

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ENDEMİK *Centaurea nerimaniae* EKSTRESİNİN KANSER
HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK
ETKİLERİ

NİRVA SERA KAYACAN

DANIŞMAN
PROF. DR. MELEK ÖZTÜRK

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı YÜKSK LİSANS Programında SERA KAYACAN tarafından hazırlanan "Endemik Centaurea Nerimaniae Ekstresinin Kanser Hücre Soylarında Sitotoksik ve Apoptik Etkileri" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 05 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

- | | | |
|--------------------------|--|--------|
| 1.Prof.Dr.MELEK ÖZTÜRK | Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. | İmzası |
| 2.Prof.Dr.SELMA YILMAZER | Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. | |
| 3.Doç.Dr.GÜLAY BULUT | Bahçeşehir Ü.Fen.Ed.Fak.Mol.Biyo ve Gen.Böl. | |

4.

5.

BEYAN

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

N. SERA KAYACAN



İTHAF

Dedem, Babaannem, Dayım, Halam, Babam ve İlda SİMSAR'a
ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında anabilim dalı imkanlarını kullanımına açan ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, lisansüstü eğitimim boyunca her zaman bana inanan, yaşadığım en ufak sorunda dahi ilgisi ve çözümleriyle her koşulda yanımda olup daima bana destek olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK'e, değerli bilgilerinden yararlandığım ve her zaman desteğini hissettiğim saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden itibaren beni bilgisiyle donatan ve her zaman yanımda olan Doç. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e, tez çalışmamın özellikle son ve en heyecanlı anlarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya, bilgileriyle destek olan ve kendimi daha fazla geliştirmeme katkıda bulunan tüm anabilim dalı öğretim üyelerine,

Çalışmamda kullandığım bitki özütünü temin ettiğim, güleryüzüyle yardım ve desteğini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gülay MELİKOĞLU'na, deneylerimin bir kısmını İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapmama izin veren Sayın Prof. Dr. Işıl ALBENİZ'e ve çalışmalarım sırasında en büyük yardımı sağlayan, bana her zaman destek olan Ar. Gör. Dr. Leyla TÜRKER ŞENER'e,

Dostluklarıyla her günümü neşeli geçirmemi sağlayan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan arkadaşlarım Bio. Gülay NEPHAN, Bio. Büşra AKSOYER ve Bio. Eda BÜYÜKÇOLPAN'a, uzun süredir yanımda olamasa da her an desteğini gösteren ve beni hep motive eden canım arkadaşım Rana ÖZKAN'a, lisans eğitimimin başlangıcından itibaren bugüne dek can dostum olan, mutlu mutsuz her anımda yüzümü güldüren ve her daim bana inanan arkadaşlarım Gizem DÜZ ve Güleser SOLAK'a,

Bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan, bana benden çok güvenen, inanan ve de beni koşulsuz seven güzel AİLEM'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38781

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KANSER.....	4
2.1.1. Kanser hücreleri ve kanser gelişiminde etkili faktörler	4
2.2. KANSER HÜCRE SOYLARI: HeLa ve MDA-MB-231.....	6
2.2.1. Serviks kanseri ve HeLa hücre soyu	6
2.2.2. Meme kanseri ve MDA-MB-231 hücre soyu	7
2.3. KANSER TEDAVİ MODELLERİ.....	9
2.4. DOĞAL ÜRÜNLER VE KANSER TEDAVİSİ.....	10
2.4.1. Tarihçe	11
2.4.2. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünlerin Kullanımı	12
2.4.3. Doğal ürünlerden özüt hazırlama yöntemleri.....	14
2.5. TIBBİ KULLANIMDAKİ ENDEMİK TÜRLER.....	15
2.5.1. Türkiye’de Endemik Bitki Çeşitliliği.....	16
2.5.2. <i>Centaurea</i> cinsi	17
2.5.2.1. <i>Centaurea nerimaniae</i>	19
2.6. APOPTOZ.....	21
1.1.1. Apoptoz mekanizmaları.....	22
2.6.1. Apoptozun kontrolünde rol alan proteinler	24
2.6.1.1. Bcl-2 ailesi	24

2.6.1.2. Kaspazlar.....	25
2.7. KANSER VE APOPTOZ	26
2.8. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. BİTKİ ÖZÜTÜ	33
3.2. HeLa ve MDA-MB-231 HÜCRE SOYLARI.....	33
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ	33
3.3.1. Hücrelerin pasaj işlemi.....	34
3.3.2. Hücrelerin ekimi	34
3.4. ÖZÜTTEN FARKLI KONSANTRASYONLARIN HAZIRLANMASI	34
3.5. GERÇEK ZAMANLI SİTOTOKSİSİTE ve HÜCRE İNDEKSİ ÖLÇÜMÜ	35
3.6. ETKEN DOZLARA GÖRE DENEY GRUPLARI.....	35
3.7. MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ.....	36
3.7.1. Faz-Kontrast Mikroskopu	36
3.7.2. Işık Mikroskopu	36
3.7.2.1. İmmünohistokimya	37
3.7.2.2. TUNEL Yöntemi.....	38
3.7.3. Floresan Mikroskopu	40
3.8. APOPTOTİK İNDEKS.....	40
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	40
3.10. Kullanılan kimyasal malzemeler.....	41
3.11. Kullanılan gereçler.....	41
3.12. Kullanılan tampon ve çözeltiler	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. GERÇEK ZAMANLI SİTOTOKSİSİTE ve HÜCRE İNDEKSİ ANALİZİ	44
4.2. MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ.....	50
4.2.1. Faz-Kontrast Mikroskopu	50
4.2.2. Işık Mikroskopu	51
4.2.2.1. İmmünohistokimya	51
4.2.2.2. TUNEL Yöntemi ve Apoptotik indeks	54
4.2.3. Floresan Mikroskop	56
5. TARTIŞMA	58

KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	87

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Hücre soylarının özellikleri (ATCC).	8
Tablo 4-1: HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarının ekildiği ve 8 farklı özüt konsantrasyonunun ayarlandığı 96 kuyucuklu E-plaka yerleşimi (CN: <i>Centaurea nerimaniae</i>).	44
Tablo 4-2: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait ortalama aktif kaspaz-3 immünpozitifliğinin değerleri.	53
Tablo 4-3: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait ortalama apoptotik hücre indeksi değerleri.	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kanserleşmede rol alan faktörler (Hanahan ve Weinberg, 2011'den uyarlama).	5
Şekil 2-2: Ülkelere göre endemik tür sayıları (Yoğunoğlu, 2011'den).	16
Şekil 2-3: Türkiye'deki coğrafi bölgelere göre endemik türlerin dağılımı ve sayısı (Yoğunoğlu, 2011'den).	17
Şekil 2-4: <i>Centaurea nerimaniae</i> sp. (Kültür, 2010).	20
Şekil 2-5: <i>C. nerimaniae</i> sp. (Kültür, 2010).	20
Şekil 2-6: Apoptoz morfolojisi (http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology 'den uyarlama).	21
Şekil 2-7: Apoptoz mekanizmaları (Wong, 2011'den uyarlama).	23
Şekil 2-8: Bcl-2 ailesi proteinleri (Martinou ve Youle, 2012'den uyarlama).	25
Şekil 2-9: Kaspaz ailesi (Lavrik ve Krammer, 2009'den uyarlama).	26
Şekil 2-10: xCELLigence sistemi (Roche, 2008).	30
Şekil 2-11: Hücrelerin elektrik empedansının ölçümünün şematik gösterimi (Roche, 2008).	31
Şekil 4-1: <i>C. nerimaniae</i> özütünün artan konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerindeki 72 saatlik gerçek zamanlı hücre analizi (↓: 24. saat, ↓: 48. saat, ↓: 72. saat).	46
Şekil 4-2: <i>C. nerimaniae</i> özütünün artan konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 72 saatlik gerçek zamanlı hücre indeks analizi (↓: 24. saat, ↓: 48. saat, ↓: 72. saat).	46
Şekil 4-3: 24, 48 ve 72 saat sürelerinin sonunda xCELLigence sisteminden elde edilen <i>C. nerimaniae</i> özütünün 8 farklı konsantrasyonunun HeLa hücreleri üzerindeki (IC ₅₀) eğrileri.	47
Şekil 4-4: 24, 48 ve 72 saat sürelerinin sonunda xCELLigence sisteminden elde edilen <i>C. nerimaniae</i> özütünün 8 farklı konsantrasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki (IC ₅₀) eğrileri.	48
Şekil 4-5: <i>C. nerimaniae</i> bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının HeLa hücre soyuna uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre indeksi değerleri	49

Şekil 4-6: <i>C. nerimaniae</i> bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre soyuna uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre indeksi değerleri	49
Şekil 4-7: HeLa hücre soyunda (A) kontrol grubunun ve (B) <i>C. nerimaniae</i> bitki özütünün etken dozunun (1,42 mg/ml) uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskop görüntüsü (x20).....	50
Şekil 4-8: MDA-MB-231 hücre soyunda (A) kontrol grubunun ve (B) <i>C. nerimaniae</i> bitki özütünün etken dozunun (3,67 mg/ml) uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskop görüntüsü (x20).	50
Şekil 4-9: HeLa hücre soyunda aktif kaspaz-3'ün immünhistokimyasal olarak gösterilmesi.....	51
Şekil 4-10: MDA-MB-231 hücre soyunda aktif kaspaz-3'ün immünhistokimyasal olarak gösterilmesi.....	52
Şekil 4-11: MDA-MB-231 hücre soyunda sitoplazmada, sadece nukleusta veya nukleus+sitoplazmada aktif kaspaz-3 immünpozitif hücrelerin ortalama sayısı.....	53
Şekil 4-12: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait aktif kaspaz-3 immünpozitif hücre sayımı sonuçlarının (%) istatistiksel değerlendirilmesi (MDA-MB-231, * $p<0.001$ kontrol grubuna göre; HeLa, ** $p<0.0001$ kontrol grubuna göre).	53
Şekil 4-13: HeLa hücre soyunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.	54
Şekil 4-14: MDA-MB-231 hücre soyunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.....	55
Şekil 4-15: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait apoptotik hücre indeksinin (%) kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi (* $p<0.0001$, kontrol gruplarına kıyasla).	55
Şekil 4-16: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait apoptotik hücre indeksinin (%) istatistiksel olarak değerlendirilmesi (HeLa deney grubuna kıyasla * $p<0.0001$).....	56
Şekil 4-17: HeLa hücrelerinin DAPI boyaması ile apoptotik hücrelere ait nukleus morfolojilerinin floresan mikroskobunda gösterilmesi.....	56
Şekil 4-18: MDA-MB-231 hücrelerinin DAPI boyaması ile apoptotik hücrelere ait nukleus morfolojilerinin floresan mikroskobunda gösterilmesi.	57

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Acinus	apoptotik kromatin kondensasyon indükleyici
AEC	3-aminoetil 9-karbazol
AIF	apoptoz indükleyici faktör
AI	apoptotik indeks
APAF-1	apoptoz proteaz aktivasyon faktörü-1
AP-1	transkripsiyon faktörü
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (<i>American Type Culture Collection</i>)
BAD	Bcl-2 ilişkili ölüm organizatörü
BAK	Bcl-2 homolog antagonisti
BAX	Bcl-2 ilişkili protein
BCL-X	Bcl-2 homolog protein
BCL-XL	ekstra büyük B-hücre lenfoması
BCL-2	B-hücre lenfoması 2
BH	Bcl-2 homoloji bölgesi
BH1	Bcl-2 homoloji bölgesi 1
BH2	Bcl-2 homoloji bölgesi 2
BH3	Bcl-2 homoloji bölgesi 3
BID	BH3 etkileşim bölgesi ölüm agonisti
C.	<i>Centaurea</i>
c-jun	jun genini kodlayan protein
C.n.	<i>Centaurea nerimaniae</i>
CAD	kaspaz bağımlı DNaz
CARD	kaspaz gerektiren alan
CI	hücre indeksi
crm-1	nuklear eksport reseptörü
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DD	ölüm bölgesi
DED	ölüm tetikleyici bölgeler
DFF	DNA parçalama faktörü
DISC	ölüm uyarıcı sinyal kompleksi

DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDS	etan dimetansülfonat
ENDO-G	endonukleaz-G / apoptotik DNaz
ER	östrojen hormon reseptörü
FADD	Fas-ilişkiliölüm bölgesiproteini
FAS	tip 2 transmembran protein / reseptör
FASL	fas ligand
FBS	Fötal sığır serumu (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi (<i>Food and Drug Administration</i>)
HepG2	insan karaciğer karsinomu
HER-2	insan epidermal büyüme faktör reseptörü-2
HPV	İnsan Papilloma Virüsü (<i>Human Papilloma Virus</i>)
Htr/Omi	mitokondriyal serin proteaz
IAP	apoptoz inhibitor proteinleri
IARC	Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
ICAD	kaspazla aktifleşen DNaz inhibitörü
IC₅₀	hücrelerin yarısını öldüren madde miktarı
İHK	immunhistokimya
KB	insan oro-laringeal skuamöz karsinomu
LDH	laktat dehidrojenaz
LLC-PK11	domuz böbrek epitelyal hücreleri
Lyso-PC	lizofosfatidilkolin
MDR1	çoklu ilaca dirençproteini
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum)
MTT	3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NES	nuklear eksport sinyali
PBS	fosfat tamponlu tuz çözeltisi
M.Ö	milattan önce
M.S.	milattan sonra

PMS	fenazin metosülfat
pRB	retina blastoma tümör baskılayıcı protein
PR	progesteron hormon reseptörü
PS	fosfatidilserin
PTCP	geçici permeabilite por kompleksi
SARM	seçici androjen reseptör modülatörleri
SERM	seçici östrojen reseptör modülatörleri
Sit-C	sitokrom-c
SMAC/DIABLO	ikincil mitokondriyadan türevlenen kaspaz aktivatörü (<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase</i>)
SSK	skuamöz servikal kanserleri
t-BID	Bid proteininin kesilmiş hali
TNF	tümör nekroz faktör
TNFR	tümör nekroz faktör reseptörü
TRAIL	TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand
TRADD	tümör nekroz faktör reseptör-1-ilişkili ölüm bölgesi
TUNEL	<i>in situ</i> DNA Uç İşaretleme Yöntemi (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling</i>)
ÜNMK	üçlü negatif meme kanseri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (<i>World Health Organization</i>)
WST	(2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum)
XTT	(3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum)

ÖZET

Kayacan, S. (2015). Endemik *Centaurea nerimaniae* Ekstresinin Kansere Hücresel Soylarında Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Türkiye'ye endemik bir bitki türü olan *Centaurea nerimaniae*'nin metanol özütünün HeLa (serviks adenokarsinomu) ve MDA-MB-231 (meme adenokarsinomu) hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bitki özütünden hazırlanan 8 farklı konsantrasyonun hücre indeksi üzerine etkileri ve etken dozların belirlenmesi xCELLigence sistemi ile araştırıldı. Etken sitotoksik dozların apoptotik hücre ölümü üzerindeki etkilerinin incelenmesi için TUNEL yöntemi ve DAPI nükleus immünfloresan boyama yöntemi, ayrıca aktif kaspaz-3 tayini için de immünohistokimya yöntemi kullanıldı. *C. nerimaniae* bitki özütünün HeLa (1,42 mg/ml) ve MDA-MB-231 (3,67 mg/ml) hücrelerinde etken doz ve zamana bağlı olarak önemli derecede etkili olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). *C. nerimaniae* özütünün HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerine özgü etken dozlarının her iki hücre grubunda da apoptotik indeksin özüt uygulanmayan kontrol gruplarına göre belirgin olarak arttığı ($p < 0.0001$) saptandı. HeLa ve MDA-MB-231 soylarında aktif kaspaz-3 immünopozitif hücre sayısının kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi (sırasıyla, $p < 0.0001$, $p < 0.001$). *C. nerimaniae* özütünün HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerindeki sitotoksik etkisinin, apoptotik hücre ölümünü uyarmada etkin bir rolü olduğu belirlendi. *C. nerimaniae*'nin kanser tedavisinde yeni bir doğal kaynak olarak dikkate alınabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler : HeLa, MDA-MB-231, *C. nerimaniae*, Sitotoksikite, Apoptoz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38781

ABSTRACT

Kayacan, S. (2015). The Cytotoxic and Apoptotic Effects of The Endemic *Centaurea nerimaniae* Plant Extract on Cancer Cell Cines. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

The aim of this study, to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of the methanol extract of *Centaurea nerimaniae*, which is an endemic species of Turkey, on HeLa (cervical adenocarcinoma) and MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma) cells. The cells were treated with 8 different concentrations of *C. nerimaniae* over different time periods. The cytotoxic effects of the plant extract on cells were measured by using xCELLigence system. TUNEL assay and DAPI immunofluorescence staining of nuclei were used to examine plant extract effects on the apoptotic cell death with the effective cytotoxic doses, also immunohistochemistry method was used for the determination of active caspase-3. The results showed that the effective doses of *C. nerimaniae* could significantly inhibit the growth of HeLa (1,42 mg/ml) and MDA-MB-231 (3,67 mg/ml) cells in a dose and time dependent manner ($p < 0.001$). The apoptotic cell index on HeLa and MDA-MB-231 cells which were treated with effective doses of *C. nerimaniae* plant extract, were significantly increased compared with control groups ($p < 0.0001$). Immunohistochemistry results showed that after treatment of effective doses, caspase-3 immune positive cells were increased in extract treatment groups of HeLa and MDA-MB-231 cells with significant differences compared to control group ($p < 0.0001$, $p < 0.001$, respectively). As a result, the treatment of the effective doses of *C. nerimaniae* extract induces apoptotic cell death on HeLa and MDA-MB-231 cells and it was considered that can be a novel promising candidate for the treatment of cancer.

