investigating the effects of *C. lycaonica* on RL95-2 is the first of its kind in the literature. However, further studies are needed to expand apoptotic studies related to caspases and Bax/Bcl-2 to elucidate the mechanism of action.

Key Words: Apoptosis; *Centaurea lycaonica*; Cytotoxicity; MTT; RL95-2.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
TABLOLAR ve ŞEKİLLER	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 ENDOMETRİYUM KANSERİ	4
2.2.1. İnsidans ve Epidemiyolojisi	7
2.2.2. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları	9
2.2. KANSER OLUŞUM MEKANİZMALARI.....	11
2.2.3. DNA Onarım ve Apoptozis Genleri	11
2.2.4. Kaspazlar	11
2.2.5. Bcl-2 Ailesi	12
2.4. ASTERACEAE FAMILİYASI.....	14
2.4.1. <i>Centaurea</i> L. cinsi.....	14
2.4.1.1. <i>C. lycaonica</i> Özellikleri	16
2.5. <i>CENTAUREA</i> TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN FARMAKOLOJİK ÇALIŞMALAR.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	20
3.2. KULLANILAN GEREÇLER	21
3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER	21
3.4. KULLANILAN HÜCRE HATTI	23
3.5. HÜCRE SAYIMI	24
3.6. EKSTRE HAZIRLANMASI	25

3.7. MTT HÜCRE CANLILIK DENEYİ.....	26
3.8. GZHA CANLILIK DENEYİ.....	28
3.9. DENEY GRUPLARI	29
3.10. PROTEİN İZOLASYONU	30
3.11. BCA KİTİ İLE PROTEİN TAYİNİ DENEYİ.....	31
3.12. KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX VE BCL-2 TAYİN DENEYLERİ	32
4. BULGULAR	34
4.1. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI.....	34
4.2. GZHA BULGULARI.....	36
4.3. KASPAZ-3 TAYİNİ BULGULARI.....	39
4.4. KASPAZ-9 TAYİNİ BULGULARI.....	40
4.5. BAX/BCL-2 BULGULARI.....	41
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
7. KAYNAKLAR.....	56
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

BCA	: Bikinkoninik asit
BSA	: Sığır serum albumini
BT-549	: Meme duktal karsinomu
CI	: Hücre indeksi
CRD	: <i>C. lycaonica</i> radix diklorometan ekstresi
CRM	: <i>C. lycaonica</i> radix metanol ekstresi
CTL	: Sitotoksik T lenfositleri
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FBS	: Fetal sığır serumu
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu
GZHA	: Gerçek zamanlı hücre analizörü
HCT-116	: Kolorektal karsinoma hücre hattı
HeLa	: İnsan serviks kanseri hücre hattı
IC₅₀	: İnhibitör konsantrasyon %50
KB	: Oral epidermal karsinom
LNCaP	: İnsan prostat kanser hücre hattı
LVSI	: Lenfovasküler alan invazyonu
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MTT	: 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	: Phospate Buffer Saline
RL95-2	: İnsan endometriyum kanseri hücre hattı
SK-OV-3	: Yumurtalık karsinomu

TABLÖLAR ve ŞEKİLLER

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2. 1. Endometriyum kanseri Bokhman sınıflaması.....	7
Tablo 2. 2. Endometriyum kanserinde risk faktörleri	8
Tablo 2. 3. Endometriyum kanseri evrelemesi	9
Tablo 3 1. Seyreltilmiş albümin (BSA) standartlarının hazırlanması	32
Tablo 4. 1. CRD ve CRM’ye ait MTT ve xCELLigence IC ₅₀ değerleri	39
Şekil 2. 1. Hücre döngüsü	6
Şekil 2. 2. Endometriyum kanseri dünya üzerinde dağılımı ve Türkiye’deki insidans ve mortalitesi.....	9
Şekil 2. 3. Apoptozu aktive eden yollar	13
Şekil 2. 4. Bcl-2 ailesi üyelerinin apoptoz mekanizmasındaki rolü.....	13
Şekil 2. 5. Türkiye’deki endemik taksonların bölgelere göre dağılımı.....	14
Şekil 2. 6. <i>C. lycaonica</i> türünün Türkiye’de dağılımı.....	16
Şekil 2. 7. <i>C. lycaonica</i> bitkisinin resmi	17
Şekil 3 1. Hücre sayım cihazı	25
Şekil 3 2. MTT bileşiğinin formazana indirgenmesi	26
Şekil 3 3. MTT protokolü.....	27
Şekil 3 4. Soğutmalı santrifüj cihazı	31
Şekil 4. 1. CRD’nin RL95-2 üzerindeki % hücre canlılığı	34
Şekil 4. 2. CRM’nin RL95-2 üzerindeki % hücre canlılığı	35
Şekil 4. 3. CRD ekstresinin RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.’deki etkisi	37
Şekil 4. 4. CRM ekstresinin RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.’deki etkisi	38
Şekil 4. 5. RL95-2 üzerinde Kaspaz-3 aktivitesi kat değişimi	40
Şekil 4. 6. RL95-2 üzerinde Kaspaz-9 aktivitesi kat değişimi	41
Şekil 4. 7. RL95-2 üzerinde Bax/Bcl-2 oranı.....	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

“Zarif düğme” olarak bilinen *C. lycaonica*, Türkiye’de yalnızca Konya ve civarında yetişen Asteraceae familyası ve *Centaurea* cinsine ait endemik bir türdür. Asteraceae familyasının en geniş üyelerinden olan *Centaurea* L., otsu, tek yıllık veya çok yıllık çiçekli bir bitki cinsidir. Batı Asya, Kuzey Yarım Küre, Orta Avrupa ve Akdeniz havzası bölgelerinde yetişen bu cinsin Türkiye’de 172 türü bulunmaktadır ve endemizm oranı %64 şeklindedir (Çelik ve ark., 2008; Khammar ve Djeddi, 2012; Duman ve ark., 2021).

Bu cinse ait türlerin geleneksel tıpta kullanımları bulunmaktadır. Diyare, gastrik ülser, hemoroit, soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlar, zehirlenmeler ve böcek sokmaları gibi şikayetlerin tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır. Ayrıca iştah açıcı, ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak da kullanımları vardır (Baytop, 1999; Csupor ve ark., 2010; Khammar ve Djeddi, 2012; Wei ve ark., 1997; Vallejo ve ark., 2009).

Centaurea cinslerinin tıbbi kullanımları zengin sekonder metabolit içerikleri ile ilişkilendirilmektedir. Seskiterpen laktonlar, sinnamik asit, lignan ve flavonoit gruplar bitkinin etkinliğinden sorumlu temel içeriklerdir (Reda ve ark., 2023). Çeşitli *Centaurea* türleri üzerinde içerik analizi yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Dimkić ve ark., 2020; Sharonova ve ark., 2021). Ayrıca bitki ekstrelerinin ve bu bitkilerden izole edilen bileşiklerin antikanser etkinliğini kanıtlayan çalışmalar mevcuttur (Salla ve ark., 2013; Şekerler ve ark., 2020; Shoeb ve ark., 2007).

Centaurea türleri üzerinde genellikle *in vitro* sitotoksik ve apoptotik etki çalışmalarının yapıldığı görülmektedir (Aboul-Soud ve ark., 2022; Esmaili ve ark., 2021; Forgo ve ark., 2012; Yıldırım ve ark., 2022). Ayrıca bitki üzerinde antioksidan

(Erel ve ark., 2014)., antienflamatuvar (Özsoy ve ark., 2015), antibakteriyel (Saroglou ve ark., 2005), antimikrobiyal (Keser ve ark., 2020), anti-malaryal (Özbilgin ve ark., 2014), antiproliferatif ve yara iyileştirici (Aksoy, 2020) etkinliğe dair çalışmalar da mevcuttur. *Centaurea* cinsine ait türlerin deri, lenfoma, kolon, akciğer, meme ve serviks kanser hücre hatlarında sitotoksik aktivitesinin değerlendirildiği ve olumlu sonuçlar elde edilen çalışmalar bulunmaktadır (Barrero ve ark., 1995; Forgo ve ark., 2012; Lonergan ve ark., 1992; Zater ve ark., 2016).

Endometriyum kanseri, kadınlarda en çok gözlenen ve hayatı etkileyen ciddi bir kanser tipidir. Genital kanserler arasında en sık gözlenen ve tüm kanser türleri içinde 6. sırada olan malign bir hastalıktır (Web-1). Risk faktörleri arasında 50 yaş üstü olmak, obezite, geç menopoza, düzensiz menstrüasyon, östrojen tedavisi bulunmaktadır. Endometriyal hiperplazi ile ilişkilendirilen endometriyum kanseri, genellikle postmenopozal kadınlarda ortaya çıkar ve ilerleyen yaşlarda daha kötü seyreder. Endometriyum kanserinin en sık gözlenen tipi adenokarsinomdur (Merrill ve ark., 2005). Tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bu tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve ilaç direncinin gelişmesi tedavi prosedürünü kısıtlamakta ve hedefe yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç doğmaktadır (Kumar ve ark., 2012). Özellikle kemoterapinin kanserli hücrenin yanı sıra sağlıklı dokulara da zarar vermesi ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Bu yan etkileri sebebiyle, kanser gibi hayatı etkileyen sağlık sorunlarının tedavisinde sentetik ilaçlar yerine bitkisel ürünler tercih edilmektedir (Mahata ve ark., 2012).

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak endometriyum kanserinin moleküler mekanizmasının araştırılması, hastalık sürecine ve tedavisine katkı sağlayacaktır. Endometriyum kanserinde *C. lycaonica* bitki ekstraktlarının etkili olup olmadığı ve potansiyel etki mekanizmalarının tespiti yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından aydınlatıcı olacaktır. Elde edilen sonuçların endometriyum kanserinin tedavi hedefleri üzerinde yeni stratejiler oluşturacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte ülkemizde yetişen endemik bitkilerin bilimsel araştırmalarda yer alması ve olası farmakolojik etkinliklerinin belirlenmesi gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. Bu nedenle bu tez çalışmasında, insan endometriyum kanser hücre hattı olan RL95-2

üzerinde ülkemizde Konya civarında endemik olarak yetişen *C. lycaonica* türünün sitotoksik ve apoptotik etkisi incelenecektir.

C. lycaonica türünün kök kısımları toplanacak ve kurutulacak, daha sonra ise 24 sa. maserasyon yöntemiyle önce CRD ekstresi hazırlanacaktır. CRD ekstresinden metanolla partisyon yöntemiyle CRM ekstresi elde edilecektir. Elde edilen bu ekstrelerin, insan endometriyum kanser hücre hattı olan RL95-2 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi MTT canlılık testi ve GZHA ile belirlenecektir. Apoptotik hücre ölümü, ilgili Kaspaz-3/9 ve Bax/Bcl-2 proteinleri ile araştırılacaktır.

Bu çalışma sonucunda, endometriyum kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine belirlenen *Centaurea* cinsinin inhibitör etkileri araştırılacaktır. CRM ve CRD ekstrelerinin hücre apoptozu üzerindeki mekanizması, ilgili proteinler analiz edilerek aydınlatılacaktır. Böylelikle kansere karşı bitkisel ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında, potansiyel aday olarak *C. lycaonica* ortaya konacaktır.

CRD ve CRM'nin endometriyum kanserinde antiproliferatif bir etkiye sahip olduğu hipotezi önerilmektedir.

Çalışma sonucunda erişilmek istenen bulgular:

- RL95-2 hücrelerine *C. lycaonica* bitki ekstreleri uyguladıktan sonra kullanılacak MTT canlılık testi vasıtasıyla *C. lycaonica*'nın kanser hücre sayılarını azaltması beklenmektedir.
- RL95-2 hücreleri üzerinde CRD ve CRM'nin zamana ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkisi, hücre indeksindeki düşüşe neden olarak gerçek zamanlı hücre analizi ile ortaya konacaktır.
- RL95-2 kanser hücrelerine ekstre uygulamaları yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonunun artması beklenmektedir.
- RL95-2 kanser hücrelerine ekstre uygulamaları yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla Bax/Bcl-2 oranını artması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDOMETRİYUM KANSERİ

Geçmiş yıllardan beri ciddi bir sağlık problemi olarak görülen kanser terimi, ilk defa kanser dokusunu yengece benzeten Hipokrat tarafından kullanılmıştır. “Cancer” veya “carcinos” kelimeleri Latince de yengeç anlamına gelmektedir ve kanser kelimesi buradan türetilmiştir. Galen ise kanser için “oncos” kelimesini kullanmıştır (Baykara, 2016).

Kanser, hücre döngüsü sırasında genlerde ve kromozomlarda meydana gelen değişikliklerin kontrolsüz hücre büyüme ve çoğalması ile sonuçlanan genetik bir hastalıktır. Değişiklikler hücre içinde veya çevreden gelen faktörlerden kaynaklanabilir. DNA’da meydana gelen kimyasal hasarın mutasyonlar sonucu kalıtsal hale gelmesi için DNA replikasyonu şarttır. Bunun yanında kanserin oluşabilmesi için kontrolsüz hücre çoğalmasını takiben diğer dokulara yayılım göstermesi de gerekmektedir. Primer tümör dokusunun başka dokuları istila etmesine invazyon, köken aldığı organ dışında diğer organlara sıçramasına ise metastaz denmektedir (Ringer, 2001). Kanser oluşumuna neden olan etmenler arasında tütün ve alkol kullanımı, sağlıksız beslenme, obezite, radyasyon, mesleki ve çevresel maruziyetler ve virüsler (Hepatit B ve C, Human Papillomavirüs vb.) sayılabilmektedir (Blackadar, 2016). Akciğer kanseri, kanser türleri arasında en çok rastlanan ve ölümcül olan türdür. Bunun dışında kadınlarda en çok meme kanseri, erkeklerde ise prostat kanseri sıklık göstermektedir (Siegel ve ark., 2015; Global Cancer 2022).

Kanser hücrelerinin özellikleri:

- Hücre yüzey reseptörleri dışarıdan gelen sinyallere daha duyarlıdır. Çoğalmayı aktive eden kendilerine özel sinyal sistemleri vardır.
- Sağlıklı hücrelerin aksine yeterli alan olmasa bile çoğalmayı durdurmaz ve bölünmeye devam eder.
- Sadece glikolizle elde edilen glikozu temel besin maddesi olarak kabul eder ve 100 kat fazla glikoz tüketir.
- Çoğalması için gereken besin ve oksijeni yeni damar sistemleri oluşturarak temin eder.
- Sonsuza dek çoğalmayı engellemek amacıyla her bölünmede kısalan telomerleri etkiler ve telomerez etkinliğini sabit tutar. Bu şekilde sonsuz bir biçimde bölünebilir
- Metastaz ve invazyon yeteneğine sahiptir.
- Programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilen apoptozu inhibe edebilir
- Genetik ve epigenetik açıdan stabil değildir, şekil değiştirebilir.
- Zorlu koşullara direnç geliştirebilir (Baykara, 2016).

Yetişkin insanlarda 10^{15} hücre bulunmaktadır. Bu hücreler çoğalmak ve hücre yenilenmesini sağlamak amacıyla devamlı bir hücre döngüsü içinde yer alır. Hücre döngüsü, G1 fazı, G2 fazı, S fazı ve M fazı şeklinde 4 aşamadan oluşur (Şekil 2.1). G1 fazında hücreler DNA sentezine hazırlık aşamasındadır. Çevreden büyüme sinyalleri alır ve bölünme için gerekli hazırlıkları başlatır. S fazında gerçekleşen DNA replikasyonunu G2 fazı izler, bu aşamada hücre bölünmek için yeterli büyümeyi sağlar. G1, G2 ve S fazları interfaz olarak adlandırılır ve hücre döngüsünün büyük bir kısmını oluşturur. İnterfazın devamında M fazı olarak ifade edilen mitoz bölünme gerçekleşir. Bu 4 fazın dışında G0 denilen istirahat fazı bulunmaktadır. Bu fazdaki hücreler dışardan uyarı gelmediği müddetçe dinlenme halindedir (Bertram, 2001; Dinçol ve ark., 2000).



G1- Büyüme
S- DNA sentezi
G2- Büyüme ve mitoz hazırlık
M- Mitoz

Şekil 2.1. Hücre döngüsü

Hücre döngüsünün bu aşamalarının herhangi birinde bir problem meydana gelirse hücre hasarı oluşabilir. Bu hasarları kontrol etmek amacıyla döngünün belirli noktalarında kontrol mekanizmaları bulunmaktadır. Bunlar; G1-S, G2-M ve mitoz bölünme içindeki metafaz-anafaz geçişleridir. Kontrol noktalarında hücrelerde hasar olup olmadığı ve bölünmeye devam edip edilmeyeceği tespit edilir. Hasarlı hücreler tamir edilmek amacıyla G0 fazına gönderilir veya apoptoza uğrar. Kontrol aşamasında rol oynayan genlerde veya apoptoz genlerinde meydana gelen değişiklik, hasarlı hücrenin kontrolsüz çoğalmasına ve dolayısıyla neoplazma oluşumuna sebebiyet verebilir (Reed ve ark., 2008).

Endometriyum kanseri, kadınlarda en çok gözlenen jinekolojik kanser tipidir. Jinekolojik kanserlerin %45'ini oluşturan endometriyum kanseri, kadınlarda gözlenen tüm kanserlerin %11'ini oluşturmaktadır (White, 1993). Genellikle postmenopozal kadınlarda ortaya çıkar ve ilerleyen yaşlarda daha kötü seyreder. Endometriyum kanserinin en sık gözlenen tipi adenokarsinomdur (Merrill ve ark, 2005).

Endometriyal kanserler Bokhman (1983) sınıflandırmasına göre iki temel tipe ayrılmaktadır (Tablo 2.1). Tip 1 kanserler hiperlipidemi, diyabet ve obezite kaynaklıdır ve endometriyal hiperplazi ile ilişkilidir. Anormal uterin kanama, infertilite veya menopozun geç başlangıcına bağlı hiperöstrojenizmden kaynaklanır. Tümöral grade düşük ve hormon reseptör yanıtı pozitifdir. Endometriyal atrofi ile ilişkilendirilen tip 2 ise endokrin ve metabolik hastalıklardan bağımsız olarak ortaya

çıkmaktadır. Tip 1'in aksine tümör grade yüksek ve hormon reseptör yanıtı negatiftir. Tip 1 endometrioit kanser iken; tip 2 non-endometrioittir. Tip 1 endometriyal kanserler, erken evrede teşhis edilir ve prognozu iyi seyreder. Tip 2 kanserler ise metastaz eğilimi gösterir, hastalık ilerleyen evrelerde teşhis edilir ve prognozu kötüdür (Bokhman, 1983; Wilczynski ve ark., 2016).

Tablo 2.1. Endometriyum kanseri Bokhman sınıflaması (Bokhman, 1983)

	Tip 1	Tip 2
İnsidans	%70	%30
Histoloji	Endometrioit	Non-endometrioit
Kaynak	Endometriyal intraepitelyal neoplazi	Endometriyal intraepitelyal karsinom
Klinik özellikler	Hiperlipidemi ve diyabeti olan obez kadınlar, Anormal uterin kanama, infertilite veya menopozun geç başlangıcına bağlı hiperöstrojenizm, Endometriyal hiperplazi	Obez olmayan kadınlar, Endokrin veya metabolik bozukluklardan bağımsız, Endometriyal atrofi
Hormon reseptör ekspresyonu	Pozitif	Negatif
Tümöral grade	Düşük	Yüksek
Teşhis	Erken evrede	İleri evrelerde
Prognoz	Olumlu	Olumsuz

2.2.2. İnsidans ve Epidemiyolojisi

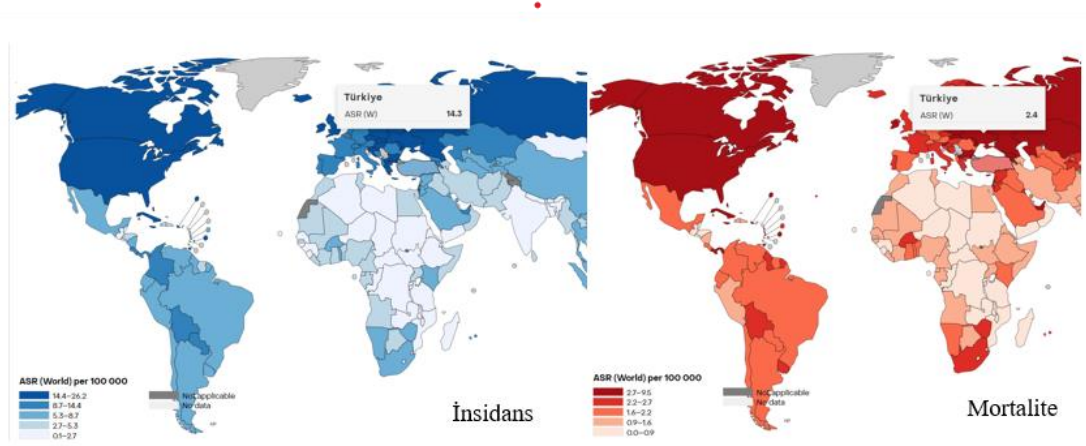
Endometriyum kanseri, genital kanserler arasında en sık gözlenen ve tüm kanser türleri içinde 6. sırada olan malign bir hastalıktır. Dünyada ve Türkiye’de kadınların yaşamını olumsuz yönde etkileyen ve her yıl ortalama 200.000 yeni tanı konulan ciddi bir sağlık sorunudur (Ferlay ve ark., 2015).

Risk faktörleri şu şekilde sıralanabilmektedir; 50 yaş üstü kadınlar, aşırı kilo veya obezite, östrojen tedavisi, atipik hiperplazi, erken menüstrüasyon başlangıcı, düzensiz menüstrüasyon döngüsü, polikistik over sendromu, infertilite, diyabet, hipertansiyon ve ailede kanser öyküsü (Tablo 2.2) (Anastazi ve ark., 2018; Braun ve ark., 2016; Clarke ve ark., 2018; Souza ve ark., 2015). Endometriyum kanserinde en büyük risk faktörü endometriyal hiperplazidir (Kurman ve ark., 1985; Pınar ve ark., 2008). Belirtileri arasında beklenmedik vajinal kanama, devamlı vajinal akıntı ve pelvik veya abdominal ağrı gözlenmektedir (Dijkhuizen ve ark., 2000).

Tablo 2.2. Endometriyum kanserinde risk faktörleri (Pınar ve ark., 2008)

Kişisel risk faktörleri	Aile öyküsü
Postmenopozal dönem	Endometriyum kanser öyküsü
Erken menarj	Meme, over veya kolon kanseri öyküsü
Geç menopoz	Çevresel etkenler ve yaşam biçimi
Geçmiş tıbbi öykü	Sağlıksız beslenme
Anormal veya postmenopozal kanama	Obezite
Devamlı anormal akıntı	Oral kontraseptif kullanımı
Endometriyum hiperplazisi	Rahim içi araç kullanımı
Hipertansiyon	İnfertilite
Tamoksifen kullanımı	Düşük parite
Polikistik over	Östrojen tedavisi

Global Cancer 2022 verilerine göre, dünya üzerinde endometriyum kanseri insidansı ve mortalite oranları sırasıyla %8,4 ve 1,7'dir. Türkiye'de ise insidans %14,3'lük bir orana sahipken; ölüm oranı %2,4 şeklindedir. (Şekil 2.2) (Web-1).



Şekil 2. 2. Endometriyum kanseri dünya üzerinde dağılımı ve Türkiye'deki insidans ve mortalitesi (Web-1)

2.2.3. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Endometriyal kanserlerde preoperatif evreleme amacıyla transvajinal sonografi veya manyetik rezonans teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler sayesinde miyometrial ve servikal invazyon tespit edilip cerrahi yöntem belirlenmektedir (Jantarasaengaram ve ark, 2014; Savelli ve ark., 2008). Tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için kanser evresinin tespiti son derece önemlidir. 2023 Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu (FIGO) evrelemesi en sık kullanılan sınıflama sistemidir (Tablo 2.3). Erken evrede tanı konma oranı %75'tir. FIGO evre I veya II için 5 yıllık sağkalım oranı %74-91 aralığında iken; evre III için %57-66, evre IV için ise %20-26 şeklindedir (Creasman ve ark., 2006).

Tablo 2.3. Endometriyum kanseri evrelemesi (FIGO 2023)

Evre I	Uterusa sınırlı hastalık, iyi prognozlu
IA	Agresif olmayan histotiplerde lenfovasküler alan invazyonu (LVSI) olmayan ya da fokal olan olgularda $\geq$ %50 miyometrial invazyon
IB	
Evre II	Ekstrauterin yayılım olmadan servikal stromal invazyon ya da aşikâr LVSI ya da miyometrial invazyonu olan agresif histotipler

Tablo 2.3. Devam.

IIA	Servikal stromal invazyon
IIB	Aşikâr (substantial) LVSI
IIC	Miyometrial invazyonu olan agresif histotipler
Evre III	Lokal ve/veya rejyonel tümör yayılımı
IIIA	Uterin seroza, adneks ya da her ikisinin tutulumu; direk invazyon ya da metastaz
IIIB	Vajen ve/veya parametrial tutulum ya da metastaz, pelvik periton tutulumu
IIIC	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu metastazı
Evre IV	Mesane ve/veya barsak mukozası tutulumu ve/veya uzak metastaz
IVA	Mesane ve/veya barsak mukozası tutulumu
IVB	Abdominal peritoneal metastaz, pelvis dışı intraperitoneal karsinomatozis
IVC	Uzak metastaz, inguinal lenf nodu, akciğer, karaciğer, kemik...

Endometriyum kanseri tedavisinde temel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve bu yöntemlerin kombine kullanılması şeklinde tedaviler yapılmaktadır.

Cerrahi yöntemde temel prosedür total histerektomi veya çift taraflı salpingo-ooferektomidir. Abdominal veya vajinal yaklaşımın yanında robotik cerrahi ve laparoskopi gibi minimal invaziv işlemler de cerrahi yöntemler arasındadır. Çoğunlukla lenfatik yol üzerinden yayılım gösteren endometriyum kanseri için lenfadenektomi yöntemi önerilmektedir. Evre I hastalarda total histerektomi veya çift taraflı salpingo-ooferektomi önerilirken evre IA ve IB hastalarda lenfadenektomi önerilmektedir. Evre II kanserlerde radikal histerektomi, çift taraflı salpingo-ooferektomi ve pelvik lenfadenektomi; evre III ve IV’de ise maksimum cerrahi yöntemler kullanılmalıdır (Colombo ve ark., 2013).

Düşük ve orta risk kanserlerde radyoterapi ilk aşamada tercih edilmemekte ve eksternal beam radyoterapi’nin etkinliği değerlendirildiğinde sağkalımı etkilemediği gösterilmektedir (Mariani ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda radyoterapinin yüksek ve orta risk grubunda adjuvan tedavi olarak tercih edilebileceği ve vajinal nüksü düşürdüğü ortaya konmuştur (Blake ve ark., 2009; Creutzberg ve ark., 2000; Keys ve ark., 2004). Orta riskli hastalarda pelvik radyoterapi ya da vajinal brakiterapi tercih edilmektedir (Nout ve ark., 2010).

Adjuvan kemoterapi, hastalığın ilerleyen evrelerinde (evre III ve IV) tedavinin en önemli kısmını oluşturur. Bu hastalarda sisplatin ve doksorubisin (dox) uygulaması sağkalımı artırmaktadır (Randall ve ark., 2006). Evre IC ve IIB hastalarının tedavi değerlendirilmesinde radyoterapiye göre kemoterapinin etkinliği ortaya konmuştur (Susumu ve ark., 2008).

Bunlara ek olarak kemoterapi ve radyoterapinin kombine olarak kullanıldığı orta ve yüksek risk ve ileri evre kanserli hastalar üzerinde etkili bulunan çalışmalar mevcuttur (Creutzberg ve ark., 2004; Greven ve ark., 2006).

2.2. KANSER OLUŞUM MEKANİZMALARI

Karsinogeneze yol açan temel mekanizmalar, hücre genomundaki değişiklikler (nokta ve çerçeve kayma mutasyonları, kimerik protein oluşması, DNA'da meydana gelen epigenetik değişimler ve genlerin aşırı veya anormal ekspresyonu vb.), onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım ve apoptoz genlerinde meydana gelen değişikliklerdir (Baykara, 2016; Bertram, 2001).

2.2.3. DNA Onarım ve Apoptozis Genleri

DNA replikasyonu sırasında içerden veya dışardan gelen etkenler sebebiyle DNA'da hasar meydana gelebilmektedir. DNA onarım genleri, oluşan hasarı tamir etmek amacıyla gerekli işlemleri başlatır. En bilinen DNA onarım geni BRCA genidir. Onarımın başarısız olması durumunda hasarlı hücre apoptoz veya nekroz ile programlı ölüme gönderilir. Apoptoz, genlerin etkisiyle hücrelerin kendilerini programlı ve kontrollü ölüme gönderdikleri hücrel dengeyi sağlayan bir olaydır. Hücrenin yaşamına devam etmesi veya ölümü apoptoz olayına ve dolayısıyla apoptozun kontrolünü sağlayan genlere bağlıdır. Bcl-2 ailesi ve kaspazlar apoptozun düzenli işleminde görev alan gen gruplarıdır. Bu genlerde oluşabilecek mutasyonlar kansere neden olabilmektedir (Baykara, 2016; Yokuş ve Çakır, 2012).

2.2.4. Kaspazlar

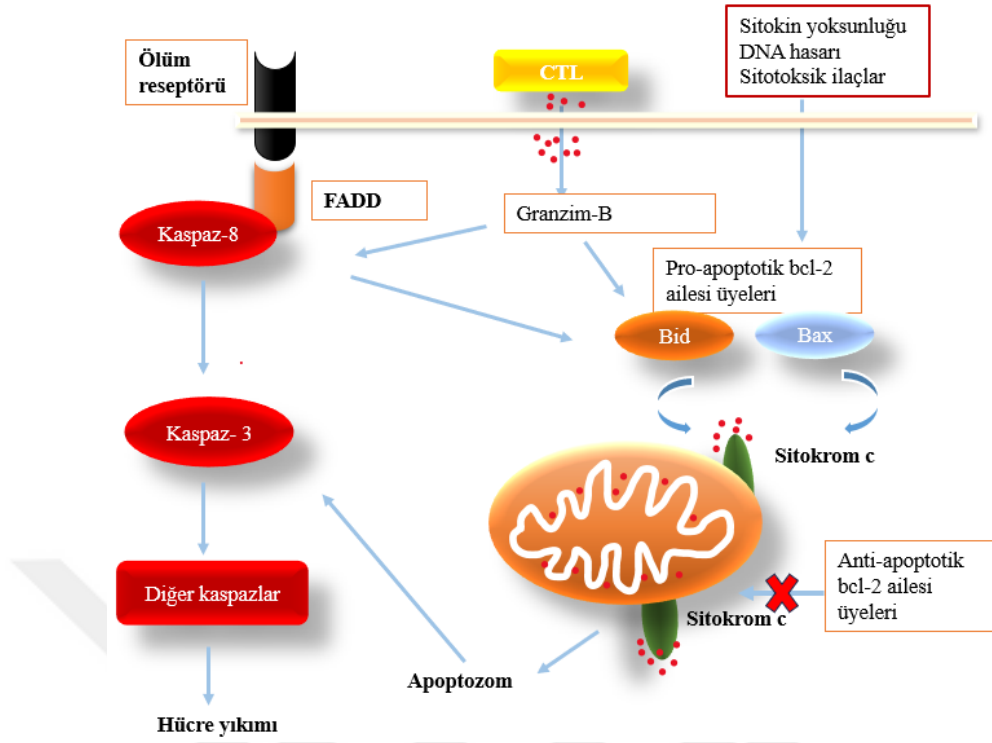
Hücrede aktif olmayan formda bulunan kaspazlar, bir dizi reaksiyon sonucu birbirlerini aktive eden sistein proteaz grubu apoptoz proteinleridir. DNA'nın onarımı ve replikasyonu için gereken enzimleri inaktive ederek apoptoza neden

olurlar. Başlatıcı (Kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör (Kaspaz 3, 6, 7) ve enflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olarak üç gruba ayrılırlar (Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

2.2.5. Bcl-2 Ailesi

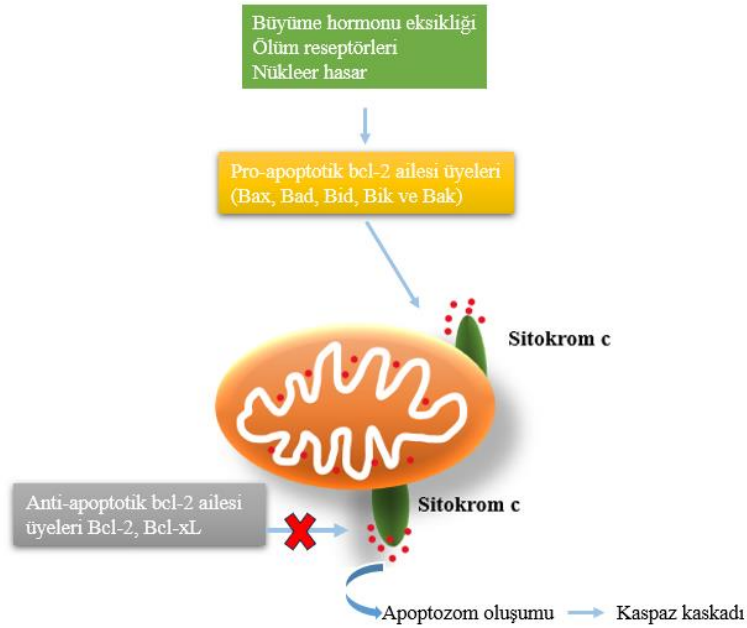
En önemli apoptoz genlerini içeren Bcl-2 ailesi, birbirlerine ters etki oluşturan pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerden oluşmaktadır. Bid, Bad, Bax, BclXs, Puma, Bak, Bim, ve Noxa pro-apoptotik üye grubunu oluştururken; Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 genleri anti-apoptotik gen gruplarını oluşturur. Anti-apoptotik proteinler çekirdek zarı, endoplazmik retikulum ve mitokondri dış membranında bulunabilir. Pro-apoptotik proteinler ise sadece sitozolde bulunur. Hücrede pro-apoptoz genlerinin sayısı anti-apoptoz genlerine oranla fazla ise apoptoz eğilimi yüksektir (Adams, 2001).

Hücre zarında bulunan ölüm reseptörleri FADD (Fas ile ilişkili ölüm proteini) gibi adaptör moleküller yoluyla Kaspaz-8'in toplanmasına sebep olur. Aktif halde bulunan Kaspaz-8, Kaspaz-3'ü aktive eder ve zincirleme reaksiyon ile diğer kaspazlar aktive olur. Bu olay hücresel yıkım ile sonuçlanır. Kaspaz-8 aynı zamanda Bcl-2 ailesinden pro-apoptotik protein Bid aktivasyonunu sağlar. Mitokondride zar potansiyelini değiştiren Bid, Bax ve Bak aktivasyonunu indükler ve aktive olan genler sitozole sitokrom c salınımı teşvik eder. Sitokrom c, apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur. Apoptozom, Kaspaz-9'u aktif hale getirir ve bu olay daha fazla kaspaz grubunun aktivasyonu ile sonuçlanır. Sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından hücreye salınan ve kaspaz benzeri serin proteazı olan granzim B, apoptozu destekler, doğrudan Kaspaz-8 ve Bid genini aktiveleştirerek önemli olayları başlatır. Sitokin yoksunluğu, DNA hasarı ve sitotoksik ilaçlar doğrudan Bcl-2 ailesinin apoptotik genlerini uyarak apoptozu başlatabilir (Şekil 2.3) (Adrain ve Martin, 2001).



Şekil 2.3. Apoptozu aktive eden yollar (FADD: Fas ile ilişkili ölüm proteini. CTL: Sitotoksik T lenfositleri)

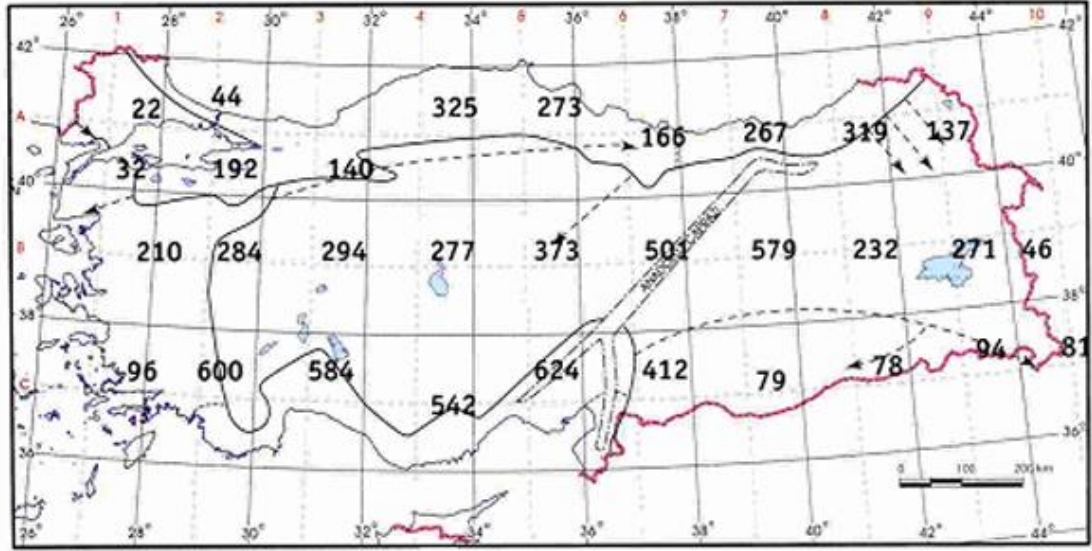
Bcl-2 ailesinin apoptozu indükleyen üyeleri sitokrom c salınımını aktive ederken; apoptoz karşıtı üyeler inhibe eder (Şekil 2.4) (Adrain ve Martin, 2001).



Şekil 2.4. Bcl-2 ailesi üyelerinin apoptoz mekanizmasındaki rolü

2.4. ASTERACEAE FAMILİYASI

Türkiye, Orta Doğu ve Avrupa'nın bitki çeşitliliği ve endemizm oranı açısından en zengin ülkelerindendir. Türkiye'de yetişen endemik bitkilerin bölgelere dağılımı haritada gösterilmiştir (Şekil 2.5)



Şekil 2. 5. Türkiye'deki endemik taksonların bölgelere göre dağılımı (Ekim ve ark., 2000)

Türkiye'de 152 cinsi bulunan Asteraceae familyasının bu cinslere ait 1230 tür ve 133 alt türü bulunmaktadır. Ülkemizdeki en büyük bitki familyalarından olmakla birlikte endemizm oranı %40,7 şeklindedir. Familyaya ait en geniş cinsler; *Centaurea*, *Taraxacum*, *Hieracium* ve *Anthemis*'tir (Yıldırım, 1999). Dünyanın hemen hemen her bölgesinde yayılım gösteren Asteraceae familyası bitkileri, özellikle ılıman iklime sahip bölgelerde yetişmektedir (Attar ve Ghahreman, 2006). İlaç sanayisinde veya süs bitkisi olarak kullanımları bulunmaktadır (Erdtman, 1954; Heywood, 1978; Rowley ve ark., 1981).