Key Words: HeLa, MDA-MB-231, *C. nerimaniae*, Cytotoxicity, Apoptosis

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 38781

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, tüm dünyada insan hayatını tehdit eden ve tedavisindeki tüm ilerlemelere rağmen ölüm oranları hala çok yüksek olan multifaktöriyel kompleks bir hastalıktır (Siegel ve ark., 2014).

Günümüzde, kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Kanser tedavisi için kullanılan en yaygın seçenek kemoterapidir. Ancak kemoterapinin ilaç toksisitesi ve ilaç direncinin ortaya çıkması tedavideki yetersizliğin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Güçlü ve düşük yan etkiye sahip, kansere karşı yeni ilaçların geliştirilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Alia ve ark., 2006; Pilatova ve ark., 2010; Moghaddam ve ark., 2012). Günümüzde, kansere karşı kullanılan ilaçların %60'ı doğal ürünlerden elde edilmektedir. Klinikte yaygın olarak kullanılan doğal bileşikler arasında bitkisel kaynaklı olanların sayısı oldukça fazladır (Treasure, 2005; Miller ve ark., 2008; Mahata ve ark., 2012; Marzo ve ark., 2013; Matic ve ark., 2013; Shiezadeha ve ark., 2013; Howat ve ark., 2014; Safarzadeh ve ark., 2014). Doğal ürünlerden geliştirilen ilaçlar ya ham özütlerinden veya özütlerden izole edilen bileşiklerden kaynaklanır (Exposito ve ark., 2009; Ostermann ve ark., 2009; Liu ve ark., 2010; Ali ve ark., 2012; Tröger ve ark., 2012; Weissenstein ve ark., 2014; Iwamoto ve ark., 2015). Günümüzde kemoterapi amacıyla kullanılmakta olan antitümör etkisi kanıtlanmış vinka alkaloidler (*vinkristin*, *vinblastin*), taksanlar (*paklitaksel*), kampoteşinler (*topotekan*) ve epipodofilotoksinler (*etoposid*) gibi pekçok bitkisel kökenli bileşik bulunmaktadır (Fulda ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2012; Korkina ve Kostyuk, 2012; Ramasamy ve ark., 2012).

Çeşitli çalışmalarda doğal ürünlerin ham özütlerinin, antitümöral aktiviteye sahip çeşitli moleküller içerdikleri ve bunların bazılarının kanser hücrelerini öldürmekte oldukça etkili oldukları gösterilmiştir (Csupor ve ark., 2009; Csapi ve ark., 2010; Chicca ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012). Ancak bitki özütlerinden elde edilen tek bir maddenin kendi başına kullanılması yerine, bitki özütü içerisindeki tüm bileşiklerin kompleks etkileşimleri (sinerjistik ve/veya antagonist etkileri) nedeniyle total bitki özütlerinin kullanılmasının bazı durumlarda daha etkili olduğunu ileri süren çalışmalar

vardır (Erel ve ark., 2014; Koç ve ark., 2014; Solowey ve ark., 2014). Ayrıca aynı cinse ait farklı türler içerisinde, aynı etken maddelerin farklı dozlarda bulunabileceği gösterilmiştir (Aktümsek ve ark., 2011; Chicca ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012; Salla ve ark., 2013).

Bitki özütlerinin ve/veya bileşenlerinin antitümoral etkileri özellikle hücre büyümesi, DNA replikasyonu, apoptotik hücre ölümü, invazyonu ve metastazında rol alan sinyal iletim yollarında görevli hedef moleküller ile ilişkili olarak bulunmuştur (Matic ve ark., 2013; Park ve ark., 2013; Wong ve ark., 2013; Foo ve ark., 2014; Moirangthem ve ark., 2014).

Centaurea cinsi, 180 adeti Türkiye'ye özgü olmak üzere dünyada 600'den fazla tür içerir ve ülkemizdeki endemizm oranı yüksektir (Davis, 1975; 1988; Aktümsek ve ark., 2011). Dünya üzerinde değişik bölgelerde de endemik olarak yetişen *Centaurea* türlerinin bazıları halk arasında, karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarının tedavisinde, nefes darlığı, ülser ve sıtma hastalığı tedavisinde, baş, göz ve boğaz ağrılarının giderilmesinde, sinus enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıkların tedavisi amacı ile kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Arif ve ark., 2004; Djeddi ve ark., 2008; Forgo ve ark., 2012).

Farklı *Centaurea* türlerine ait özütlerin ve bileşiklerinin antioksidan, hipoglisemik ve antienflamatuar etki mekanizmaları ile ilişkili çalışmalar bulunmasına rağmen (Trendaflova ve ark., 2007; Koca ve ark., 2009; Csupor ve ark., 2010; Zengin ve ark., 2010; Aktümsek ve ark., 2011; Aktümsek ve ark., 2013; Erel ve ark., 2014; Koç ve ark., 2014; Özbilgin ve ark., 2014), *Centaurea* türlerinin kanser hücreleri üzerindeki etkileri konusunda çok az sayıda çalışma vardır (Csupor ve ark., 2009; Csapi ve ark., 2010; Chicca ve ark., 2011; Erel ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012). Bu çalışmada, ülkemizde Akdeniz bölgesinde endemik olarak yetişen *Centaurea nerimaniae* türünden (Kültür, 2010) elde edilen özütün, ilk kez kanser hücre soyları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bitkinin özütü ile daha önce yapılmış herhangi bir *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışma bulunmamaktadır ve henüz kimyasal bileşenlerinin tanımlanması yapılmamıştır.