2.4.1. *Centaurea* L. cinsi

Asteraceae familyasının en geniş üyelerinden olan *Centaurea* L., otsu, tek yıllık veya çok yıllık çiçekli bitkileri içeren bir cinstir. Batı Asya, Kuzey Yarım Küre, Orta Avrupa ve Akdeniz havzası bölgelerinde yetişen bu cinsin Türkiye'de 172 türü bulunmaktadır ve endemizm oranı %64 şeklindedir (Çelik ve ark., 2008; Khammar ve Djeddi, 2012; Duman ve ark., 2021). Halk arasında deve diken, peygamber çiçeği

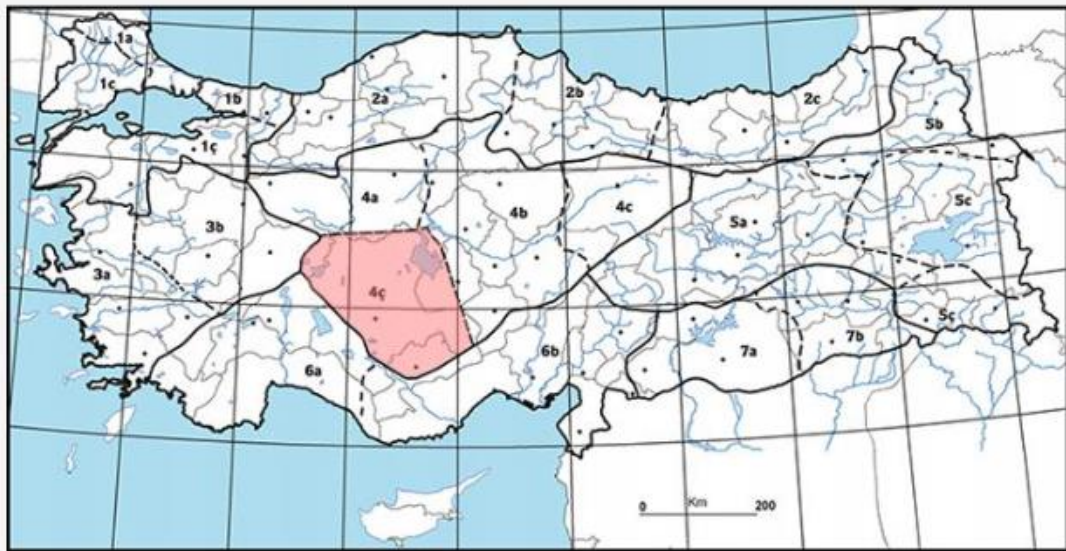
veya peygamber otu şeklinde yaygın isimleri vardır (Khammar ve Djeddi, 2012). Dikenli yapısı ile yabani otları andıran *Centaurea* cinsinin çiçekleri, mavi, kırmızı, sarı ve beyaz gibi çeşitli renklerde olabilmektedir (Armitage, 2001). Bu cinse ait türler tek veya çok yıllık olabilmektedir. Bitkilere ait toprak üstü kısımlar çoğunlukla tüylü yapıda olsa da bazı türlerde kabuklu veya pürüzsüz olmaktadır. Yaprak dizilişi genellikle alternattır. Yaprak ayası pinnatifit, pinnatipartit ve decurrent özellik göstermektedir. Meyve tipi akendir ve meyvelerin yüzeyi tüysüz, tepesi ise düz ya da yuvarlaktır (Wagenitz, 1975). Bu cinse ait türlerin geleneksel tıpta kullanımları bulunmaktadır. Diyare, gastrik ülser, hemoroit, soğuk algınlığı ve gribal enfeksiyonlar, zehirlenmeler ve böcek sokmaları gibi şikayetlerin tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır. Ayrıca iştah açıcı, ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak da kullanımları vardır (Baytop, 1999; Csupor ve ark., 2010; Khammar ve Djeddi, 2012; Wei ve ark., 1997; Vallejo ve ark., 2009).

Sayıda yüksek oranda türe ve geniş biyolojik çeşitliliğe sahip *Centaurea* cinsleri zengin sekonder metabolit içeriğine sahiptir. Tıbbi kullanımlardan sorumlu seskiterpen laktonlar bu cins bitkilerin temel içeriğini oluşturmakla birlikte sinnamik asit, lignan ve flavonoit gruplar da içeriğe dahil olmaktadır (Reda ve ark., 2023). Bunun yanında triterpenik bileşikler, yağ asit ve esterleri de tespit edilen bileşik grupları arasında bulunmaktadır (Sharonova ve ark., 2021). Seskiterpen laktonlar, terpenler grubunun alt üyesidir ve 2-metil-1,3-bütadien ünitesini içerir. *Centaurea* türlerinde en fazla gözlenen seskiterpen lakton türleri, cnicin, janerin, cynaropicrin ve chlorohyssopifolin A olmaktadır (Bruno ve ark., 2013). *C. calcitrapa* üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin çeşitli ekstreleri kullanılmış ve içerik analizi sonucunda centaureidin, nepetin jaceidin, flavonoit glikozitler, kaempferide, fenolik asitler ve esterler bulunmuştur (Dimkić ve ark., 2020). *C. ragusina*'nın antikanser etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, bitkinin etanol ekstresinden seskiterpen laktonlar ve flavonoitler, hispidulin, chrysin, oroxylin A, hemistepsin, deacylcynaropicrin ve ragusin tespit edilmiş ve aktivite bu bileşiklere bağlanmıştır (Grienke ve ark., 2018). *C. fenzlii* ile yapılan bir çalışmada, insan kolorektal kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksik aktivite gösteren yaprak ekstresinde, kateşin, amitriptilin ve metolcarb bulunmuştur (Şimşek Sezer, 2022). Bitki ekstresi kullanmanın yanı sıra bitkiden izole edilen bileşiklerin antikanser etkinliğinin

varlığını kanıtlayan çalışmalar da mevcuttur (Salla ve ark., 2013; Shoeb ve ark., 2007; Şekerler ve ark., 2020).

2.4.1.1. *C. lycaonica* Özellikleri

“Zarif düğme” olarak bilinen *C. lycaonica*, Türkiye’de yalnızca Konya ve civarında yetişen *Centaurea* cinsine ait endemik bir türdür. 1845 yılında ilk kez Heldreich tarafından Konya Beyşehir civarından toplanmıştır. Bu yıldan sonra yakın zamana kadar toplanmayan bitki, Doç. Dr. Ahmet DURAN tarafından Konya Seydişehir bölgesinden toplanmıştır. Toplanan bitkinin Dr. Tuna UYSAL tarafından teşhis edilmesiyle *C. lycaonica* türü olduğu tespit edilmiştir (Uysal ve ark. 2008). 37°.44'.486" Kuzey, 32°.04'.208" Doğu koordinatlarında yer almaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. *C. lycaonica* türünün Türkiye’de dağılımı (Web-2)

Çok yıllık, gövdesi 30 cm’e kadar uzanan, basit veya tek dallı bir bitkidir. Çiçekleri pembe-mor renklidir ve çiçeklenme zamanı haziran- temmuz aylarıdır. 1570–1580 m yüksekliğe sahip açık yamaçlarda, kısa çimenlik alanlarda, seyrek iğne yapraklı ormanlar ve makiliklerde yetişir. İnvolukrumlar 10-11 x 5-6 mm, uzantılar büyük ve dairesel alt yaprakları doğrusal segmentli pinnatifid, c. 1 mm genişliğinde, üstte seyrek örümcek benzeri, üst yapraklar basit, alt kısımlara benzer. Akenler 2,5–3,5 mm, pappus ise 3 mm’dir (Şekil 2.7)



Şekil 2. 7. *C. lycaonica* bitkisinin resmi (Fotoğraf: Osman TUGAY)

C. lycaonica türünün sistematikteki yeri;

Alem: Plantae

Bölüm: Magnoliophyta

Alt sınıf: Magnoliidae

Familya: Asteraceae

Cins: *Centaurea*

Tür: *C. lycaonica*

2.5. CENTAUREA TÜRLERİ ÜZERİNDE YAPILAN FARMAKOLOJİK ÇALIŞMALAR

İçerdiği zengin sekonder metabolitler sebebiyle dikkat çeken *Centaurea* türleri, bitkilerin tamamı kullanılarak veya içindeki maddeler izole edilerek çalışmalarda yer almaktadır. Aşağıda *Centaurea* türleri üzerinde yapılmış olan, antioksidan, antienflamatuvar, antibakteriyel, antimikrobiyal, anti-malaryal, sitotoksik, antiproliferatif ve yara iyileştirici *in vivo* ve *in vitro* farmakolojik çalışmalar listelenmiştir.

Bitkilerin antioksidan ve yara iyileştirme potansiyellerini araştıran bir çalışmada, *C. virgata*'nın etil asetat ekstresinin fibroblast hücrelerde antiproliferatif etkisi gözlenmiştir (IC₅₀: 138,7 µg/ml) ve etil asetat ekstresinin antioksidan kapasitesi diğer ekstrele göre en yüksek bulunmuştur. Bitkinin sulu etanol ekstresinin yara iyileştirici etkisi bulunmuştur (Aksoy, 2020). Keser ve ark. (2020) tarafından *C. kurdica* Reichardt, *C. virgata* Lam. ve *C. saligna* Wagenitz bitkilerinden elde edilen etanol, metanol, su ve aseton ekstrelerinin biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Sonuçlar, *Centaurea* türlerinin antimikrobiyal ve antiradikal etkilerini göz önüne sermiştir. Kullanılan bitki ekstrelerinin MCF-7, kolorektal karsinoma hücre hattı (HCT-116) ve insan prostat kanser hücre hattı (LNCaP) üzerinde antiproliferatif etkinliği yüksek bulunmuştur.

C. aphrodisia, *C. athoa*, *C. hyalolepis*, *C. iberica* Trev. ve *C. polyclada*'nın toprak üstü kısımlarının ekstrelerinden yapılan biyoaktivite çalışmasında, bitkilerin metanol ekstresinin antioksidan kapasitesinin olduğu gözlenmiştir. *C. polyclada*'nın, meme duktal karsinomu (BT-549), oral epidermal karsinom (KB) ve yumurtalık karsinomu (SK-OV-3) hücrelerinde en güçlü etkiye sahip olduğu bulunmuştur (sırayla IC₅₀: 30, 33 ve 47 µg/ml). *C. athoa* bitkisinin kloroform ekstresinin IC₅₀ değeri 6 µg/ml bulun ve bitkinin antienflamatuvar etkinliği yüksek olarak gözlenmiştir (Erel ve ark., 2014). Özbilgin ve ark. (2014) tarafından, *Plasmodium yoelii* ile enfekte edilmiş fareler üzerinde *in vivo* antimalaryal aktivite çalışması yapılmıştır. Çalışma, *C. lydia* ve *C. polyclada* bitki ekstrelerinin antimalaryal etkisi ile sonuçlanmıştır. Türkiye'de endemik bir tür olan *C. antiochia* Boiss. var. *praealta* (Boiss. & Bal.) Wagenitz üzerinde yapılan çalışmada, bitkinin antioksidan, antienflamatuvar ve antimikrobiyal etkinliği tespit edilmiştir (Özsoy ve ark., 2015).

C. spinosa'nın toprak üstü kısımları kullanılarak izole edilen 10 seskiterpen lakton ve 9 flavonoit grubunun *in vivo* sitotoksik ve antibakteriyel etkisi bulunmuştur (Saroglou ve ark., 2005). Forgo ve ark (2012) tarafından *C. jacea* bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait metanol ekstresinin meme kanseri (MCF-7) hücre hattında etkinliği değerlendirilmiş ve IC₅₀ 0,13 µM bulunmuştur. Antitümör aktivitenin flavonoit ve seskiterpen laktonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aboul-Soud ve ark.'nın (2022) yaptığı bir çalışmada, *C. calcitrapa*'ya ait etanol ekstresinin değişen konsantrasyonlarının etkinliği MCF-7 hücre hattında incelenmiştir. IC₅₀ değeri

127,63 µg/ml olarak bulunmuş ve ekstrenin apoptoz üzerinde artışa neden olduğu ortaya konmuştur.

Yıldırım ve ark (2022) tarafından *C. saligna* Wagenitz bitkisinin antiproliferatif, antioksidan ve antienflamatuvar etkinliği *in vitro* olarak incelemiştir. Bitkinin toprak üstü kısmından hekzan, etil asetat, kloroform, metanol ekstresi ve sulu metanol fraksiyonları elde edilmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 23,98, 32,39, 45,43, 41,05 ve 27,01 µg/ml şeklindedir. Bitkiye ait ekstrelerin IC₅₀ değeri düştükçe sitotoksik ve antiproliferatif etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Esmaeili ve ark (2021) tarafından *C. albonitens*'in sitotoksik aktivitesi kolon ve meme kanseri hücre hattında araştırılmıştır. Bitkiden elde edilen metanol ekstresine ait kloroform fraksiyonu deney için kullanılmıştır. IC₅₀ değeri 25,6 µg/ml ile ekstrenin sitotoksik ve antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir.

Lonergan ve ark.'ın (1992) çalışmasında, *C. sonchifolia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından ayrıştırılan onopordopikrin bileşiğinin sitotoksik etkisi incelenmiştir. İnsan deri kanser hücre hattında *in vitro* olarak yapılan çalışma sonucunda ED₅₀ değeri 0,85 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışma sonucuna göre, onopordopikrinin seskiterpen laktonlar gibi sitotoksik aktivitesinin olabileceği gözlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan deneyler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hadiye Kılıçer İnsan Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalar Laboratuvarı'nda bulunmakta olan cihazlar ve temin edilen gereçlerle gerçekleştirildi.

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Deneylerde aşağıda belirtilen cihazlar kullanıldı.

- Buzdolabı -20°C ve +2/+8°C: (Siemens)
- CO₂ İnkübatörü (Incu safe MCO-18AIC)
- Derin Dondurucu -80°C (Operon)
- Inverted Mikroskobu (Leica DM 2500)
- Laminar Akış Kabini (S Faster Elite class II A1/A2)
- Mikroplaka Okuyucu (Biotek Synergy HT)
- Orbital Çalkalayıcı (Biosan)
- Soğutmalı Santrifüj (Biosan)
- Santrifüj Cihazı (Universal 320 R)
- Sonikasyon Cihazı (United Jewelry Tool Supplies)
- Etüv (EcoCell)
- xCELLigence cihazı (Roche)
- Mikropipet ve multipipet 0,5-1 µl, 1-5 µl, 5-10 µl, 10-200 µl, 200-1000 µl (Eppendorf)
- Vorteks (Heidolph)

- Hassas Terazı (Adventurer Ohaus)
- Hücre sayım cihazı (Innovatis Cedex Xs)
- E-plaka (Roche 05 232 368 001)

3.2. KULLANILAN GEREÇLER

- Serolojik Pipet (10 ml, 25 ml) (Santa Cruz)
- Santrifüj Tüpü (15 ml ve 50 ml) (Santa Cruz)
- Düztabanlı, 6 Kuyucuklu Hücre Kültür Plağı (Santa Cruz)
- Düztabanlı, 96 Kuyucuklu Hücre Kültür Plağı (Santa Cruz)
- Eppendorf Tüp (0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml) (Isolab)
- Hücre Kazıyıcı (Greiner)
- Hücre Kültürü Uyumlu, T-75/T-125 cm² Flask (Greiner)
- Hücre sayım kartuşu (Roche)
- Kriyojenik Tüp (Biosigma)
- Membran Filtre (Millipore)
- Pipet Ucu (0.1-10, 10-200, 100-1000 µl'lik) (Expell)
- Eldiven (Dolphin)
- Enjektör 5 ml (Hayat)

3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

- BCA (bikinkoninik asit) protein deney kiti (Cell Signaling 7780)
- Sığır Serum Albümin (BSA) (Santa Cruz SC2323-50 g)
- Cedex Tripan Mavisi Solüsyonu (Roche 05 650 640 001-60 ml)
- Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Biological Industries 01-170-1A-500 ml)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma D8418- 250 ml)

- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biochrom S 0115-500 ml)
- MTT tuzu (Sigma-Aldrich 475989)
- Penicilin-streptomycine 10,000 ünite/ml Penisilin G Sodyum Tuzu, 10 mg/ml Streptomisin Sülfat (Biological Industries 03-031-1C-20 ml)
- Trypsin/EDTA (Sigma T4049-100 ml)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (AppliChem A9177-100 tablet)
- İnsülin (Sigma, I9278-5 ml)
- Kaspase-3 Elisa kiti (Sun Red Biotechnonology 20230721)
- Kaspase-9 Elisa kiti (Sun Red Biotechnonology 202307)
- Bax Elisa kiti (Sun Red Biotechnonology)
- Bcl-2 Elisa kiti (USCN, L230904376)

Besiyeri çözeltisi

50 ml besiyeri için;

- 0,005 mg/ml insülin (Sigma, I9278)
- %1 Penisilin-streptomisin (Biological Industries 03-031-1C)
- %10 FBS (Biochrom S 0115) içeren DMEM-F12 (Biological Industries 01-170-1A) çözeltisi hazırlandı.

MTT çözeltisi

Distile su ile 5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich 475989) stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stok çözelti membran filtreden süzülerek seyreltilip kullanıldı.

C. lycaonica boiss. & heldr. bitki ekstresi çözeltileri

Bitkiye ait CRD ve CRM, DMSO (Sigma D8418) ile on kat seyreltilerek konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler dilüe edilerek çeşitli konsantrasyonlarda kullanıldı.

3.4. KULLANILAN HÜCRE HATTI

Deneylerde endemik *C. lycaonica* Boiss. & Heldr. bitkisinin *in vitro* sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla RL95-2 hücreleri kullanıldı. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde -80°C derin dondurucuda (Operon) muhafaza edilen RL95-2 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve 0,005 mg/ml insülin içeren glutaminli DMEM-F12 ortamında çoğaltıldı.

Yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan kültürlerde hücrelerin büyümeye devam etmesi için hücre pasajı yapıldı. %70-80 oranına ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. İnkübatörden alınan hücrelerin besiyerleri aspire edildi. Hücrelerinin üzerine Tripsin/EDTA (Sigma T4049) solüsyonu eklendi. Tripsin/EDTA ile muamele edilen hücreler yüzeyden ayrılana kadar, 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde (Incu safe MCO-18AIC) 4-5 dk inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan hücreler ters mikroskop (Leica DM 2500) altında incelendi. Hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandıktan sonra, hücreler tripsinin iki katı olacak şekilde yeni besiyeri ile seyreltilerek tripsinin etkisi sonlandırıldı. Süspande halde bulunan hücreler santrifüj tüplerine (Santa Cruz) alındı. Santrifüj cihazında (Universal 320 R) 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Toplamda 7 ml olacak şekilde DMEM-F12 besiyeri içinde süspande edildikten sonra 75 cm²'lik flasklara (Greiner) ekildi. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

Hücre kültürü çalışmaları yaparken çoğalan hücreleri saklayıp tekrar kullanabilmek amacıyla dönem dönem hücre dondurma işlemi yapıldı. Bu amaçla flaskta ekili hücreler tripsin ile kaldırılıp kriyoprotektan madde olan DMSO' dan (Sigma D8418) %5 oranında eklenerek kriyotüplere (Biosigma) alındı ve -80°C'deki derin dondurucuya kaldırıldı.

Hücreleri çözdürme aşamasında ise -80°C'de dondurulmuş RL95-2 hücrelerinin bulunduğu kriyotüpler çıkarılır çıkarılmaz 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü. Çözünen hücreler laminar akış kabini (S Faster Elite class II A1/A2) altında, DMEM-F12 besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm, 25°C'de 5 dk santrifüj edildi ve üzerindeki süpernatant aspire edildi. Alt fazda kalan hücreler besiyeri içinde çek bırak yöntemiyle süspande edildikten sonra 75 cm² lik flasklara ekildi ve mikroskop

altında incelendi. 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde kültüre edildi. 2 gün ara ile mikroskop altında hücre canlılığı incelendi ve ortamları değiştirildi.

3.5. HÜCRE SAYIMI

Yapılan deneylerde kullanılacak olan hücrelerin yoğunluğunu tespit etmek amacıyla hücre sayımı yapıldı. Çalışmamızda hücre sayımı ve hücre canlılığını ölçmek için tripan mavisi (Roche 05 650 640 001) yöntemi kullanıldı. Yöntem için hücre sayım cihazı (Innovatis Cedex Xs) kullanıldı (Şekil 3.1).

İlk defa Paul Ehrlich tarafından 1904 yılında sentezlenen tripan mavisi boyası, hücre canlılığını belirlemekte sıklıkla kullanılan bir boyadır. Yöntem boyanın membran bütünlüğü bozulmuş hücre duvarından geçerek ölü hücrelerin boyanması esasına dayanır. Bu şekilde hücre canlılık oranı ve hücre miktarı tespit edilir (Strober, 2001).

Yeterli hücre yoğunluğuna gelen kültürler hücre pasajlamada bahsedildiği şekilde tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Flasktan kaldırılan ve santrifüj edilen hücreler temiz besiyeri içinde süspande edildi. 1:10 oranında tripan mavisi ile seyreltilerek karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alınarak sayım kartuşu (Roche) üzerine eklendi. Cihaz üzerinde dilüsyon faktörü 1:10 seçildikten sonra hücre yoğunluğu elde edildi.



Şekil 3.1. Hücre sayım cihazı

3.6. EKSTRE HAZIRLANMASI

Çalışmada kullanılan *C. lycaonica* bitki ekstresi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi ABD, Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA danışmanlığında Deneylerde kullanılan endemik *C. lycaonica* türünün kök kısımları temmuz ayı 2022 yılında Konya civarından toplanarak gölgeli ve havalandırılmış ortamda kurutuldu. Tez çalışması kapsamında, bitkisel materyalden apolar bileşikleri daha yoğun şekilde elde etmek amacıyla 24 sa. süreyle maserasyon yöntemiyle önce diklorometan ekstresi hazırlandı. Daha sonra diklorometan ekstresinden metanolla partiyon yöntemiyle metanol ekstresi elde edildi. Ekstre elde edildikten sonra süzgeç kâğıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntü çözücüsü rotavaporda 38°C’de düşük basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen ekstre liyofilize edilerek çalışma anına kadar -20°C’de korunarak saklandı.

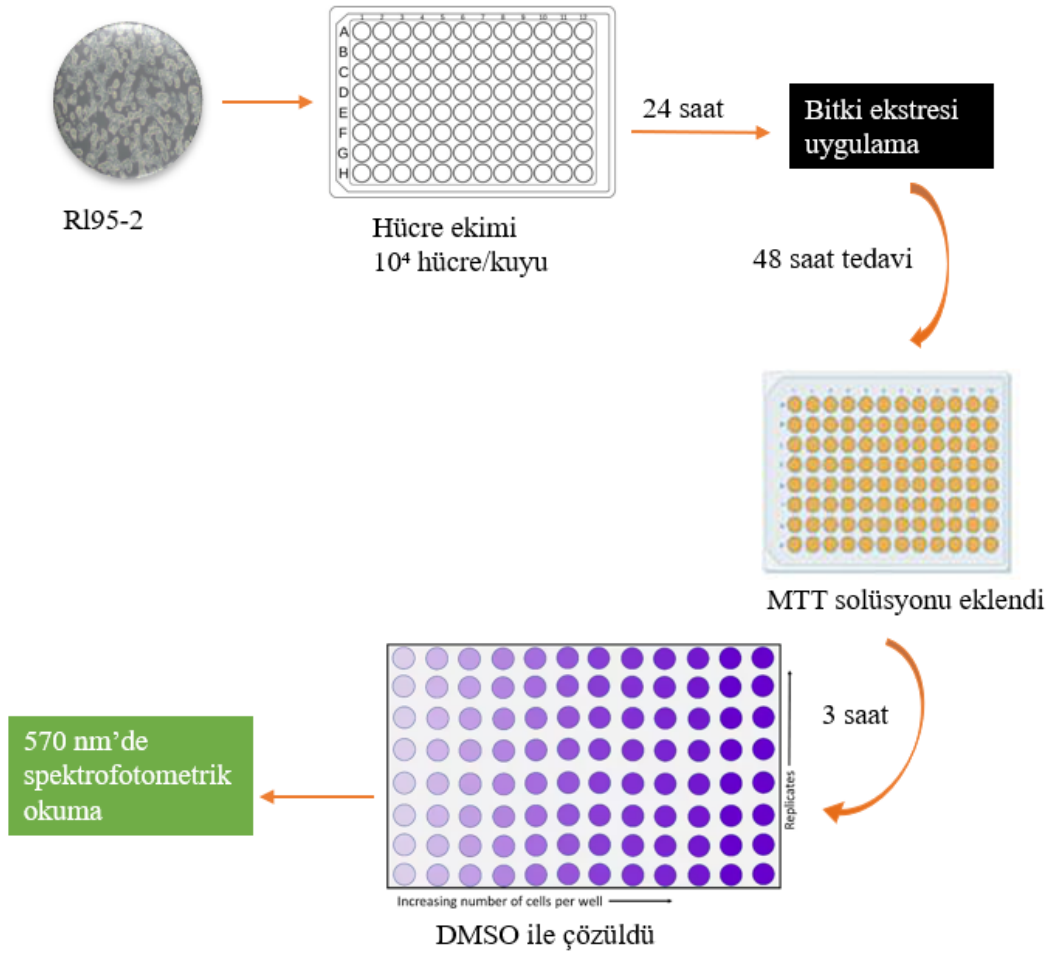
3.7. MTT HÜCRE CANLILIK DENEYİ

Mitokondriyal aktivite ölçümü esasına dayanan MTT, sitotoksik bir ölçüm yöntemidir. Bileşiklerin potansiyel antikanser ve sitotoksik etkinliğini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla ilk defa Mosmann (1983) tarafından tanımlanmıştır. Hücre membranını geçen ve başlangıçta sarı renkli olan tetrazolyum tuzu, aktif mitokondriye sahip canlı hücre tarafından mor renkli formazan kristaline indirgenir (Şekil 3.2). İndirgenme reaksiyonu ve dolayısıyla renk değişim olayı sadece canlı hücrelerde meydana gelmektedir.



Şekil 3.2. MTT bileşiğinin formazana indirgenmesi

MTT ile yapılan sitotoksisite testleri üç basamakta meydana gelmektedir. İlk basamakta hücrelerin test edilecek bir madde ile maruziyeti gerçekleştirilir. Daha sonra test maddesi ortamdan uzaklaştırılır ve hücreler MTT solüsyonu ile 1 ila 4 sa. inkübasyona bırakılır. Son olarak hücrelerde meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda ölçülür ve hücre canlılığı kontrol grup ile karşılaştırılarak değerlendirilir. Ölçüm sonucu gözlenen absorbans, MTT konsantrasyonu, kullanılan hücrenin tipi, canlı hücrelerin sayısı ve mitokondriyal aktivitesi, besi yeri içeriği ve pH'ı, plakanın kuyucuk yapısı gibi değişkenlerle ilişkilidir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. MTT protokolü

C. lycaonica boiss. & heldr. bitkisinin RL95-2 hücre hattı üzerindeki sitotoksik/apoptotik etkisinin tayini, MTT hücre canlılık testi ile incelenmiştir.

1. gün; kültürdeki yapışık halde bulunan hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutularak kaldırıldı. Hücreler tripan mavisi yöntemi ile hücre sayımında anlatıldığı gibi sayıldı. Sayımı tamamlanan hücreler, çok kanallı pipet (Eppendorf) vasıtasıyla, kuyucuk başına 10⁴ hücre olacak şekilde 100 µl 96- kuyucuklu düztabanlı hücre plakalarına (Santa Cruz) ekildi. 37°C'de %5 CO₂ ortamında 24 sa. boyunca inkübasyona bırakıldı.

2. gün; stok olarak hazırlanmış *C. lycaonica* boiss. & heldr. bitki ekstresi (100 mg/ml) vortek cihazında (Heidolph) vortekslenerek konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde FBS'siz besiyeri ile dilüe edildi. Steril 1,5 ml'lik eppendorf tüpler ile konsantrasyonu 1 mg/ml olan stoktan besiyeri ile dilüsyon serisi hazırlandı.

Ekstrelerin son konsantrasyonları 10, 15, 30, 100, 180 µg/ ml olacak şekilde hazırlandı. İnkübatörden çıkarılan hücrelerin üzerine hazırlanan dilüsyon serisinin her birinden 25 µl alınarak eklendi. Plakalar 48 sa. boyunca inkübasyona bırakıldı.

3. gün; laminar akış kabini içerisinde 5 mg/ml MTT stok çözeltisi hazırlandı. Son konsantrasyon 0,5 mg/ml olacak şekilde besiyeri ile seyreltildi. Plakadaki besiyeri aspire edildi. Hazırlanan MTT solüsyonu, çok kanallı pipet ile kontroller dahil her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 37°C'de %5 CO₂ ortamında 4 sa. süre ile inkübasyona bırakıldı. 4 sa. sonra plakaların üzerindeki medyum atıldı ve mor renkli formazan kristalinin çözünmesini sağlamak amacıyla her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Plakalar orbital çalkalayıcıya (Biosan) konuldu. Ardından mikropilaka okuyucu (Biotek Synergy HT) ile 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbansları okundu. Yüzde canlılık şu şekilde hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = \text{Deney grubunun absorbansı} / \text{Kontrol grubunun absorbansı} \times 100$$

GraphPad ve Prism 8.3.0 yazılımları aracılığıyla canlılık eğrisi ve IC₅₀ değerleri belirlendi.

3.8. GZHA CANLILIK DENEYİ

GZHA, biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı ve elektronik olarak tespit edilmesi esasına dayanan bir sistemdir. İlk kez 2008 yılında kullanılan bu yöntem hücrelerdeki yapışma, büyüme, çoğalma ve morfolojik durumların etiketsiz ve boyasız, gerçek zamanlı ve sürekli izlenmesine olanak tanır. Bu sistemde altı mikro elektrotlarla kaplanmış kuyucuklara sahip e-plaka kullanır. Elektronların ve iyonların sensör yüzeylerinden geçişi hücre veya moleküllerin özelliklerindeki değişikliklerden etkilenir. Hücrelerin empedans üzerinde oluşturduğu değişiklik ölçüm yapılmasını sağlar ve bu ölçüm Hücre İndeksi (CI) değeri olarak ifade edilir. Dolayısıyla CI, zamanın bir fonksiyonu olarak değişebilen genel hücre sayısının, yapışma kalitesinin ve hücre morfolojisinin bir yansımasıdır. Sistemin çalıştırıldığı tüm süre boyunca veriler üretilir ve toplanır. Deneyin herhangi bir zamanında test edilen bir bileşiğin hücreler üzerindeki etkisi değerlendirilebilir (Giaever ve Keese, 1993; Keogh, 2010).

Bu çalışmada, CRM ve CRD'nin RL95-2 hücre hattındaki potansiyel antikanser aktivitesini gerçek zamanlı ölçmek ve IC₅₀ değerlerinin hesaplamak amacıyla xCELLigence GZHA sistemi (Roche) kullanıldı.

Besiyerinde çoğaltılan RL95-2 hücreleri, 96 kuyulu e-plakaya (Roche 05 232 368 001) 10⁴ hücre/kuyu şeklinde ekildi ve plaka cihaza yerleştirildi. 24 sa. boyunca sistemde tutulan hücrelerin üzerine deney grupları uygulandı. 72 sa. izleme süresinin sonunda IC₅₀ değeri xCELLigence yazılım programı ile hesaplandı ve sitotoksosite gözlenen en uygun konsantrasyon ve sa. belirlendi.

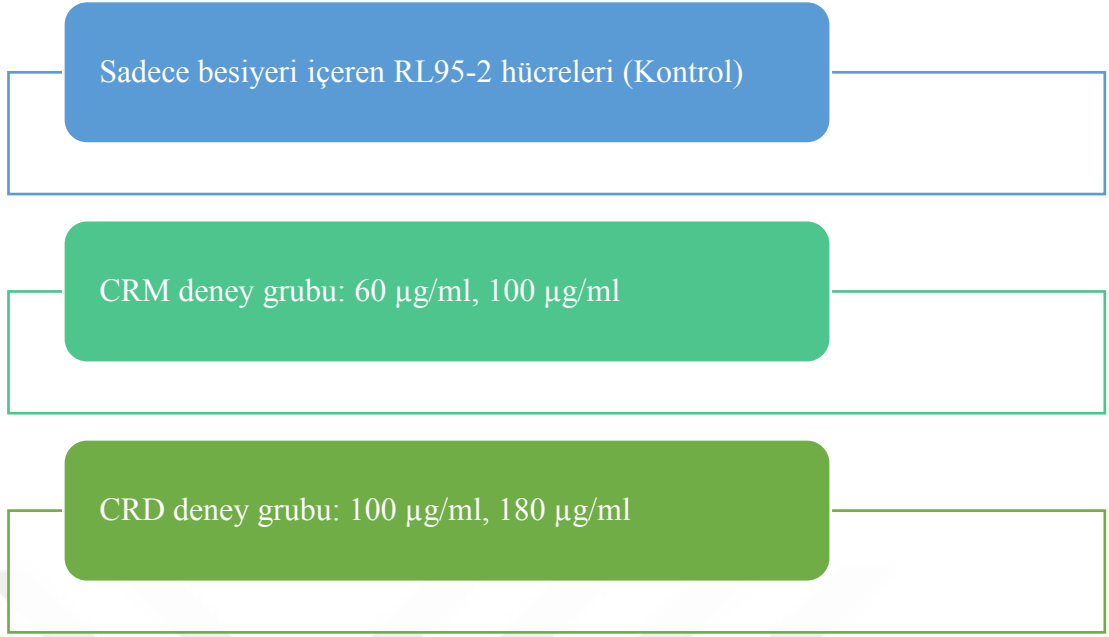
IC₅₀ değerlerini belirlemek için deney grupları

Kontrol ve deney gruplarının değişken konsantrasyonları genel konsantrasyon tarama ile belirlendi. Sonuçlara göre, konsantrasyon aralığını daraltmak ve IC₅₀ değerlerini hesaplamak için yeni konsantrasyonlar belirlendi. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 deney kitleri için kullanılacak konsantrasyonlar literatür bilgisine göre doğrulandı. Konsantrasyonların sitotoksitesitesi MTT ve GZHA yöntemleri ile belirlendi.



3.9. DENEY GRUPLARI

ELISA deneylerinde kullanılacak konsantrasyonlar aşağıdaki gibi belirlendi ve 5 farklı deney grubu oluşturuldu.



3.10. PROTEİN İZOLASYONU

ELISA deneylerinde kullanılmak üzere protein izolasyonu işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla 6'lı plakalara (Santa Cruz) her kuyuda 10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin yüzeye tutunmasının ardından besiyeri uzaklaştırıldı ve deney grupları her kuyuya 1 ml olacak şekilde uygulandı. 48 sa. bekleme süresinin sonunda protein izolasyonu işlemi yapıldı. Bu aşamada proteinlerin denatüre olmasını engellemek amacıyla soğuk ortamda çalışıldı. Plakada bulunan hücreler 500 µl PBS (AppliChem A9177) ile ikişer kez yıkanarak kazıyıcı (Greiner) ile kazıma işlemi yapıldı. 10 dk 4°C 1000 rpm'de santrifüj (Biosan) edildikten sonra (Şekil 3.4) süpernatant atıldı ve pellet üzerine 50-100 µl hücre lizis tamponu ilave edildi. 2 ml'lik tüplerde toplanan hücreler hücre membranını parçalamak amacıyla sonikasyon cihazında (United Jewelry Tool Supplies) sonike edildi. Sonikasyonu tamamlanan hücreler 10 dk 4°C 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı ile devam edildi. Elde edilen lizat içeriğindeki protein miktarı BCA test kiti (Cell Signaling 7780) ile tayin edildi. Lizatlar daha sonra kullanılmak üzere -80 °C dondurucuda saklandı.



Şekil 3.4. Soğutmalı santrifüj cihazı

3.11. BCA KİTİ İLE PROTEİN TAYİNİ DENEYİ

BCA protein tayin metodu; BCA solüsyonu ile elma yeşili renk alan bakır sülfatın protein varlığında indirgenerek mor renge dönüşmesi esasına dayanır. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 562 nm’de ölçülür ve protein konsantrasyonu tespit edilir (Sapan ve ark., 1999).

BCA testinde standart olarak 2 mg/ml sığır serum albümini (BSA) kullanılmaktadır. Stok BSA çözeltisinden tabloda gösterildiği şekilde dilüsyon serisi hazırlandı (Tablo 3.1). Çalışma Reaktifini hazırlamak amacıyla BCA Reaktif A ve BCA Reaktif B 50:1 oranında karıştırıldı ve vortekslendi. Her kuyucuğa iki tekrarlı olmak üzere 9 µl standart BSA ve hazırlanan lizat örneklerinden eklendi. Örnek gruplarının üzerine 4 µl uyumluluk reaktifi eklendi. Yaklaşık 1 dk çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 15 dk inkübe edildi. Daha sonra her kuyuya 2 ml çalışma reaktifi eklendi ve çalkalandı. 30 dk 37°C’de bekleme süresi dolan hücreler 5 dk oda sıcaklığında soğutuldu. 562 nm’de ölçülerek protein miktarı belirlendi ve her örneğin protein konsantrasyonu eşitlenecek şekilde gerekli hesaplamalar yapıldı.

Tablo 3 1. Seyreltilmiş albümin (BSA) standartlarının hazırlanması

	Seyreltici (µl)	BSA (µl)	Son konsantrasyon (mg/ml)
A	0	300 stok	2
B	325	325 stok	1
C	325	325 şişe B	0,500
D	325	325 şişe C	0,250
E	325	325 şişe D	0,125

3.12. KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX VE BCL-2 TAYİN DENEYLERİ

Bu tez çalışmasında, RL95-2 hücre hattında CRD ve CRM ekstrelerinin apoptotik proteinler üzerindeki etkinliği değerlendirmek amacıyla ELISA kiti üzerinde çalışıldı. ELISA testi, antijen-antikor kompleksi üzerine enzim işaretli antiglobulin ve substratın eklenmesi ile çalışır. Çalışılan örnek antikor veya antijen içeriyorsa renk değişimi gözlenir. Spesifik protein tayinine olanak veren, duyarlı ve hızlı bir yöntemdir (Salgame ve ark., 1997).

Çalışma kapsamında, Kaspaz-3 (SRB, 20230721), Kaspaz-9 (SRB, 202307), Bax (SRB, 202307) ve Bcl-2 (USCN, L230904376) ELISA test kitleri kullanıldı.

Yıkama solüsyonu hazırlanması:

Yıkama aşamasında kullanılacak olan solüsyon, her kuyu 3 kez 300 µl yıkanacak şekilde hazırlandı. Kitte bulunan yıkama solüsyonu 1:30 oranında distile su ile seyreltilti.

Standart hazırlama:

Standart solüsyonlar, her kitin prosedürüne göre 6 farklı konsantrasyonda dilüsyon serisi şeklinde hazırlandı.

Deney protokolü:

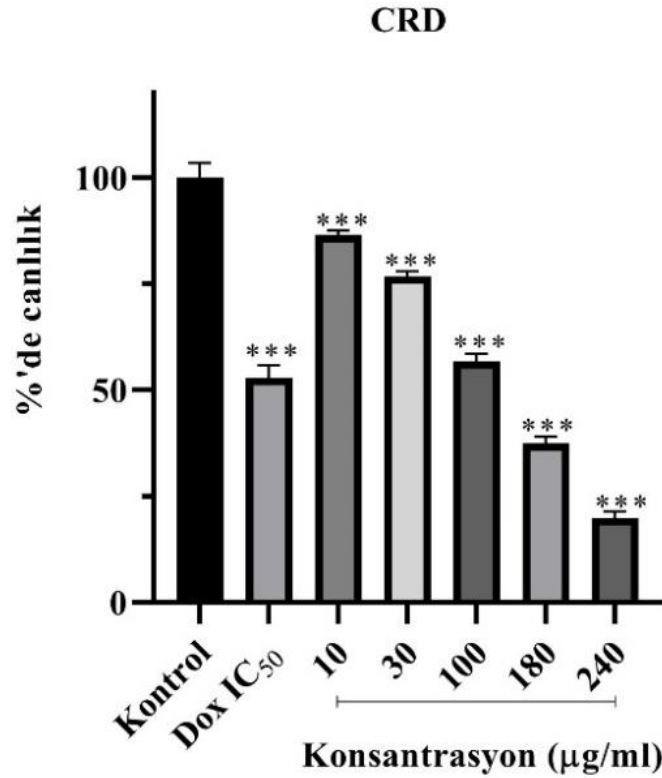
- Kuyulara ikiye tekrarlı olarak 50 µl standart solüsyonu eklendi.