Geleneksel tedavi modelleri içinde yer alan sitotoksik kemoterapi, hala birçok kanser türü için tercih edilmektedir (Li ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2012; Hon Lee ve ark., 2013; Samarghandian ve ark., 2013). Kemoterapi amaçlı

kullanılmakta olan sitotoksik maddeler, bölünme evresindeki bir hücreyi, durağan fazdaki bir hücreye oranla daha fazla etkilemektedir (Mycek ve ark., 1998). Bu nedenle, kullanılacak olan maddenin sitotoksik etkisinin saptanması büyük önem taşımaktadır (Alabsi ve ark., 2012). Kanser tedavilerinin başarısı yüksek oranda normal dokunun yaşamasını sağlayıp, kanser hücrelerinin yok edilmesine bağlıdır. Tedavide öncül neoplastik hücrelerin yok edilmesi amacıyla proliferasyonun durdurulması veya apoptozun başlatılması önemli bir adım olarak kabul edilir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Bertheau ve ark., 2013; Obiorah ve ark., 2014).

Apoptoz kontrolünün bozulması kanser oluşumunda önemli rol oynar. Kanser hücrelerinin normal apoptotik süreçten kaçmaları sık gözlenen bir özelliktir. Kanser hücreleri ya antiapoptotik proteinlerin aşırı aktivasyonu ya da proapoptotik proteinlerin baskılanmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar (Olsson ve Zhivotovsky, 2011; Öztürk, 2011; Constance ve Lim, 2012; Sun ve ark., 2013). Apoptoz, hücre içinden veya hücre dışından gelen çeşitli uyaranlar ile tetiklenebilmektedir. Kanser ilaçlarının birçoğu apoptozu uyaran yollarda iş görmektedir (Degterev ve Yuan, 2008).

Servikal kanserler, tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada, ölüme neden olması açısından da ikinci sırada yer alır. HeLa hücreleri, serviks adenokarsinomlu bir vakadan türetilen hücre soylarından biridir (Sherer ve ark., 1953). HeLa hücreleri HPV18 dizileri içermektedir ve düşük seviyelerde p53, normal seviyelerde pRB ifadesine sahiptir (ATCC; Adey, 2013). Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen ve ölüme neden olan kanser türüdür. MDA-MB-231 hücre soyu, meme kanserli bir vakanın plevral effüzyondaki malign hücrelerinden türetilmiştir (MackIndoe ve ark., 1979). Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü negatif olup HER2 amplifikasyonu negatif olan hücre soyudur. Bu nedenle MDA-MB-231 hücreleri, üçlü negatif meme kanseri tipine ait örnek soydur (ATCC; Kao ve ark., 2009).

Bu çalışmanın amacı; *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür bitki özütünün HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarının olası sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmaktır. Ayrıca bu çalışma ile kanser tedavisinde büyük bir öneme sahip olan doğal ürünlerden elde edilen ilaç çalışmalarının teşvik edilmesi ve ülkemizdeki endemik bitkilerin değerlendirilmesine katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, genetik ve epigenetik olayların hücrel birikimine bağlı multifaktöriyel kompleks bir hastalıktır. Doğal bir süreç veya çevresel faktörlerin etkisi ile genlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesiyle ortaya çıkar (Blagosklonny, 2005; Jemal, 2010). Kanser, normal dokularda hücre ölümü ve çoğalması arasındaki dengeyi sağlayan homeostatik kontrol mekanizmasının hasar görmesi neticesinde gelişmektedir (Evan ve Vousden, 2001).

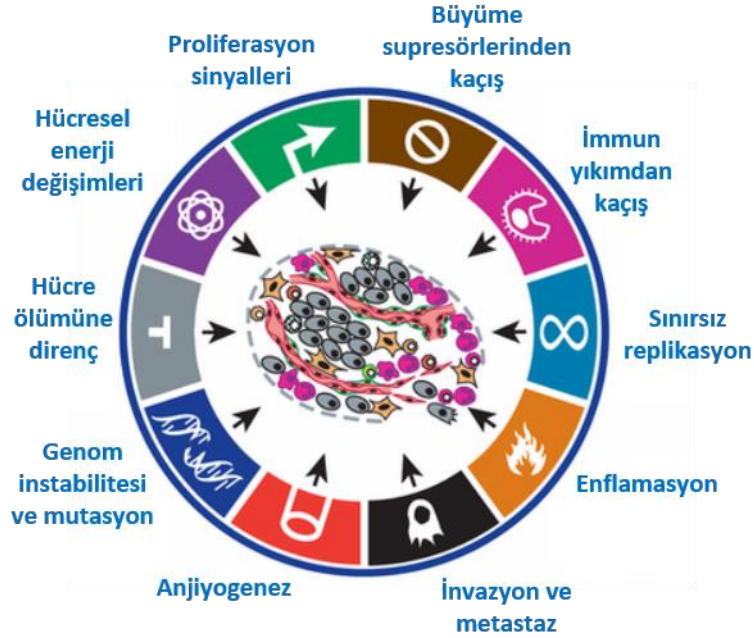
Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, immunoterapi, gen tedavisi ve alternatif tedavi gibi çeşitli yöntemler birlikte veya ayrı ayrı uygulanmaktadır (Mycek ve ark., 1998). Bu yöntemler arasında en sık kullanılanı kemoterapidir (Kumar, 2012).