- Örnek grupları her birinin total protein konsantrasyonu aynı olacak şekilde kuyulara eklendi.
- Standart ve örnek gruplarının olduğu kuyulara her test kitinin kendine ait antibody solüsyonu ve Streptavidin-HRP solüsyonu uygulandı.
- Üzeri ışık geçirmez membran ile kapatılan kit yavaşça çalkalama işlemi yapılarak 60 dk boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.
- Bekleme süresinin ardından kit üzerindeki solüsyonlar uzaklaştırıldı ve kuyu tabanları üçer kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Her bir kuyu üzerine 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B solüsyonu uygulandı ve çalkalama işlemi sonra 10 dk ışıktan uzak ortamda inkübe edildi.
- 50 µl durdurma solüsyonun eklenmesinin ardından sarıya dönen renk 450 nm’de mikropłaka okuyucuda okundu.

4. BULGULAR

4.1. MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

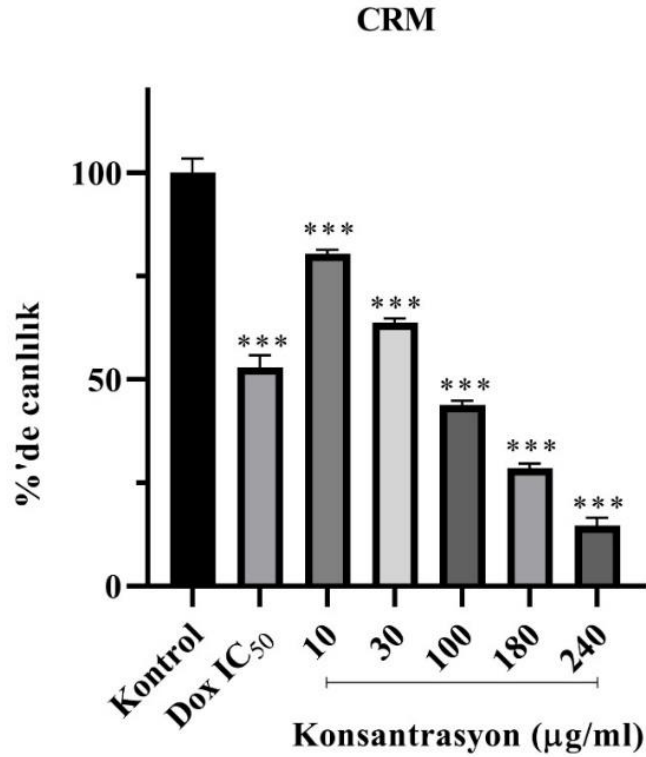
RL95-2 hücreleri üzerinde sitotoksite tayini amacıyla dox, CRD ve CRM uygulaması yapıldı. 48 sa.'lik tedavinin ardından MTT yöntemi ile hücre canlılığı tespit edildi.



Şekil 4. 1. CRD'nin RL95-2 üzerindeki % hücre canlılığı

(GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CRD: *C. lycanica* radix diklorometan ekstresi, Dox IC₅₀: Hücrelerin yarısını öldüren doksorubisin miktarı 6,19 µM)

10, 30, 100, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanan CRD'nin RL95-2 hücre hattı üzerindeki yüzde canlılık oranı Şekil 4.1'de verildi. Pozitif kontrol olarak literatürde 48 sa. uygulama ile Pandey ve ark. (2010) tarafından IC₅₀ değeri 6,19 µM tespit edilen dox uygulandı. Şekilde verilen değerlere göre, MTT testi sonucunda CRD'nin RL95-2 üzerinde konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. 10 µg/ml ve 30 µg/ml CRD konsantrasyonunun kontrole kıyasla hücre canlılığını azda olsa etkilediği ve 30 µg/ml canlılığı yüzde 76,79 oranına düşürdüğü görüldü. 100, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında canlılık oranı sırası ile 56,87; 37,40 ve 19,49 şeklinde gözlemlendi ve bu konsantrasyonlarda sitotoksik etki oluşturduğu tespit edildi. Elde edilen MTT sonuçlarına göre, CRD'ye ait IC₅₀ değeri 98,78 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).



Şekil 4. 2. CRM'nin RL95-2 üzerindeki % hücre canlılığı

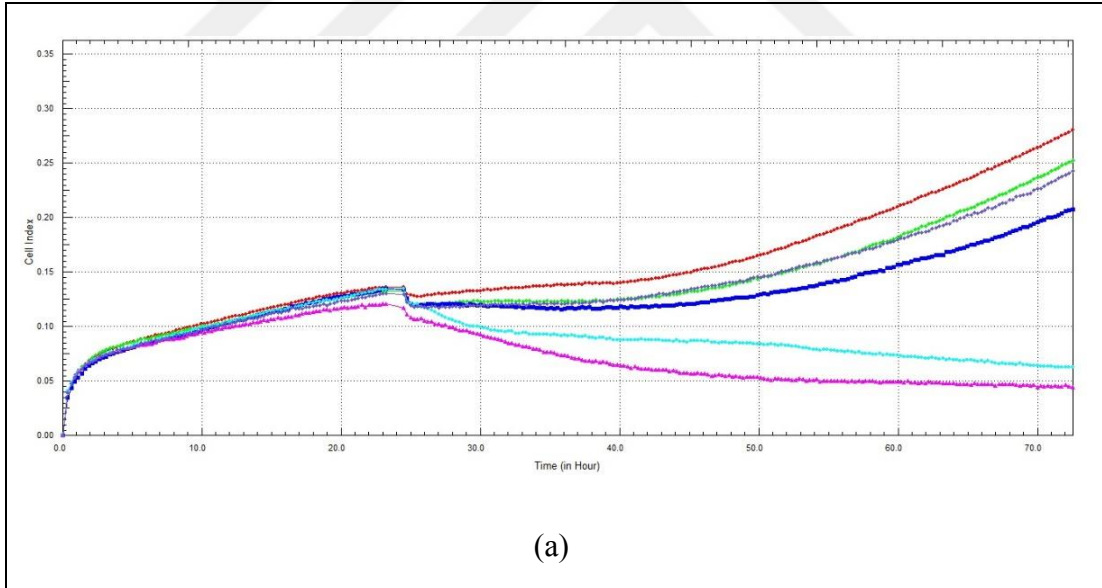
(GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CRM: *C. lycaonica* radix metanol ekstresi, Dox IC₅₀: Hücrelerin yarısını öldüren doksorubisin miktarı 6,19 µM)

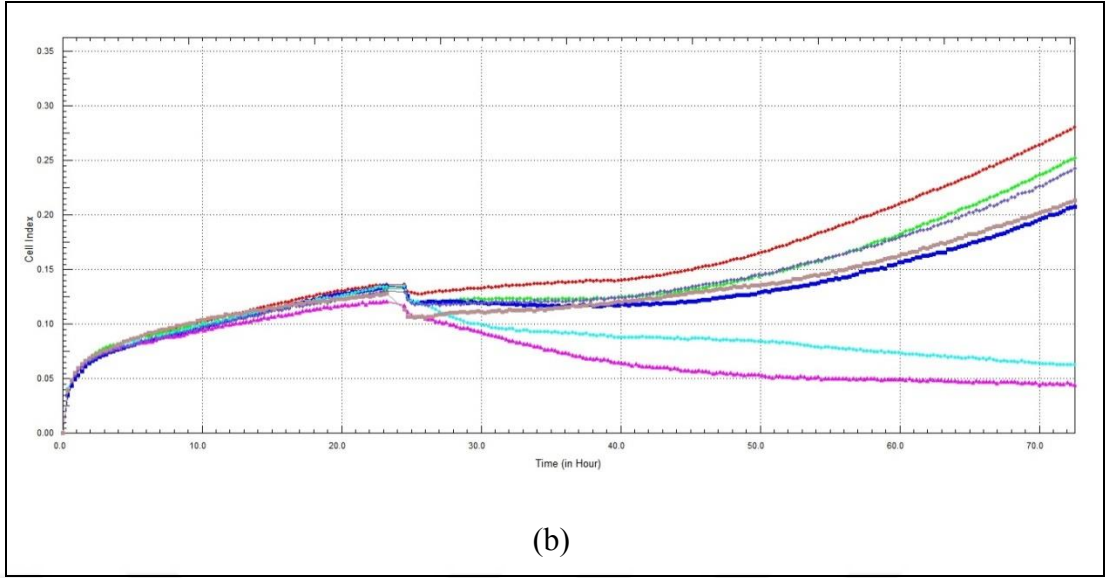
10, 30, 100, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında uygulanan CRM ve pozitif kontrol olarak kullanılan literatürde 48 sa. uygulama ile IC₅₀ değeri 6,19 µM (Pandey

ve ark., 2010) tespit edilen dox uygulamasının RL95-2 hücre hattı üzerindeki yüzde canlılık oranı Şekil 4.2’de verildi. 10 µg/ml ekstre uygulaması ile % 80,44’e düşen hücre canlılığının 30 µg/ml konsantrasyonunda yüzde 63,75 altına düştüğü tespit edildi. 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığı 25-45 aralığında seyretti. 240 µg/ml konsantrasyonda ise en yüksek aktivite göstererek hücre canlılığını yüzde 14,66’ya altına düşürdü. 30, 100, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında canlılık yüzde 70’in altına düşerek anlamlı sitotoksik aktivite gösterdi. Verilere göre artan konsantrasyonla birlikte hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı görüldü. Deney sonuçlarına göre CRM’ye ait IC₅₀ değeri 60,02 µg/ml şeklinde hesaplandı (Tablo 4.1).

4.2. GZHA BULGULARI

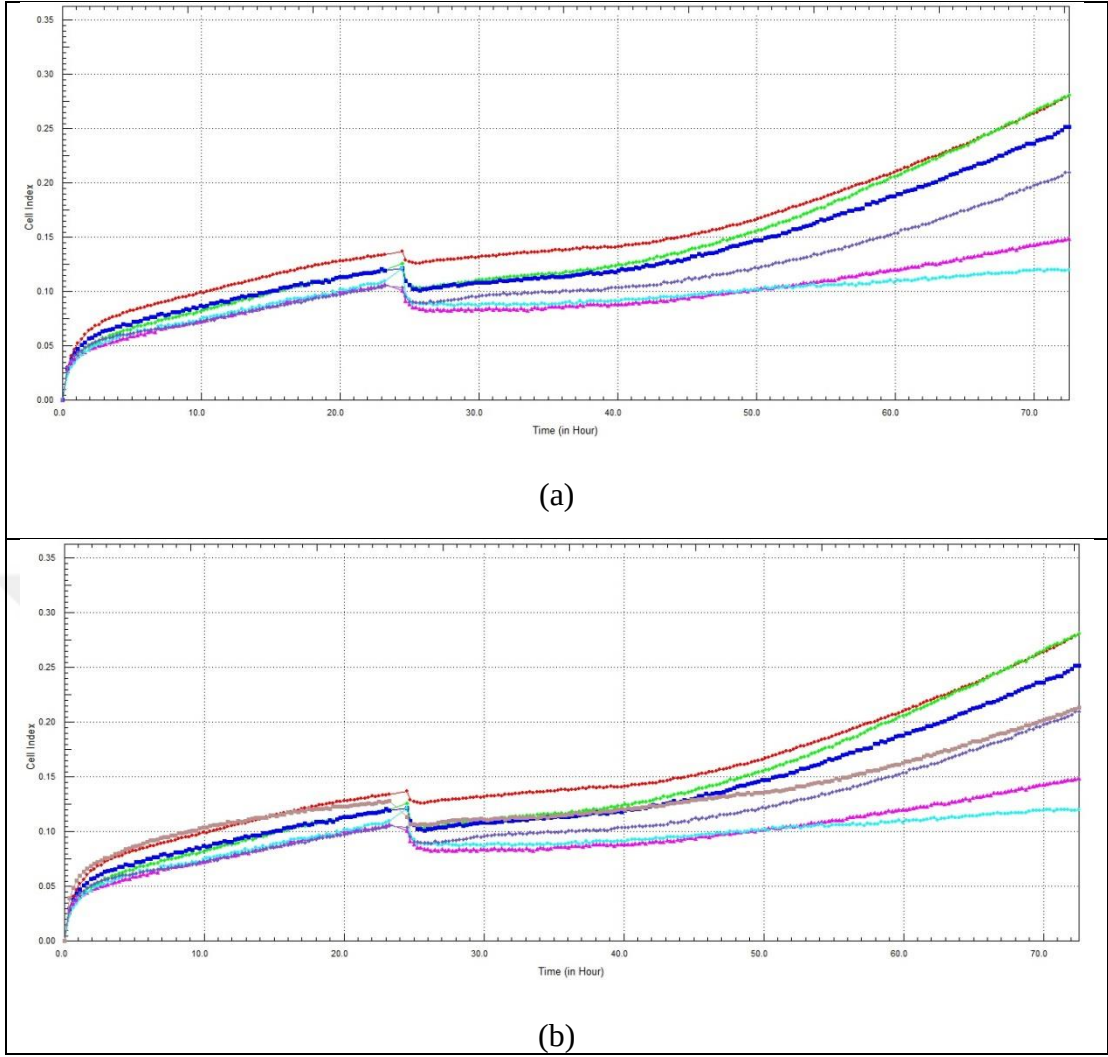
MTT deneyi ile hesaplanan hücre canlılığının teyiti ve canlılıktaki değişimlerin gerçek zamanlı tayini amacıyla CRD, CRM ve dox ile xCELLigence deneyi yapıldı.





Şekil 4. 3. a: CRD ekstresinin RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.'deki etkisi. b: CRD ekstresinin ve Dox'un RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.'deki etkisi. (Kırmızı: Kontrol, Yeşil: 10 µg/ml, Mor: 30 µg/ml Kahverengi: Dox 6,19 µM Lacivert: 100 µg/ml, Turkuaz: 180 µg/ml, Pembe: 240 µg/ml. CRD: *C. lycaonica* radix diklorometan ekstresi, Dox: Doksorubisin.)

RL95-2 üzerinde CRD'nin 48 sa.'deki hücre canlılığı Şekil 4.3'de verildi. CRD'nin 48 sa. sonunda kontrole kıyasla konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. 10, 30 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında hücre sayısında anlamlı bir azalma görüldü. 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında ise düşük hücre canlılığı ile yüksek sitotoksik aktivite bulundu. Dox'un RL95-2 üzerindeki etkisi Şekil 4.3.(b)'de verildiği üzere kontrole kıyasla canlılıkta azalma olduğu tespit edildi. 10 ve 30 µg/ml CRD uygulamasının dox'a kıyasla daha az hücre ölümüne sebep olduğu, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonunun ise daha yüksek hücre ölümü ile sonuçlandığı tespit edildi. 100 µg/ml konsantrasyonunun dox ile benzer hücre canlılığı gösterdiği bulundu. Elde edilen sonuçlar MTT ile uyumlu bulundu. CRD'nin 48 sa. IC₅₀ değeri 139,54 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).



Şekil 4. 4.a: CRM ekstresinin RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.’deki etkisi. b: CRM ekstresinin ve Dox’un RL95-2 üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı xCELLigence GZHA sistemi ile 48 sa.’deki etkisi. (Kırmızı: Kontrol, Yeşil: 10 µg/ml, Lacivert: 30 µg/ml, Kahverengi: Dox 6,19 µM, Mor: 100 µg/ml, Pembe: 180µg/ml, Turkuaz: 240 µg/ml. CRM: *C. lycaonica* radix metanol ekstresi, Dox: Dokсорubisin.)

RL95-2 üzerinde CRM’nin 48 sa.’deki hücre canlılığına etkisi Şekil 4.4’te verildi. CRM’nin 48 sa. sonunda kontrole kıyasla konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. 30 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında hücre sayısında anlamlı bir azalma görüldü. 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonlarında ise hücre canlılığının aşağı doğru eğimi ile yüksek sitotoksik aktivite bulundu. 10 µg/ml CRM uygulaması ile kontrole kıyasla anlamlı bir azalma bulunamadı. Dox’un RL95-2 üzerindeki etkisi Şekil 4.4.(b)’de gösterildi. Uygulanan dox konsantrasyonunun kontrole kıyasla hücre canlılığını düşürdüğü tespit edildi. 10 ve 30 µg/ml CRM uygulamasının dox’a kıyasla daha az hücre ölümüne sebep olduğu, 180 ve 240 µg/ml

konsantrasyonunun ise daha yüksek hücre ölümü ile sonuçlandığı tespit edildi. 100 µg/ml konsantrasyonunun dox ile benzer hücre canlılığı gösterdiği bulundu. Elde edilen sonuçlar MTT ile uyumlu bulundu. CRM'nin 48 sa. IC₅₀ değeri 94,88 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. CRD ve CRM'ye ait MTT ve xCELLigence IC₅₀ değerleri

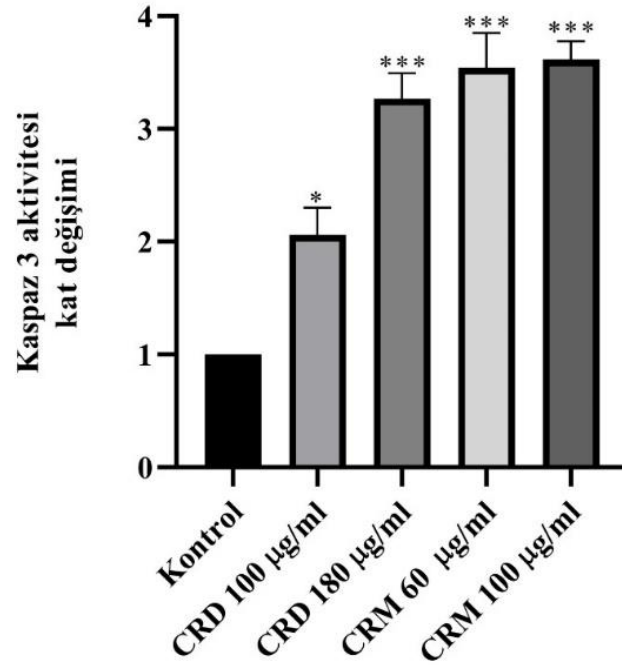
Yöntem	Ekstre	IC ₅₀ (µg/ml)
MTT	CRD	98,78
	CRM	60,02
xCELLigence	CRD	139,54
	CRM	94,88

4.3. BCA PROTEİN TAYİNİ DENEYİ

Hücrelerden elde edilen protein içeriğini öğrenmek amacıyla BCA testi yapıldı. BCA deneyinde kullanılan konsantrasyonlar Tablo 4.1.'de verilmekte olan MTT ve xCELLigence deneylerinde bulunan IC₅₀ değerlerine göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre tüm örneklerin son protein konsantrasyonu 25 µg/µl olacak şekilde gerekli hesaplamalar yapıldı ve ELISA kitlerinde kullanıldı.

4.4. KASPAZ-3 TAYİNİ BULGULARI

RL95-2 hücre hattı üzerinde kullanılan bitki ekstralarının apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Kaspaz-3 (SRB, 20230721) ELISA test kiti kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



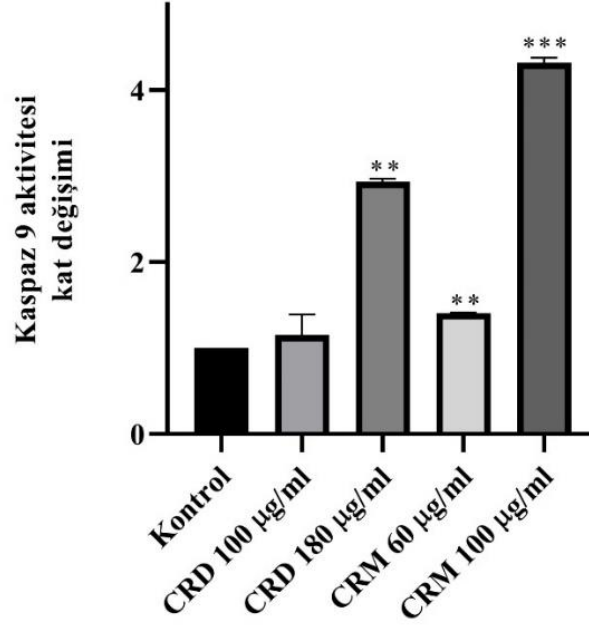
Şekil 4. 5. RL95-2 üzerinde Kaspaz-3 aktivitesi kat değişimi

(GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CRD: *C. lycaonica* radix diklorometan ekstresi, CRM: *C. lycaonica* radix metanol ekstresi)

CRD ve CRM'nin RL95-2 üzerindeki kontrole kıyasla Kaspaz-3 aktivite değişimi Şekil 4.5.'te verilmiştir. CRD 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarında Kaspaz-3 değerinin kontrole kıyasla sırasıyla 2,06 ve 3,27 kat arttığı gözlemlendi. CRM 60 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında ise değerlerin sırası ile 3,57 ve 3,62 kat arttığı bulundu. Her iki ekstrenin de kendi içinde kontrole göre Kaspaz-3 değerini anlamlı olarak artırdığı ve konsantrasyon değişimine orantılı bir şekilde yükseliş meydana getirdiği görüldü. Ekstreler arasında CRM'deki artışın daha anlamlı olduğu tespit edildi.

4.5. KASPAZ-9 TAYİNİ BULGULARI

RL95-2 hücre hattı üzerinde kullanılan bitki ekstraktlarının apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Kaspaz-9 (SRB, 202307) ELISA test kiti kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



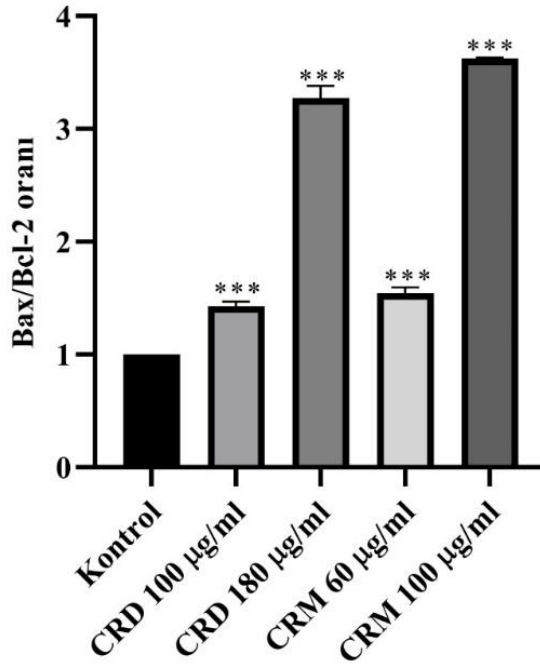
Şekil 4. 6. RL95-2 üzerinde Kaspaz-9 aktivitesi kat değişimi

(GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CRD: *C. lycaonica* radix diklorometan ekstresi, CRM: *C. lycaonica* radix metanol ekstresi)

CRD ve CRM'ye ait kontrole kıyasla Kaspaz-9 aktivite değişimi Şekil 4.6'da verildi. CRD 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarının Kaspaz-9 aktivitesini sırası ile 1,15 ve 2,94 kat artırdığı bulundu. CRM 60 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki Kaspaz-9 değişimi ise sırası ile 1,41 ve 4,32 şeklinde bulundu. CRM uygulamasının artışı kendi içinde anlamlı olmakla birlikte konsantrasyona bağımlı bir şekilde yükseliş gösterdi. CRD 180 µg/ml konsantrasyonunda anlamlılık gözlenirken CRD 100 µg/ml'de anlamlı bir artış bulunamadı. Her iki ekstreden CRM daha yüksek Kaspaz-9 aktivitesi gösterdi ve en yüksek aktivite CRM 100 µg/ml'de gözlemlendi.

4.6. BAX/BCL-2 BULGULARI

RL95-2 hücre hattı üzerinde kullanılan bitki ekstralarının apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Bax (SRB, 202307) ve Bcl-2 (USCN, L230904376) ELISA test kitleri kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



Şekil 4. 7. RL95-2 üzerinde Bax/Bcl-2 oranı

(GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve post-hoc Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; **<0,01 ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CRD: *C. lycaonica* radix diklorometan ekstresi, CRM: *C. lycaonica* radix metanol ekstresi)

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen Bax ve Bcl-2 aktiviteleri birbirine oranlandı ve kontrole kıyasla değişimleri Şekil 4.7.'de verildi. Verilere göre tüm sonuçlarda anlamlı olarak artış gözlemlendi. Ekstrelerde konsantrasyon arttıkça Bax/Bcl-2 oranının yükseldiği görüldü. CRD 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarında oran kontrole kıyasla sırasıyla 1,43 ve 3,27 kat arttı. CRM 60 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında ise 1,55 ve 3,63 kat artış görüldü. İki ekstre arasında CRM'deki artış daha anlamlı bulundu.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, sitotoksik ve apoptotik aktivite çalışmasında kullanılmak üzere endometriyum kanser çalışmalarında kullanılan RL95-2 hücreleri kültüre edildi ve Türkiye’de endemik olarak yetişen *C. lycaonica* türünün kök kısmına ait dikloromeran ve metanol ekstraktları elde edildi. Ekstrelerin RL95-2 hücre hattındaki potansiyel sitotoksitesisi MTT testi ve hücre profili xCELLigence GZHA sistemi kullanılarak ortaya koyuldu. Apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla apoptoz yolağında görev alan Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin tayini ELISA kiti ile ölçüldü.

Kadınlarda yaşamı ciddi oranda etkileyen endometriyum kanserinde tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması ve yan etkilerinin sıklığı yeni ve etkin tedavi olarak bitkisel hammaddelere talebi artırmaktadır. *Centaurea* türlerinin kanser tedavisinde sitotoksik ve apoptotik etkinliğe sahip olması sebebiyle bu amaçla kullanılacağına dair çalışmaların sıklığı artmaktadır. Çeşitli *Centaurea* türlerine ait ekstraktlar ve bunlardan elde edilen bileşikler tedavi edici olarak kullanılmaktadır. *Centaurea* türlerinin yara iyileştirme (Aksoy, 2020), antimikrobiyal (Keser ve ark., 2020), antienflamatuar (Erel ve ark., 2014), antimalaryal (Özbilgin ve ark., 2014), antibakteriyel (Saroglou ve ark., 2005) ve antioksidan (Özsoy ve ark., 2015) özellikleri olduğu bilinmekte ve üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Antikanser etkinliğin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, Türkiye’de endemik bir bitki olan *C. drabifolia* subsp.’den elde edilen seskiterpen laktonların lösemi hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve güçlü aktivite bulunmuştur (Formisano ve ark., 2017). Bunun dışında, *Centaurea* türlerinden *C. kurdica* Reichardt, *C. virgata* Lam., *C. saligna* Wagenitz ve *C. fenzlii*’nin kolorektal (Keser ve ark.,2020; Şimşek Sezer, 2022), *C. albonitens*’in kolon (Esmaeili ve ark., 2021), *C. jacea*, *C. calcitrapa*, *C. aegyptica* ve *C. mersinensis*’in meme (Aboul-Soud

ve ark., 2022; Forgo ve ark., 2012; Yırtıcı ve ark.,2023), *C. aegyptica* ve *C. nerimanie*'nin serviks (Bakr ve ark., 2016; Kayacan ve ark., 2018) ve *C. polyclada*'nın yumurtalık (Erel ve ark., 2014) kanserlerinde sitotoksik ve apoptotik yolları etkileyerek etkili olabileceğine dair yapılan çalışmalar mevcuttur. Literatürde, henüz çalışmamıza konu olan *C. lycaonica* bitkisine ait endometriyum kanser hücre hattı olan RL95-2 üzerinde yapılan herhangi bir sitotoksikite çalışması bulunmamaktadır. Bu sebeple, *C. lycaonica* bitkisine ait potansiyel antikanser etkinin tespiti ve mekanizmaların açıklanması bu tez çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Literatürde endometriyum kanseri ile ilgili *Centaurea* türlerine ait çalışma yer almamasından dolayı değerlendirmeler diğer kanser hücre hatları referans olarak yapıldı.

Türkiye'de 172 türü bulunan *Centaurea* cinsinin kanser araştırmalarında kullanılma sebebi içerdiği zengin sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Cinse ait türler seskiterpen laktonlar (Sokovic ve ark., 2017), flavonoidler (Kubacey ve ark., 2012) ve çeşitli yağlar (Carev ve ark., 2023) içermektedir ve bu gruplar antikanser aktiviteden sorumlu bulunmaktadır (Sharonova ve ark., 2021; Reda ve ark., 2023). Literatürde yer alan *Centaurea* türlerine ait seskiterpen laktonlar ve flavonoidlerin antikanser aktivite çalışmalarından bazıları şu şekildedir: *C. behen* bitkisinden elde edilen seskiterpen laktonların çeşitli hücre hatlarına karşı *in vitro* sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve bileşiklerin A2780 (insan ovaryum kanseri) hücrelerine karşı güçlü sitotoksik aktivite oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca, izole edilen bileşikler anti-anjiyogenik ve anti-metastatik aktivite gösterdiği çalışmada gösterilmiştir (Shakeri ve ark., 2018). Yapılan bir diğer çalışmada, *C. ragusina* bitkisinin yaprakları kullanılarak elde edilen metanol ekstresinden çeşitli flavonoid ve seskiterpen laktonlar elde edilmiş ve bu bileşikler HeLa ve Caco-2 (insan kolon epidermal adenokarsinom) hücre hatlarında sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir (Grienke ve ark., 2018). Keyvanloo ve ark., (2019), *C. cyanus*'tan izole edilen seskiterpen lakton bileşiğinin MCF-7 ve MDA-MB-231(meme kanseri) hücre hatları üzerinde sitotoksikitesi olduğunu tespit etmiştir (Keyvanloo ve ark., 2019). Yapılan tez çalışmasında kullanılan *C. lycaonica* bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik bileşikler ve flavonoidler içerdiği Fatullayev ve ark (2023) tarafından ortaya konmuş olup bu bitki türüne ait literatürde fitokimyasal

içerik çalışması olarak tek araştırma olmaktadır. Yapılmış içerik analiz çalışması ile seskiterpen laktonlar (Shakeri ve ark., 2018) ve flavonoidlerin (Seghiri ve ark., 2009) potansiyel sitotoksik etkiye sahip olduğu bilindiğinden bu tez çalışmasında potansiyel antikanser etkisi araştırılarak *C. lycaonica* bitkisine ait bilgiler literatürde genişletildi.

Literatür taramasına göre, *Centaurea* türleri üzerinde yapılan çalışmaların 24'ünde MTT (Aboul-Soud ve ark., 2022; Aghaei ve ark., 2021; Ahmed ve Kamel, 2014; Alper ve ark., 2021; Alper ve Güneş, 2019; Artun ve Karagöz, 2021; Ayromlou ve ark., 2020; Bahmani ve ark., 2018; Bakr ve ark., 2016; Esmaili ve ark., 2021; Forgo ve ark., 2012; Güvensen ve ark., 2019; Grienke ve ark., 2018; Humeniuk ve ark., 2023; Kayacan ve ark., 2018; Keyvanloo ve ark., 2019; Köse ve ark., 2016; Nasr ve ark., 2020; Polat ve ark., 2022; Russo ve ark., 2016; Sen ve ark., 2015; Tugay ve ark., 2021; Yağlıoğlu ve ark., 2014; Yırtıcı ve ark., 2023); 2 tanesinde SRB (Beltagy, 2015; Petropoulos ve ark., 2020); 1 tanesinde alamar mavisi (Shakeri ve ark., 2020) ve 1 tanesinde BrdU proliferasyon testi sitotoksikite test yöntemi olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında, sitotoksikite tespiti için hücre membranlarından kolaylıkla geçiş sağlayan ve kimyasal ve biyolojik maddelerin sitotoksikitesinin belirlenmesinde yukarıda da belirtildiği üzere sık olarak kullanılan MTT yöntemi tercih edildi. MTT yöntemi, hücre ölümü yerine hücre canlılığını tespit eden, hücre içi metabolik aktiviteyi ölçme esasına dayanan bir yöntemdir. Kısa süre içinde sonuç alınması ve ucuz olması sebebi ile diğer hücre canlılık testlerine göre avantajlı bir test yöntemi olarak kabul görmektedir (Bean ve ark., 1995).

GZHA, biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı ve elektronik olarak tespit edilmesi esasına dayanan bir sistemdir. Deneyin herhangi bir zamanında test edilen bir bileşiğin hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi bu test yönteminin tercih edilme oranını artırmaktadır (Lisby ve ark., 2022). Bu tez çalışmasında, MTT testi ile CRD ve CRM'nin sitotoksik etkisi ile xCELLigence GZHA sistemi kullanılarak hücre canlılığındaki CI değişimleri ve gerçek zamanlı hücre profili ilk defa ortaya koyuldu. Elde edilen bulgular, CRD ile 48 sa. tedavinin ardından IC₅₀ değerleri MTT için 98,78 µg/ml; GZHA için 139,542 µg/ml olarak bulundu. CRM ile 48 sa. tedavi ile IC₅₀ değerleri MTT için 60,02 µg/ml; GZHA için 94,88 µg/ml şeklinde bulundu (Tablo 4.1). Bulgulara göre sitotoksikitenin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği ve

iki farklı test yönteminin birebir aynı olmasa dahi birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Ekstreler arasında kök kısmının metanol ekstresinin IC₅₀ değerinin daha düşük olması sitotoksitesinin diklorometan ekstresine göre yüksek olduğunu gösterdi. 100 µg/ml metanol ekstresinin aynı konsantrasyondaki diklorometan ekstresine göre hücre canlılığını daha fazla düşürmesi bu düşüncüyü desteklemektedir.

Literatürde yer alan *Centaurea* ile yapılan sitotoksitenin tespiti ve incelenmesi için MTT ve xCELLigence GZHA yöntemi kullanılan araştırmalar incelendiğinde; *C. hermanni* yapraklarından elde edilen metanol ekstresinin HeLa hücresinde sitotoksik ve apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksite tahlili için MTT ve xCELLigence yöntemi kullanılmıştır. HeLa hücrelerindeki 48 sa.'lik uygulama sonrası IC₅₀ değeri MTT için 15,74 ve GZHA için 18,3 µg/ml bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan dox için değerler ise MTT için 8,4 µM ve GZHA için 7,8 µM şeklinde bulunmuştur. Kullanılan bitki ekstresinin HeLa hücrelerinde 10 µg /ml dışındaki tüm konsantrasyonlarda önemli sitotoksite gösterdiği gözlenmiştir. MTT ve GZHA sonuçları orantılı bulunmuştur (Artun ve Karagöz, 2021). Artun ve Karagöz (2021) tarafından yapılan çalışmada sitotoksite yöntemi olarak MTT ile GZHA'nın birlikte kullanılması ve çözücü olarak metanol tercih edilmesi çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Çalışmada 48 sa. MTT ve GZHA sonuçları tarafımızca yapılan çalışmada olduğu gibi birbiri ile uyumlu niteliktedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan dox değeri tez çalışmasında kullandığımız değer ile (6,19 µM) ile paralellik göstermektedir. IC₅₀ değerlerinin daha düşük olma nedeni hücre hattının, bitki türünün ve bitkide kullanılan kısmın farklı olması birebir karşılaştırmayı mümkün kılmamaktadır. Artun ve Karagöz (2021)'ün çalışmasının devamında Kaspaz aktivasyon analizi yapılmış ve tez çalışmasında bulduğumuz gibi Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 düzeyleri kontrole kıyasla artış göstermiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.6.). Tez çalışmasından farklı olarak bu çalışmada, akış sitometri analizi ve gen ekspresyon analizi yapılmış, apoptotik hücrelerin sayısının arttığı ve apoptozla ilişkili gen ekspresyonunda artış olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular *Centaurea* türlerinin farklı apoptoz yollarını aktive edebildiğini ve çalışmaların çeşitliliğini ortaya koymaktadır.

Literatürde incelenen bir çalışmada, *C. sphaerocephala* yaprak ve çiçekli kısımlarının etil asetat ve n-butanol ekstrelerinin HeLa hücre hattında *in vitro*

antiproliferatif etkisi xCELLigence ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda butanol ekstresinin antiproliferatif etkinliğinin 50 µg/ml'den 250 µg/ml'ye doğru arttığı tespit edilmiştir (Lahneche ve ark., 2019). Bu çalışmada olduğu gibi bu tez çalışmasında, xCELLigence ile elde edilen hücre indeksinin konsantrasyona bağlı bir şekilde değiştiği görüldü. Lahneche ve ark.'nın çalışmasında IC₅₀ değeri etil asetat için 11,59 µg/ml bulunurken; butanol için 16,67 µg/ml bulunmuştur. Bulgular, tez çalışmasında elde edilen 98,88 µg/ml (CRM) ve 139,54 µg/ml (CRD) değerlerine göre daha sitotoksik bulundu. Farklılığın çözücünden ve kullanılan bitki kısmından kaynaklandığı düşünüldü.

Bir diğer çalışmada ise *C. solstitialis* bitkisinin çiçekli kısımlarının etanolik ekstresi MCF-7, PC-3 (prostat kanseri) ve HEK293 (insan embriyonik böbrek hücresi) hücre hatlarında MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. 72 sa.'lik uygulamanın ardından MCF-7 hücre hattında 58,53 µg/ml'lik IC₅₀ değeri ile sitotoksik aktivite gözlenmiştir (Alper ve ark., 2021). Hücre hattı, bitki türü ve kullanılan kısmı farklı olması rağmen aynı yöntemlerle teste tabi tutulan bu çalışma sonuçları tezde yer alan CRM IC₅₀ değerine (60,02 µg/ml) benzerlik gösterdi. Fakat tez çalışmasında 48 sa. sonunda elde edilen değer, Alper ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmada, 72 sa. uygulama sonunda elde edilmiş ve bu sonuç çalışmamızdaki sitotoksik aktivitenin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Yukarıda verilen MTT ve xCELLigence GZHA yöntemi kullanılan çalışmalarda sitotoksik aktivite bulunmakla birlikte bizim sonuçlarımızla benzerlik taşıdığı görülmektedir.

Centaurea bitkilerinin çiçek, yaprak, toprak üstü ve kök gibi çeşitli kısımları çalışmalarda kullanılmaktadır. Tarafımızca yapılan çalışmada bitkinin kök kısmı kullanıldı ve literatürde kök kısmı kullanılan *Centaurea* ile yapılan çalışmalara aşağıda yer verildi. *C. carduiiformis* bitkisinin kök kısmına ait metanol ekstresinin Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi), HeLa ve C6 (sıçan glioma hücresi) hücre hatlarında antiproliferatif etkisi incelenmiştir. Proliferasyon tespiti için BrdU proliferasyon testi kullanılmış ve IC₅₀ değerleri Vero ve HeLa hücre hatları için sırasıyla 250 µg/ml ve 735 µg/ml olarak bulunmuştur. (Yağlıoğlu ve ark., 2014). Bitkinin kök kısımlarının metanol ekstresinin kullanılması tarafımızca yapılan tez çalışması ile benzerlik taşımaktadır. Bu tez çalışmasında *C. lycaonica* kök kısımlarının metanol ekstresine ait IC₅₀ değerleri 60 µg/ml bulunarak Yağlıoğlu ve

ark. (2014) tarafından elde edilen sonuçlara göre daha sitotoksik bulundu. Ek olarak diklorometan ekstresinin de IC_{50} değeri (98,78 $\mu\text{g/ml}$) verilen çalışmaya göre daha düşük ve daha sitotoksik bulundu. İki çalışma arasında hücre hatlarının ve test yöntemlerinin farklılığı sonuçlarda değişkenlik olmasına sebebiyet vermekle birlikte *C. lycaonica*'nın daha etkili olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde Erenler ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, *C. solstitialis* bitkisine ait HeLa hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Çözücü olarak metanol kullanan çalışmanın IC_{50} değeri 48,78 $\mu\text{g/ml}$ bulunarak hücre hattı farklı olsa da çalışmamızdaki değerlere yakın bulundu. Bir diğer çalışmada, *C. jacea* kök kısmının etkinliği MTT ile incelenmiştir. HeLa hücre hattı için IC_{50} değerleri sulu metanol fraksiyonunda 5,71 $\mu\text{g/ml}$; kloroform ekstresinde 0,37 $\mu\text{g/ml}$; hekzan ekstresinde 8,82 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. MCF-7 için ise sulu metanol fraksiyonunda 15,29 $\mu\text{g/ml}$, kloroformda 1,68 $\mu\text{g/ml}$ ve hekzanda 17,74 $\mu\text{g/ml}$ şeklindedir (Csupor ve ark.,2009). Verilen çalışmalarda görüldüğü üzere *Centaurea* türlerinin kök kısımlarının içeriği kullanılan çözücüye göre değişerek aktivasyonu etkilemektedir (Quintana ve ark., 2009).