Günümüzde kansere yakalanan bireylerin sayıları giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) istatistiklerine göre 2008 yılında yaklaşık 12,7 milyon kanser vakası görülmüştür ve bu sayının 2030 yılında 21 milyon artması beklenmektedir (Marie ve ark., 2013). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (*The International Agency for Research on Cancer*, IARC) 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakası, 8,2 milyon kanser nedeniyle ölüm ve 32,56 milyon kanserle yaşayan insan olduğunu bildirmiştir (Ferlay ve ark., 2013). Kanser, 21. yüzyılda da hala dünyadaki en önemli halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen hastaların genel olarak sağkalımı hala düşük orandadır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.1. Kanser hücreleri ve kanser gelişiminde etkili faktörler

Kanser hücreleri, normal hücre çoğalmasını, farklılaşmayı ve sağkalımını düzenleyen mekanizmalardaki anomaliler sonucunda kontrolsüz olarak çoğalmaya başlarlar. Sürekli bölünerek normal doku ve organları istila edip yayılırlar. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyarlar. Hücre çoğalmasında etkili olan hücre içi sinyal yollarındaki proteinlerin veya büyüme faktörü reseptörlerinin kontrolsüz aktivitesinden dolayı, kanser hücreleri çoğalmayı sağlayan büyüme faktörlerini kendileri salgılayabilirler, bu

da otokrin çoğalma uyarımı ile hücrenin sürekli olarak çoğalmasına neden olur (Şekil 2-1). Ancak, *in vitro* koşullarda çoğalabilmek için büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar.



Şekil 2-1: Kanserleşmede rol alan faktörler (Hanahan ve Weinberg, 2011'den uyarlama).

Kültür ortamında normal fibroblastlar diğer komşu hücrelere temas ettikleri anda gelişmelerine son verirler ve çoğalmazlar (kontakt inhibisyon). Böylece normal hücreler birbirlerine tutunarak düzenli bir şekilde kültür kabında yer kaplarlar. Ancak, tümör hücreleri komşu hücrelerle temas ettiği zaman bile hareket etmeye devam ederek çok katlı düzensiz kümeler halinde çoğalmaya devam ederler. Kanser hücreleri, kontrolsüz olarak çoğaldıkları için normal biçimde farklılaşamazlar ve farklılaşmanın erken evrelerinde kalırlar (Kalluri ve Zeisberg, 2006; Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser hücreleri, normal dokunun içerisine girebilmek için hücre dışındaki matriks bileşenlerini parçalayan proteazlar salgılayarak invazyon özelliği gösterirler. Tümörün büyümeye devam edebilmesi için yeni kan damarlarının oluşması (anjiyogenez) gereklidir. Bu damarlar, tümör hücresi tarafından salgılanan ve çevre dokuların damarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasını uyaran büyüme faktörlerine yanıt olarak ortaya çıkar. Bu da tümör hücrelerinin gelişen yeni kılcallara rahatça

girebilmesini ve kanser hücrelerinin dolaşıma katılarak metastatik yayılımı başlatmasına olanak sağlar (Benazzi ve ark., 2014; Joosse ve ark., 2015).

Onkogenler, p53 ve Rb gibi tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar da kanser gelişimine neden olmaktadır. Fakat bu durum kanser hücrelerinin kromozomal bozukluklarını ve biyoçeşitliliğini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Farklı bir görüşe göre ise, hücre bölünmesini kontrol eden genlerde meydana gelen bir mutasyon anormal replikasyona, delesyona ve duplikasyona yol açarak hücrelerin belli bir proteini gereğinden az veya fazla üretir. Eğer kromozomal aberasyonlar hücre döngüsünü kontrol eden büyüme faktörlerinin üretimini veya tümör baskılayıcılar gibi bir veya daha fazla proteini etkilerse kanser ortaya çıkabilir. Ayrıca, hücre döngüsü, DNA hasar tamiri ve apoptozda görevli olan genlerin aşırı metillenmesinin de bazı kanser türlerinde karakteristik olarak görüldüğüne dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır. Kanser gelişimine yol açabilecek farklı birçok mekanizma olabilir. Bu durum da kanserin nedeninin belirlenmesini daha da güçleştirmektedir (Adjei ve Blanka 2015).

2.2. KANSER HÜCRE SOYLARI: HeLa ve MDA-MB-231

2.2.1. Serviks kanseri ve HeLa hücre soyu

Servikal kanserler tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanserler arasında üçüncü sırada yer alır. Gelişen dünyada kadınlar arasında ölüme sebebiyet veren kanser türleri arasında ikinci sıradadır. Servikal kanserlerin iki ana histolojik tipi skuamöz servikal kanserleri (SSK) ve adenokarsinomları içerir. SSK'ler, tüm dünyada kadınlarda en sık tanısı konan ikinci kanser türüdür ve tüm vakaların %70'ini oluşturur. Hemen hemen tüm SSK'ler HPV (İnsan Papilloma Virusü)'nin, özellikle de Tip-16 ve -18'in tekrarlayan enfeksiyonu sonucu oluşmaktadır. Bu kanserler öncü lezyonların erken teşhisine ve etkili görüntüleme tekniklerine bağlı olarak tedavi edilebilir. Daha çok Tip-18 HPV ile ilişkilendirilmiş olan adenokarsinomlar ise tüm vakaların yaklaşık %25'inden sorumludur. Adenoskuamöz karsinom ise en az görülen tiptir ve vakaların yaklaşık %3-5'inde görülmektedir (Brown ve Trimble, 2012; Banerjee ve Kamrava, 2014).