Bitki ekstrelerini elde etmek amacıyla metanol, etanol, kloroform, hekzan ve diklorometan gibi birçok çözücü kullanılmakta ve her birinin yer aldığı çalışmalarda farklı etkinlikler ortaya çıkmaktadır. Yıldırım ve ark.'nın (2022) yaptığı çalışmada, *C. saligna* Wagenitz'in toprak üstü kısımlarından metanol ekstresi ve bunlardan hekzan, etil asetat, kloroform ve sulu metanol fraksiyonları hazırlanmıştır. IC_{50} değerleri sırasıyla 41,05 $\mu\text{g/ml}$, 23,97 $\mu\text{g/ml}$, 32,39 $\mu\text{g/ml}$, 45,43 $\mu\text{g/ml}$ ve 27,01 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde bulunmuştur. Ekstrelerin her birinde sitotoksikite gözlemlenmiştir. *C. kilaia* boiss bitkisinin toprak üstünden elde edilen kloroform, heptan ve metanol ekstrelerinin HeLa ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesi MTT testi ile incelenmiştir. Sonuçlar kloroform ekstresinin en yüksek antiproliferatif etki oluşturduğunu göstermiştir (Sen ve ark., 2015). Yapılan literatür çalışmasına göre, *Centaurea* türlerine ait araştırmaların 16'sında çözücü olarak metanol (Artun ve Karagöz, 2021; Ayromlou ve ark., 2020; Bahmani ve ark., 2018; Bakr ve ark., 2016; Esmaeili ve ark., 2021; Forgo ve ark., 2012; Grienke ve ark., 2018; Humeniuk ve ark., 2023; Kayacan ve ark., 2018; Köse ve ark., 2016; Nasr ve ark., 2020; Polat ve ark., 2022; Russo ve ark., 2016; Tugay ve ark., 2021; Yağlıoğlu ve ark., 2014; Yırtıcı ve ark., 2023); 4 tanesinde diklorometan (Ghafari ve ark 2020; Keyvanloo ve ark.,

2019; Shakeri ve ark., 2020; Yırtıcı ve ark., 2017) kullanılmıştır. Bulunan çalışmalar doğrultusunda çözücü olarak metanol kullanmanın aktiviteyi artırabileceği kanısına varıldı. Ayrıca diklorometan ile yeterince çalışma olmadığı tespit edildi. Kullanılan bitki kısımlarına bağlı olarak diklorometan veya metanol gibi farklı çözücü kullanımına bağlı elde edilen etkinin değişebileceği yukarıdaki çalışmalarda görülmektedir. Bu amaçla, bu tez çalışmasında *C. lycaonica*'ya ait metanol ve diklorometan ekstralarının farklı konsantrasyonları karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Elde edilen bulgular metanol ekstresinin daha düşük IC₅₀ değeri ile daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği şeklindedir.

Antikanser aktivite çalışmalarına bakıldığında, *C. pchleri subsp.* Pichleri metanol ekstresinin DU145 (insan prostat kanseri) ve A549 (insan akciğer kanseri) hücre hatlarındaki sitotoksitesi MTT yöntemi ile incelenmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 116,26 ve 17,14 µg/ml şeklinde bulunmuştur (Polat ve ark., 2022). Başka bir çalışmada, *C. baseri* metanol ekstresi ile yapılan MTT deneyinde IC₅₀ değeri 45,3 µg/ml bulunmuş (Köse ve ark., 2016) ve *C. aegyptiaca* bitkisinin metanol ekstresi ile 30,9 µg/ml şeklinde bulunmuştur (Bakr ve ark., 2016). Metanol ekstresinin MTT yöntemi ile değerlendirildiği bu çalışmalardaki değerler, tez çalışmasında CRM'den aynı şekilde MTT yöntemi ile elde edilen 60,02 µg/ml IC₅₀ değeri ile doğrusallık gösterdi. Buna rağmen hücre hatlarının farklı olması sonuçlar üzerinde farklılık meydana getirmektedir.

Ghafari ve ark (2020) tarafından *C. virgate* Lam. bitkisi üzerinde yapılan çalışmada bu çalışmanın aksine diklorometan ekstresi metanole göre daha yüksek aktivite göstermiştir. Diklorometan ekstresi kullanılarak sitotoksitenin ölçüldüğü çalışmaların birinde *C. fenzlii* Reichardt bitkisi kullanılmış ve IC₅₀ değeri 45,77 µg/ml bulunmuştur (Yırtıcı ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada ise *C. cyanus* bitkisinin diklorometan ekstresinin IC₅₀ değeri 71,27 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Keyvanloo ve ark., 2019). Çalışmamızda CRD'nin 98,78 µg/ml bulunan IC₅₀ değeri, literatürdeki değerlere göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bitki türünün ve hücre hattının farklı olmasından kaynaklanabilir. Keyvanloo ve ark. (2019) çalışmasında devamında apoptoz mekanizması araştırılmış ve tez çalışmasında bulduğumuz gibi kullanılan bitkinin apoptotik yolları aktive ettiği ve Bax/Bcl-2 oranını gözle görülür bir şekilde artırdığı gözlenmiştir.

Apoptoz, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengeye dayanan karmaşık bir protein-protein etkileşimleri ağını içerir. Kanser hücrelerinde sıklıkla gözlenen azalmış apoptoz aktivitesinden dolayı kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların çoğu apoptotik yolları aktive etmektedir. Apoptoz ile aktive olan yollar, hücrelerde morfolojik ve kimyasal değişiklikler meydana getirir. Terapötik bir kimyasal veya bitkisel maddenin potansiyel anti kanser aktivitesi bu değişiklikler ile tespit edilir (Appiah-Opong ve ark., 2016). Kaspazlar apoptozda başlatıcı (Kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör (Kaspaz 3, 6, 7) ve enflamatuvar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olarak rol alır. DNA'nın onarımı ve replikasyonu için gereken enzimleri inaktive ederek apoptozom oluşumu ve hücre yıkımına neden olurlar. Hücrede meydana gelen kaspaz aktivasyonu ölçümü ile apoptoz tespiti yapılabilmektedir. (Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004). Apoptotik yolda rol alan en önemli proteinleri içeren Bcl-2 ailesi, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler olarak ikiye ayrılır. Bax proteini pro-apoptotik; Bcl-2 proteini ise anti-apoptotik gruba dahildir. Hücrede pro-apoptoz genlerin sayısı anti-apoptoz genlerine oranla fazla ise apoptoz eğilimi yüksektir. İki grup arasındaki oran esas alınarak apoptoz tayini yapılmaktadır (Adams, 2001).

Bu veriler ışığında yapılan çalışmada, CRD ve CRM'nin potansiyel *in vitro* antikanser aktivitesi literatür taraması ile yukarıda belirtildiği gibi araştırıldı ve MTT ve xCELLigence GZHA yöntemleri ile tespit edildi. RL95-2 hücre hattında CRD ve CRM'nin ikisinde de 30, 100, 180 ve 240 µg/ml konsantrasyonu sitotoksik bulundu. 10 µg/ml konsantrasyonu dışında tüm değerlerde hücre canlılığı % 70'in altına düştü. Apoptozla ilişkili proteinlerdeki değişimin araştırılmasında, CRD için MTT ile bulunan 48. sa. IC₅₀ değeri (98,78 µg/ml) referans alınarak 100 µg/ml ve %37 canlılık oranı ile sitotoksik etki gösteren 180 µg/ml kullanıldı. CRM'nin MTT sonucu 60,02 µg/ml bulundu ve hücrelerin % 28'ini öldüren 100 µg/ml konsantrasyonu da seçime uygun görüldü. Kullanılan konsantrasyonların xCELLigence değerleri ile uyumlu olmasına dikkat edildi. Konsantrasyonlar seçildikten sonra hücrelerde meydana gelen apoptoz aktivitesini ve mekanizmasını tespit etmek amacıyla kaspaz aktivasyonu (Kaspaz-3 ve Kaspaz-9) ve Bax ve Bcl-2 düzeyi incelendi.

Bulgular, *C. lycaonica* türünün apoptotik etkisini ilk defa ortaya koydu. Yapılan ELISA testi sonuçlarına göre, CRD 100 µg/ml, CRM 60 µg/ml ve CRM 100 µg/ml konsantrasyonlarının, Kaspaz-3 aktivitesini anlamlı bir şekilde artırdığı görüldü. En yüksek aktivite 3,62 kat artışı ile CRM 100 µg/ml’de bulundu. Kaspaz-9 aktivite sonuçlarında da aynı şekilde CRD 100 µg/ml, CRM 60 µg/ml ve CRM 100 µg/ml etkili bulunmakla birlikte 4,32 kat artışı ile en yüksek artışı CRM 100 µg/ml konsantrasyonu gösterdi. Ekstrelerle yapılan deneylerde Bax değerinin kontrole kıyasla arttığı, Bcl-2 değerinin ise azaldığı gözlemlendi. Bax/Bcl-2 oranları incelendiğinde iki ekstrenin de tüm değerlerinde anlamlı artış bulundu. Diğer yöntemlerde olduğu gibi en yüksek aktivite (3,63) CRM 100 µg/ml’de bulundu.

Apoptoz mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalara bakıldığında, *C. albonitens* bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi, MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite açısından incelenmiş ve PBMC (Periferik Kan Mononükleer Hücresi) ve MDBK (Madin-Darby Sıçan Böbrek hücresi) üzerinde etkinlik bulunmuştur. Çalışmada bitkinin apoptoz yolu ile sitotoksikiteyi indüklediği gözlenmiştir. Apoptoz mekanizmasının açıklanması amacıyla Kaspaz-3 aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçta NALM-6 ve REH (pre-B akut lenfoblastik lösemi) hücrelerinde kaspaz bağımlı bir şekilde apoptozun artırıldığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre Kaspaz-3 ve Bax proteininde artış gözlenirken Bcl-2’de azalma gözlenmiştir (Bahmani ve ark., 2018). Verilen çalışmada çalışmamıza benzer olarak sitotoksikite yöntemi olarak MTT ve apoptoz tayini için de ELISA yöntemi tercih edilmiştir. Çözücü olarak metanol kullanılması da benzerlik göstermektedir. Sonuçlar karşılaştırıldığında iki çalışmanın da sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğu ve apoptotik proteinler üzerinde kaspaz aktivasyonu ve Bax/Bcl-2 oranının artışı şeklinde etkiye sebep olduğu görüldü.

Çalışmamızda olduğu gibi metanol ekstresinin 48 sa. uygulandığı bir çalışmada (Nasr ve ark., 2020), *C. bruguierana* bitkisinin MCF-7 hücre hattında, tıpkı CRD ve CRM gibi apoptozu ve antiproliferasyonu artırdığı gözlenmiştir. Apoptotik hücre ölümü Anneksin-V yöntemi ile tespit edildikten sonra, RT-PCR analizi ile apoptoz düzenleyici genler araştırılmış ve Kaspaz-3 ve Kaspaz-9’u arttığı bulunmuştur. Ayrıca çalışma, Bax’ın yukarı regülasyonu Bcl-2’nin ise aşağı regülasyonu ile sonuçlanarak çalışmamızla paralellik gösterdi. Bir diğer çalışmada, *C. patula*, *C.*

pulchella ve *C. tchihatchheffii* bitkilerinin metanol ekstralarının A375 (insan melanom hücre hattı) üzerinde anti-apoptotik etkilerinin incelendiği çalışma sonucuna göre, 48 sa. uygulamanın ardından anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonun azaldığı ve pro-apoptotik Bax ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Russo ve ark., 2016). Kayacan ve ark. (2018) tarafından *C. nerimanie* bitkisinin metanol ekstresi üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarında kontrole kıyasla apoptozu artırdığı bulunmuştur. Apoptozun Kaspaz-3 yolu ile aktive edildiği çalışma ile kanıtlanmıştır (Kayacan ve ark., 2018). Literatürde yer alan çalışmalar ile kıyaslama yapıldığında çalışmamızda yer alan ekstraların RL95-2 üzerinde Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonu 2-4 kat artırarak kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı görülmektedir. Ayrıca pro-apoptotik Bax proteinin yukarı, anti-apoptotik Bcl-2 proteinin aşağı eğimi çalışmamızda gösterildi. Elde edilen bulgular literatürdeki oranlarla paralellik gösterdi.

Literatürde yer alan bir çalışmada, *C. solstitialis* çiçekli kısımlarının etanol ekstraları HeLa hücre hattında incelenmiştir. 10-1000 µg/ml konsantrasyonlarında kullanılan bitki ekstraları ile 72 sa. uygulamanın ardından sitotoksikite MTT yöntemi ile belirlenmiştir. IC₅₀ değeri 63,18 µg/ml bulunmuştur. Apoptoz tayin yöntemi olarak Anneksin V-FITC kullanılmış ve apoptotik hücre ölümü tespit edilmiştir. Kaspaz-3 tayini kolorimetrik yöntemlerle belirlenmiş ve Kaspaz-3 aktivitesinin kontrole kıyasla 1,65 kat arttığı yönündedir (Alper ve Güneş, 2019). Bu çalışmada elde edilen IC₅₀ değeri, çalışmamızda metanol ekstresi ile bulunan değere (60,02 µg/ml) benzerlik göstermektedir. 48 sa. sonunda tez çalışmasında elde edilen değerin, Alper ve Güneş (2019) tarafından 72 sa.'de elde edilmesi CRM'nin daha etkili olduğunu düşündürdü. Ayrıca çalışmamızda kullanılan CRD 100 ve 180 µg/ml, CRM 60 ve 100 µg/ml konsantrasyonları, Kaspaz-3 aktivasyonunu kontrole kıyasla 2 ila 4 kat artırarak verilen çalışmaya göre daha etkili bulundu. Ortaya çıkan farklılık bitki ekstresinin, çözücünün, hücre hattının ve kullanılan apoptoz yönteminin aynı olmamasından meydana gelebilmektedir. Bir diğer çalışmada, *C. calcitrapa* toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstresi MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde apoptotik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 15- 1000 µg/ml konsantrasyonları MTT yöntemi ile incelenmiş ve 48 sa.'lik uygulamanın ardından IC₅₀ değerleri MDA-MB-231 için 86,73; MCF-7 için 127,63 µg/ml şeklinde

bulunmuştur. Anneksin V-FITC apoptoz tayininde kontrole kıyasla apoptozda artış gözlenmiştir. MCF’de en büyük etki 150 µg/ml konsantrasyonda gözlenmiştir. MDA-MB-231 için 100 µg/ml kontrole kıyasla apoptozda % 7,35’lik bir artış söz konusudur (Aboul-Soud ve ark., 2022). MTT testi ile 48 sa. muamele ile bulunan değerler çalışmamızla doğrusallık göstermekle birlikte hücre hattının ve çözücünün farklı olmasından dolayı birebir karşılaştırma yapılamamaktadır. MDA-MB-231 hücre hattı için 100 µg/ml’de en yüksek apoptotik aktiviteyi göstermesi bizim çalışmamızda da CRM 100 µg/ml konsantrasyonu ile paralellik göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kadınlarda sıklıkla gözlenen jinekolojik kanserlerden olan endometriyum kanserinin tedavisinde temel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve bu yöntemlerin kombine kullanılması şeklinde tedaviler yapılmaktadır. Var olan tedavilerin yetersizliği ve kemoterapinin hastalar tarafından toleransının düşük olması yeni tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu amaçla, tarafımızca yapılan çalışmada, endometriyum kanser hücre hattı olan RL95-2 üzerinde *C. lycaonica* bitkisinden elde edilen diklorometan ve metanol ekstrelerinin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizması araştırıldı ve bitkiye ait potansiyel antikanser aktivite verileri ilk kez ortaya kondu. Elde edilen veriler, *C. lycaonica* bitkisine ait CRD ve CRM'nin RL95-2 hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Yüksek sitotoksik aktivite gösteren CRM'nin potansiyel antikanser ajan olabileceği tespit edildi ve çalışma bitkide çözücü olarak metanol kullanmanın aktivitedeki önemine dikkat çekti. Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonu artışı, yapılan çalışma ile ilk kez ortaya koyuldu ve apoptozun kaspaz bağımlı bir şekilde oluştuğu tespitine varıldı. Ek olarak apoptotik mekanizmanın belirteci olan Bax/Bcl-2 oranının yüksek bulunması bitkinin apoptoz üzerindeki etkinliğini ayrıntılı bir şekilde ortaya koydu. Literatürde bitki türü ile kıyaslama yapılacak herhangi *in vivo* veya *in vitro* çalışma bulunmadığından bu amaçla yapılan ilk çalışma niteliği taşımaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda yer alan *C. lycaonica* türünün RL95-2 üzerinde sitotoksik ve apoptotik aktivesi tespit edildi ve veriler ışığında potansiyel antikanser etkinliğe sahip olabileceği ortaya koyuldu. Bu amaçla ilerleyen çalışmalarda kaspaz ve Bax/Bcl-2'ye bağlı apoptoz mekanizmalarının daha geniş bir şekilde araştırılması ve çeşitlendirilmesi bitkinin etkisini tespit etmek açısından faydalı olacaktır. Ayrıca bitki türüne ait geniş kapsamlı içerik analizi ve izolasyon çalışmaları da etkinin anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Yapılan çalışmalar *in vivo* çalışmalar ile

desteklenmelidir. Çalışmamızda elde edilen bulguların yapılacak çalışmalara ışık tutacağı ve Türkiye’de yetişen endemik bitkilerin araştırılması konusunda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Aboul-Soud MA, Ennaji H, Kumar A, Alfihili MA, Bari A, Ahamed M, Giesy JP. Antioxidant, anti-proliferative activity and chemical fingerprinting of centaurea calcitrapa against breast cancer cells and molecular docking of caspase-3. *Antioxidants*, 2022; 11(8); 1514.
- Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26; 61-66.
- Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:390-7.
- Aghaei M, Mirzaei M, Ghanadian M, Fallah M, Mahboodi R. 6-Methoxylated flavonoids: Jacein, and 3-demethyljacein from *Centaurea schmidii* with their endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death in breast cancer cells along with in-silico analysis. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2021; 20(2); 417-425.
- Ahmed SA, Kamel E. M. Cytotoxic activities of flavonoids from *Centaurea scoparia*. *The Scientific world journal*. 2014;3:41-49.
- Aksoy H. Evaluation of the biological and wound healing activities of *Centaurea virgata*. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 2020; 10(3); 304-308.
- Alper M, Güneş H. The anticancer and anti-inflammatory effects of *Centaurea solstitialis* extract on human cancer cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019; 16(3); 273-279.
- Alper M, Özay C, Güneş H, Mammadov R. Assessment of antioxidant and cytotoxic activities and identification of phenolic compounds of *Centaurea solstitialis* and *Urospermum picroides* from Turkey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2021; 64, e21190530.
- Anastasi E, Filardi T, Tartaglione S, Lenzi A, Angeloni A, Morano S. Linking type 2 diabetes and gynecological cancer: An introductory overview. *Clin Chem Lab Med*, 2018; 56(9); 1413- 1425.
- Appiah-Opong R, Tuffour I, Annor GK, Blankson-Darku AD, Cramer P, Adomah A, Kissi-Twum A, Uto T and Ocloo A: “Antiproliferative, antioxidant activities and apoptosis induction by *Morinda lucida* and *Taraxacum officinale* in human HL-60 leukemia cells. *Journal of Global Biosciences*, 2016; 5(7); 4281-4291.
- Armitage AM. *Armitage’s manual of annuals, biennials, and half-hardy perennials*. Portland: Timber Press, 2001.