HeLa: HeLa (insan servikal adenokarsinom hücre soyu) hücreleri, 31 yaşındaki Henrietta Lacks adlı bir kadının serviksinde oluşan adenokarsinomdan üretilmiş,

laboratuvar ortamında sınırsız süre yaşayan ve bir insana ait olan ilk hücre soyudur (Tablo 2-1). Hücreler epitel karakterli morfoloji göstermekte olup her 24 saatte yeni bir jenerasyon üretebilmektedir. HeLa hücre soyu keratin içermektedir. Lizofosfatidilkolin (lyso-PC), protein kinaz-C'den bağımsız bir yolak vasıtasıyla AP-1 aktivitesini ve c-jun N terminal kinaz aktivitesini uyarmaktadır. HeLa hücrelerinin genlerinde HPV 18 dizileri içerdiği bildirilmiştir. Hücrelerdeki p53 ifadesinin düşük ancak pRB'nin ifadesinin normal olduğu belirtilmiştir (ATCC; Adey, 2013).

HeLa hücrelerinin ölümsüz özelliği araştırmacıların daha önce imkansız olarak görülen araştırmaları yapabilmesine imkan tanımış ve keşfedilmelerinden hemen sonra standart hücre soyu olarak kullanılmıştır. HeLa hücreleri, kanserin tedavisinde genetik mekanizmaların araştırılmasında, radyasyon ve kemoterapi çalışmalarındaki hücresel davranışların tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır. Bir diğer dikkat çekici nokta ise hücrelerin çocuk felci aşısının geliştirilmesinde oynadıkları roldür. HeLa hücreleri, virüsün laboratuvar ortamında yetiştirilmesini mümkün kılmıştır. Bir aşı üretileceği zaman insanlara uygulanmadan önce HeLa hücreleri üzerinde test edilebilmiştir (<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/hela/helacells.html>).

2.2.2. Meme kanseri ve MDA-MB-231 hücre soyu

Meme kanseri tüm Dünya'da kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. 2012'de 1,67 milyon yeni vakaya tanı konmuştur. Ayrıca, yılda 500.000 ölüm ile kadınlar arasında en çok ölüme sebebiyet veren kanser türüdür. En sık görülme oranları dünyanın en gelişmiş bölgelerinde olup her 100.000 vakada 74,1 yeni vaka teşhisi konurken, bu oran az gelişmiş bölgelerde 31,3'tür (Banerjee ve Kamrava, 2014).

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-20'si üçlü negatif meme kanseridir (ÜNMK). Üçlü negatif meme kanserini diğer meme kanserlerinden ayıran özellik "reseptör durumu"dur. Üçlü negatif meme kanseri 'reseptör negatif'tir, yani; östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü (HER2) reseptörlerinden hiçbirine sahip değildir. Üçlü negatif grup olarak tanımlanan bu tümörlerin diğer tüm meme kanserlerinden temel farklılıklar gösterdiğine dair birçok veri vardır. Üçlü negatif tümörler meme kanserleri arasında en kötü seyirli gruplar arasındadır ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu bu grupta yeni tedavi

yaklaşımları için tümör özelliklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir (Shajahan-Haq ve ark., 2015; Tomao ve ark., 2015). Genel olarak, hormon reseptörlerini ifade eden tümörler, Her2/Neu amplifikasyonu olanlardan veya üçlü negatif olanlardan daha iyi prognoza sahiptir. Meme kanserleri kemoterapi ile tedavi edilebilse de, ilaç kullanma seçenekleri hem erken hem de geç evredeki bu üç belirtecin ifadesi ile belirgin şekilde etkilenmektedir. ER ve PR' yi ifade eden tümörlerde hormon üretimi veya etkinliği ile etkileşen ilaçlar kullanılırken, Her2/Neu'nun ifadesinin aşırı artmış olduğu tümörlerde Her2/Neu'yu baskılayan ilaçlar kullanılır. Bu hedeflenmiş tedaviler hormon reseptörü pozitif ve Her2/Neu'nun aşırı artmış olduğu tümörlerde başarılı sonuçların esas anahtarlarıdır. Hem erken evre hem de geç evre ÜNМК kanserlerinin tedavisinde ağırlıklı olarak kemoterapi kullanılmaktadır (Martin ve ark., 2014; Unger-Saldana, 2014).

MDA-MB-231; MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinom hücre soyu) hücreleri, metastatik meme kanseri adenokarsinomlu bir vakanın plevral effüzyondaki malign hücrelerinden türetilmiştir (Tablo 2-1). Üçlü negatif meme kanseri, ER ve PR negatif olup HER2 amplifikasyonu gözlenmeyen tipine aittir (ATCC; Kao ve ark., 2009).

Tablo 2-1: Hücre soylarının özellikleri (ATCC).

	HeLa	MDA-MB-231
Elde edildiği organizma	<i>Homo sapiens</i> , insan	<i>Homo sapiens</i> , insan
Doku	serviks	meme
Hücre tipi	epitel karakterli	epitel karakterli
Morfolojisi	epitel karakterli	epitel karakterli
Özelliği	yapışkan	yapışkan
Tümör tipi	adenokarsinom	adenokarsinom
Yaş/Cinsiyet	31 / K	51 / K
İrk	Siyah	beyaz
Saklama koşulları	sıvı nitrojen buhar	sıvı nitrojen buhar

2.3. KANSER TEDAVİ MODELLERİ

Kanser tedavisi kanserin tipine, oluşum yerine, ilerleme durumuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Sıklıkla ilk seçenek olan cerrahi yöntem, solid tümörlerin çıkartılmasında kullanılır. Erken evre kanserlerde ve benign tümörlerde tek tedavi yöntemi olabilir. Radyasyon, doğrudan tümörü hedef alan yüksek enerjili ışınlar kullanarak kanserli hücreleri öldürür. Esas olarak DNA'ya hasar vererek ve replikasyonunu engelleyerek görev yapar. Bu nedenle hızla bölünen kanser hücrelerini öldürür. Ayrıca kısmen bölünmekte olan normal hücreleri de öldürür. Cerrahi ve radyasyon yöntemleri sıklıkla birlikte kullanılmaktadır.