- Artun FT, Karagöz A. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of the methanolic extract of *Centaurea hermannii* in human cervical cancer cell line. *Biotechnic & Histochemistry*, 2021; 96(1); 1-10.
- Attar F, Ghahreman A. A synopsis of sect. *Cynaroides* (Cousinia, Compositae), distribution patterns and diversity centers, *Rostaniha*, 7 (Supplement. 2), 2006: 315-342.
- Ayromlou A, Masoudi S, Mirzaie A. Chemical composition, antioxidant, antibacterial, and anticancer activities of *Scorzonera calyculata* boiss. and *Centaurea irritans* wagenitz. Extracts, endemic to iran. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. 2020; 9(1): 118-127.
- Bahmani F, Esmaeili S, Bashash D, Dehghan-Nayeri N, Mashati P, Gharehbaghian A. *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018; 99; 598-607.
- Bakr RO, Mohamed SAEH, Ayoub N. Phenolic profile of *Centaurea aegyptiaca* L. growing in Egypt and its cytotoxic and antiviral activities. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 2016; 13(6); 135-143.
- Baykara O. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi. 2016; 5(3); 154-165.
- Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri, II. Baskı. 1999: 975-420-021- 1. İstanbul, 480s.
- Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD, Chappelow CC, Yourtee DM, Comparison of Tetrazolium Colorimetric and 51Cr Release Assays for Cytotoxicity Determination of Dental Biomaterials, *Dental Materials*, 1995; 11, 5-6, 327-31.
- Beltagy, A. M. Chemical Composition And Cytotoxic Activity of *Centaurea scoparea* Sieb against four human cell lines. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015; 7(3): 103-113.
- Bertram, J. Molecular Aspects of Medicine, The Molecular Biology of Cancer. 2001: 21; 167-223.
- Blake P, Swart AM, Orton J, et al, and the ASTEC/EN.5 Study Group. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis. *Lancet*, 2009; 373; 137-146.
- Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1983; 15; 10-17.
- Braun M, Overbeek-Wager EA, Grumbo JR. Diagnosis and management of endometrial cancer. *Am Fam Physician*, 2016; 93(6); 468-474.
- Bruno M, Bancheva S, Rosselli S, & Maggio A. Sesquiterpenoids in subtribe *Centaureinae* (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, 13C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry*, 2013; 95; 19-93.

- Çelik S, Uysal I, Menemen Y. Morphology, anatomy, ecology and palynology of two *Centaurea* species from Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*. 2008: 37(1); 67-74.
- Clarke MA, Long BJ, Morillo AD, Arbyn M, Bakkum-Gamez JN, Wentzensen N. Association of endometrial cancer risk with postmenopausal bleeding in women: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2018: 178(9);1210-1222.
- Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24(6): 33-38.
- Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006: 95; 105-143.
- Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma *Lancet*. 2000: 355; 1404-1411.
- Creutzberg CL, van Putten WL, Warlam-Rodenhuis CC, et al. Outcome of high-risk stage IC, grade 3, compared with stage I endometrial carcinoma patients: the Postoperative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma Trial. *J Clin Oncol* 2004; 22; 1234-1241.
- Csupor-Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Hohmann J. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009: 23(8); 1109-1115.
- Dijkhuizen FP, Mol BW, Brölmann HA, Heintz AP. The accuracy of endometrial sampling in the diagnosis of patients with endometrial carcinoma and hyperplasia: a meta-analysis. *Cancer*. 2000; 89; 1765-72.
- Dimkić, I., Petrović, M., Gavrilović, M., Gašić, U., Ristivojević, P., & Stanković, S. New perspectives of purple starthistle (*Centaurea calcitrapa*) leaf extracts : phytochemical analysis , cytotoxicity and antimicrobial activity. *AMB Express*. (2020).
- Dinçol K. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN. *Kemoterapide Temel Prensipler. Klinik Onkoloji.İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*. 2000: 34-47.
- Duman, H., Uzunhisarcıklı, M. E., & Bahadır, Y. N. A new species of *Centaurea* (Asteraceae) from northern Turkey. *Nordic Journal of Botany*. 2021: 39(10); 1-8.
- Ekim T, Koyuncu M, Duman H, Aytaç Z & Adıgüzel N. *Türkiye Bitkileri Kırmızı kitabı*. 2000, Ankara

- Erdtman, G. An Introduction to Pollen Analysis, Stokholm:Chronica Botanica Company Press. 1954: 66-128.
- Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan, S, Yavasoglu NUK, Karaalp C. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical Biology*. 2014: 52(6); 775-781.
- Erenler R, Sen O, Sahin YA, Demirtas, I. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2016: 19(1); 66-72.y
- Esmaceli S, Asadi M, Mosaddegh M, Motamed SM, Hamzeloo-Moghadam, M. Cytotoxic activity of *Centaurea albonitens* Turill aerial parts in colon and breast cancer cell lines. *J. Med. Plants*. 2021: 20; 59-67.
- Fatullayev H, Paşayeva L, Celik I, İnce U, Tugay O. Phytochemical Composition, In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities, and In Silico Molecular Docking and Dynamics Simulations of *Centaurea lycaonica*: A Computational and Experimental Approach. *ACS omega*. 2023: 8(25); 22854-22865.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 2015;136: E359-86.
- Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. 2012: 83(5); 921-925.
- Formisano C, Sirignano C, Rigano D, Chianese G, Zengin G, Seo EJ, Tagliatela-Scafati, O. Antiproliferative activity against leukemia cells of sesquiterpene lactones from the Turkish endemic plant *Centaurea drabifolia* subsp. *detonsa*. *Fitoterapia*. 2017: 120;98-102.
- Ghafari S, Behzad S, Maskookian A. Cytotoxic Effect And Antioxidant Capacity Of Different Extracts Of *Centaurea Virgate* Lam. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2020: 30(190); 119-125.
- Giaever, I., & Keese, C. R. A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature*. 1993: 366(6455); 591-592.
- Greven K, Winter K, Underhill K, Fontenesci J, Cooper J, Burke T. Final analysis of RTOG 9708: adjuvant postoperative irradiation combined with cisplatin/paclitaxel chemotherapy following surgery for patients with high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2006: 103; 155-159.
- Grienke, U., Radić Brkanac, S., Vujčić, V., Urban, E., Ivanković, S., Stojković, R., ... & Radić Stojković, M. Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina* L. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9: 972-979.

- Güvensen NC, Keskin D, Gunes H, Oktay MK, Yildirim H. Antimicrobial Property and Antiproliferative Activity of *Centaurea babylonica* (L.) L. On Human Carcinomas and Cervical Cancer Cell Lines. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2019; 26(2):41-49.
- Heywood V. H. Compositae. In V. H. Heywood (Ed.), *Flowering plants of the World*. Oxford: Oxford University Press. 1978: 263-268.
- Humeniuk, E., Adamczuk, G., Kubik, J., Adamczuk, K., Józefczyk, A., Korga-Plewko, A. Cardioprotective Effect of *Centaurea castriferrei* Borbás & Waisb Extract against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in H9c2 Cells. *Molecules*. 2023; 28(1); 420-435.
- Jantarasaengaram S, Praditphol N, Tansathit T, Vipupinyo C, Vairojanavong K. Three-dimensional ultrasound with volume contrast imaging for preoperative assessment of myometrial invasion and cervical involvement in women with endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014; 43; 569-574.
- Kayacan S, Sener LT, Melikoglu G, Kultur S, Albeniz I, Ozturk M. Induction of apoptosis by *Centaurea nerimaniae* extract in HeLa and MDA-MB-231 cells by a caspase-3 pathway. *Biotechnic & Histochemistry*. 2018; 93(5); 311-319.
- Keogh RJ. "New technology for investigating trophoblast function." *Placenta* 31.4. 2010: 347-350.
- Keser S, Keser F, Turkoglu I, Kaygili O, Tekin S, Demir E, & Turkoglu, S. In vitro biological evaluation and phytochemical contents of three *Centaurea* L. species growing from Eastern Anatolia in Turkey. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*. 2020; 23(1); 148-156.
- Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2004; 92: 744-751.
- Keyvanloo Shahrestanaki M, Bagheri M, Ghanadian M, Aghaei M, Jafari SM. *Centaurea cyanus* extracted 13-O-acetylsolstitialin A decrease Bax/Bcl-2 ratio and expression of cyclin D1/Cdk-4 to induce apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry*. 2019; 120(10); 18309-18319.
- Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. *European Journal of Scientific Research*. 2012; 84(3); 398-416.
- Köse YB, İçcan G, Göger F, Akalın G, Demirci B, Başer KHB. Chemical composition and biological activity of *Centaurea baseri*: New species from Turkey. *Chem Biodivers*. 2016; 13; 1369-1379.
- Kubacey TM, Haggag EG, El-Toumy SA, Ahmed AA, El-Ashmawy IM, Youns M. M. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *J. Pharm. Res*. 2012; 5(6); 3352-3361.
- Kumar M, Nagpal R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Singh S. Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta Biomedica*. 2012; 83; 220-233.

- Kurman RD, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior endometrial hyperplasia. A long term study of untreated hyperplasia in 170 patients. *Cancer*. 1985; 56; 403-412.
- Lahneche AM, Boucheham R, Ozen T, Altun M, Boubekri N, Demirtas I, Zama D. In vitro antioxidant, DNA-damaged protection and antiproliferative activities of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Centaurea sphaerocephala* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2019; 91; e20180462.
- Lisby AN, Carlson RD, Baybutt TR, Weindorfer M, Snook A. E. Evaluation of CAR-T cell cytotoxicity: Real-time impedance-based analysis. In *Methods in Cell Biology*. Academic Press. 2022: 167; 81-98.
- Lonergan G, Routsis E, Georgiadis T, Agelis G, Hondrelis J, Larsen LK, Caolan FR. "Isolation, NMR Studies and Biological Activities of Onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*", *J. Nat. Prod.* 1992; 55(2):41-49.
- Mahata S, Maru S, Shukla S, Pandey A, Mugesh G, Das BC. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 12; 15.
- Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Haddock MG, Calori G, Podratz KC. Low-risk corpus cancer: is lymphadenectomy or radiotherapy necessary. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182; 1506-1519.
- Merrill MR, Fugal S, Novilla BL, Raphael CM. Cancer risk associated with early and late maternal age at first birth. *J Gynecol Oncol*. 2005; 96; 583-593.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2); 55-63.
- Nasr FA, Shahat AA, Alqahtani AS, Ahmed MZ, Qamar W, Al-Mishari AA, Almoqbil AN. *Centaurea bruguierana* inhibits cell proliferation, causes cell cycle arrest, and induces apoptosis in human MCF-7 breast carcinoma cells. *Molecular Biology Reports* 2020; 47; 6043-6051.
- Nout RA, Smit VT, Putter H. for the PORTEC Study Group. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, noninferiority, randomised trial. *Lancet*. 2010; 375; 816-823.
- Özbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ostan I. Assessment of in vivo antimalarial activities of some selected medicinal plants from Turkey. *Parasitology research*. 2014; 113(1); 165-173.
- Özsoy N, Kultur S, Yilmaz-Ozden T, Ozbek Celik B, Can A, Melikoglu, G. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Acetylcholinesterase Inhibitory and Antimicrobial Activities of Turkish Endemic *Centaurea antiochia* var. *P. raealta*. *Journal of Food Biochemistry*. 2015; 39(6); 771-776.
- Pandey V, Jung Y, Kang J, Steiner M, Qian PX, Banerjee A, Lobie PE. Artemin reduces sensitivity to doxorubicin and paclitaxel in endometrial carcinoma cells through specific regulation of CD24. *Translational oncology*. 2010; 3(4); 218-IN5.

- Petropoulos SA, Fernandes Â, Dias MI, Pereira C, Calhelha R, Di Gioia F, Ferreira I. C. Wild and cultivated *Centaurea raphanina* subsp. mixta: A valuable source of bioactive compounds. *Antioxidants*. 2020; 9(4); 314-325.
- Pınar G, Algier L, Doğan N, Kaya N. Jinekolojik Kanserli Bireylerde Risk Faktörlerinin Belirlenmesi. *International Journal of Hematology & Oncology/UHOD: Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2008; 18(4):41-49.
- Quintana, N, El Kassis, E. G, Stermitz, F. R, & Vivanco, J. M. Phytotoxic compounds from roots of *Centaurea diffusa* Lam. *Plant signaling & behavior*. 2009; 4(1); 9-14.
- Randall ME, Filiaci VL, Muss H, et al. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2006; 24; 36-44.
- Reda EH, Hegazi NM, Marzouk M, Shakour ZT. A, El-halawany AM, Mohamed T. A Hegazy MF. Feature-Based Molecular Networking for the Exploration of the Metabolome Diversity of Common Egyptian *Centaurea* Species in Relation to Their Cytotoxic Activity. 2023; 4:39-45.
- Reed SI, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cell Cycle, Cancer*. 8 th Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins. 2008; 2: 79-92.
- Ringer DP, Schnipper LE, Lenhard RE, Osteen RT, Gansler, T. *Principles of Cancer Biology*. Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society. 2001: 21-35.
- Rowley JR, Dahl AO, Rowley JS. Substructure in exines of *Artemisia vulgaris* (Asteraceae), Review of Palaeobotany and Palynology. 1981; 35; 1-38.
- Russo A, Cardile V, Graziano AC, Rigano D, Aktumsek A, Zengin G, Senatore F. Effect of three *Centaurea* species collected from central Anatolia region of Turkey on human melanoma cells. *Natural Product Communications*. 2016; 11(3);36-45. 1934578X1601100302.
- Salgame P, Varadhachary A S, Primiano L L, Fincke J E, Muller S, Monestier M. An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*. 1997; 25(3); 680-681.
- Salla M, Fakhoury I, Saliba N, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanapartholide. *Journal of Natural Medicines*. 2013; 67(3); 468-479.
- Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Appl Biochem Biotechnol*. 1999; 29(2); 99-108.
- Saroglou V, Karioti A, Demetzos C, Dimas K, Skaltsa H. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of natural products*. 2005; 68(9); 1404-1407.
- Savelli L, Ceccarini M, Ludovisi M, et al. Preoperative local staging of endometrial cancer: transvaginal sonography vs magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008; 31; 560-566.

- Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Benayache, F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*. 2009: 2(3); 114-118.
- Sen A, Ozbas, S. T, Akbuga, J, & Bitis, L. In vitro antiproliferative activity of endemic *Centaurea kilaea* Boiss. against human tumor cell lines. *Clin Exp Health Sci*. 2015: 5, 149-153.
- Shakeri A, Amini E, Asili J, Masullo M, Piacente, S, & Iranshahi, M.. Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. *Natural product research*. 2018: 32(12); 1436-1440.
- Sharonova, N, Nikitin, E, Terenzhev D, Lyubina A, Amerhanova S, Bushmeleva K, Sinyashin K. Comparative Assessment of the Phytochemical Composition and Biological Activity of Extracts of Flowering Plants of *Centaurea cyanus* L, *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. *Plants*. 2021:10(7); 1279-1292.
- Shoeb M, Jaspars M, MacManus SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker S. D. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines*. 2007: 61(2); 164-169.
- Sokovic M, Ciric A, Glamoclija J, Skaltsa H. Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L.(Asteraceae). *Current Pharmaceutical Design*. 2017: 23(19); 2767-2786.
- Souza VBD, Silva EN, Ribeiro ML, Martins WDA. Hypertension in patients with cancer. *Arq Bras Cardiol*. 2015: 104(3); 246-252.
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*. 2004: 52(6); 821-831.
- Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 2001: A3; B1-A3. B.
- Susumu N, Sagae S, Udagawa Y, et al, and the Japanese Gynecologic Oncology Group. Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and highrisk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2008: 108; 226-233.
- Şekerler, T, Şen, A, Bitiş, L, & Şener, A.. In vitro antihepatocellular carcinoma activity of secondary metabolites of *Centaurea kilaea* boiss. *Journal of Research in Pharmacy*. 2020: 24(4); 479-486.
- Şimşek Sezer, E. N. In vitro investigation of cytotoxic, antioxidant, apoptosis-inducing, and wound healing properties of endemic *Centaurea fenzlii* Reichardt extracts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2022: 26(5); 1462-1474.
- Tugay O, Paşayeva L, Demirpolat E, Şahin M. Comparative Evaluation Of Cytotoxicity And Phytochemical Composition of *Centaurea iconiensis* (*Rhaponticoides iconiensis*). *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2021: 45; 65-75.

- Uysal T. (2012). zarif düğme. Şu sitede: Bizimbitkiler (2013). <<http://www.bizimbitkiler.org.tr>>, [er. tar.: 17 02 2024].
- Uysal T, Duran A, Tugay O, Ertuğrul K, Centaurea lycaonica Boiss.& Heldr, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi Poster sunumu. 2008, TRABZON.
- Vallejo, J. R, Peral, D, Gemio, P, Carrasco, M. C, Heinrich, M, & Pardo-deSantayana, M. Atractylis gummifera and Centaurea ornata in the Province of Badajoz (Extremadura, Spain)-Ethnopharmacological importance and toxicological risk. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009: 126(2); 366-370
- Wagenitz G. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands,. Davis P.H. (Ed.) Edinburgh, Edinburgh University Press. 1975: 5; 465-585.
- Wei HX, Gao WY, Tian, YJ, Guan YK, Huang MH, Cheng DL. New eudesmane sesquiterpene and thiophene derivatives from the roots of Rhaponticum uniflorum. *Pharmazie*. 1997:52; 245-247.
- Web-1: <https://gco.iarc.fr/en> Erişim tarihi: 29.02.2024.
- Web-2: <https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/> Erişim tarihi: 29.02.2024.
- White LN. An overview of screening and early detection of gynecologic malignancies. *Cancer*. 1993: 15;1400-1405.
- Wilczynski M, Danielska J, Wilczynski J. An update of the classical Bokhman's dualistic model of endometrial cancer. *Prz Menopauzalny*. 2016: 15 (2); 63-68.
- Yağlıoğlu AS, Demirtas I, Goren N. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from Centaurea carduiformis DC. *Phytochemistry letters*. 2014: 8; 213-219.
- Polat DÇ, İlğün S, Karatoprak, G. Ş, Akkol, E. K, & Capasso, R. Phytochemical Profiles, Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of Traditional Medicinal Plants: Centaurea pichleri subsp. pichleri, Conyza canadensis, and Jasminum fruticans. *Molecules*. 2022: 27(23); 8249.
- Yıldırım A, Şen A, Göger F, Bingöl Özakpınar, Bitiş, L. In vitro antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory activities and phenolic profile of Centaurea saligna (K. Koch) Wagenitz. *Journal of Research in Pharmacy*. 2022: 26(1).
- Yıldırım, S. The chorology of the Turkish species of Asteraceae family. *Ot Sist. Bot. Dergisi*. 1999: 6 (2); 75-123.
- Yırtıcı Ü, Göger F, Sarimahmut M, Ergene A. Cytotoxic and apoptotic effects of endemic Centaurea fenzlii Reichardt on the MCF-7 breast cancer cell line. *Turkish Journal of Biology*. 2017: 41(2); 370-377.
- Yırtıcı Ü, Ergene A, Adem Ş, Atalar MN, Eyüpoğlu V, Rawat R, Hamzaoglu E. Centaurea mersinensis phytochemical composition and multi-dimensional bioactivity properties supported by molecular modeling. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2023;3: 1-17.
- Yokuş B. ve Çakır DÜ. Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi. 2012: 1(2); 7-18.

Zater H, Huet J, Fontaine V, Benayache S, Stévigny C, Duez P. Benayache F. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2016; 9(6): 554-561.



rk_turnitin

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**4**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**4**

2

openaccess.hacettepe.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

sen, Esra. "Sican Ovaryum Dokusunda Doksorubisin İle Induklenmis Follikuler Apoptotik Aktivasyonda Dialil Disulfit'in Koruyucu Etkisi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021

Yayın

<%**1**

4

Eskiler, Gamze Guney. "Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde Parp İnhibitoru Yuklu Kati Lipid Nanopartikullerin İlac Direnc Mekanizmalarinin Asilmasindaki Rollerinin Arastirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022

Yayın

<%**1**

5

imascon.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.isarconference.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Rûmeysa KORUBAŞI

Uyruğu : T.C.

Eğitim Bilgileri

Derece / Kurum / Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans / Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Farmakoloji Ana
Bilim Dalı, Kayseri/ 2024

Lisans / Karadeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Trabzon / 2020

Mesleki Deneyim

Yıl / Kurum / Görev

2022-Devam/ Adana Tufanbeyli Devlet Hastanesi / Kamu Eczacısı

2021-2022/ Güçlü Eczanesi (Kayseri)/ Yardımcı Eczacı

2020-2021/ Kaşıkçı Eczanesi (Kayseri)/ Yardımcı Eczacı

Yabancı Diller

İngilizce, Orta