Kemoterapi ilaçları hızla büyüyen hücreleri hedefleyen toksik bileşenlerdir. Bu ilaçların çoğu DNA replikasyonu için gereken öncü moleküllerin sentezini engellemeyi hedefleyerek tasarlanır ve hücrenin S fazını tamamlaması engellenir. Kemoterapi ilaçları geniş çaplı olarak DNA hasarı oluşturur ve replikasyonu durdurur. Mitoz mekiğini oluşturan iğ ipliklerini baskılayan ilaç sınıfı, hücre replikasyonunu mitozun erken evrelerinde durdurur. Mitoz süresince kromozomların ayrılması için mikrotübüllere (iğ iplikleri) ihtiyaç duyulur. Mitotik iğ baskılayan ilaçlar mikrotübüllerin sentezini durdurur (Marzo ve ark., 2013). Yetişkin hücrelerin birçoğu sık sık bölünmediğinden, bu tip ilaçlara kanser hücrelerinin olduğundan daha az duyarlıdır. Kemoterapi ilaçları ayrıca gastrointestinal sistem hücreleri, kemik iliği hücreleri ve saç folikülleri gibi daha hızlı bölünen hücreleri de öldürürler. Bu da gastrointestinal rahatsızlıklar, düşük akyuvar sayısı ve saç kaybı gibi bazı kemoterapiye bağlı yan etkileri ortaya çıkartır (Hanahan ve Weiberg, 2011).

Normal hücre büyümesini etkileyen birçok faktörden biri de hormonlardır. Kanser hücreleri her ne kadar büyüme faktörlerine karşı cevap verme özelliklerini kaybetmiş olsalar da, bazı kanser hücreleri büyümek için büyüme hormonlarına ihtiyaç duymaktadır. Kansere karşı hormon tedavisi kanser hücrelerini bu hormonlardan yoksun bırakmayı amaçlar. Her ne kadar bazı ilaçlar hormonun sentezini engellese de bu iş genellikle hormonun aktivitesini engelleyen ilaçlar ile yapılır. Örneğin, bazı meme kanseri hücreleri büyümek için östrojene ihtiyaç duyar. Östrojenin bağlanma bölgesini engelleyen ilaçlar kanserin ilerlemesini yavaşlatabilir. Bu ilaçlara seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM) veya anti-östrojenler adı verilir. *Tamoksifen* ve *Raloksifen* bu tip ilaçlara örnektir. Benzer olarak, testosteron (androjen hormon) bazı

prostat kanser hücrelerini uyarır. Seçici androjen reseptör modülatörü (SARM) adlı ilaçlar testosteronun kanserli hücelere bağlanmasını engeller ve kanserli hücrenin büyümesini durdurur (Wu ve ark., 2014; Piccolella ve ark., 2014; Binkhorst ve ark., 2015). Yeni kemoterapötik ilaçlar ise kanser oluşumu ile ilişkili reseptörleri, büyüme faktörlerini veya kinazlar gibi hücre sinyal yollarını ve çeşitli aktif hücre proteinleri hedefler (Bisi ve ark., 2015).

Bazı kanser hücreleri bazı ilaçlara karşı direnç geliştirdiklerinden kemoterapi başarısız olabilir. Toksik ilaçlar ile mutasyona uğrayan ve ilaca direnç geliştiren kanser hücreleri ilaca dirençli bir tümör gelişimine neden olur. Bu probleme karşı kemoterapi ilaçları kombinasyonlar oluşturularak kullanılmaktadır. Bazı kanser hücrelerinde MDR1 (multi-drug resistance/çoklu ilaca direnç)'in aşırı gen ifadesi gözlenir ve bu gen sadece birtakım ilaçların hücre içine girmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda hücrenin içindeki ilaçların da dışarı atılmasına yol açabilir ve tedavinin başarısız olmasına neden olur (Kozovska ve ark., 2014).

Kanserde bağışıklık sistemi hücreleri, kanser hücrelerini yok etmekte yetersiz kalabilir. İmmünoterapi, immün sistem hücrelerinin kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılabilir. Buna örnek olarak bazı kanser tedavilerinde kullanılan interlökin-2 ve interferon alfa'nın immün cevabı arttırdığı ileri sürülmüştür (Makkouk ve ark., 2014; Eskander ve ark., 2015).

Bir diğer tedavi tipi olan kemo-immünoterapide, kanser hücrelerine özgü olan antikorlar ilaçlara eklenerek kullanılır. Bu moleküller kanser hücrelerine özgü olan antikor ve kanser hücrelerine girince toksik özellik gösteren ilaç olmak üzere iki kısımdan oluşur. Antikor, ilacı doğrudan kanserli hücreye taşır ve böylece kemoterapinin yan etkilerini azaltmak mümkün hale gelir. Diğer benzer bir strateji ise radyo-immünoterapidir. Bu tedavi modelinde de belli antikorlar radyoaktif atomlara bağlanır ve ölümcül radyasyonu hedef kanserli hücreye taşır (Chen ve Emens, 2013).

2.4. DOĞAL ÜRÜNLER VE KANSER TEDAVİSİ

Kanser tedavisi için ilaç geliştirme çalışmalarında doğal ürünler önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Medikal kullanımdaki doğal ürünler ve bileşikler binlerce

yıldan bu yana bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir.

2.4.1. Tarihçe

Bilinen en eski yazı M.S. 2600 civarında antik Mezopotamya’da bulunmuştur ve yüzlerce kil tablet üzerine çivi yazısı ile yazılmıştır. Bu tabletler *Cedrus* türleri (Sedir), *Commiphora myrrha* (mürrüsafi) reçinesi, *Papaver somniferum* (haşhaş) suyu, 1000’e yakın bitkiden bahseder. Bu bitki ve formülasyonların birçoğu günümüzde halen kullanılmaktadır. M.S. 1550 civarına tarihlenmiş olan antik Mısır Ebers papirüsünde 800 civarı karmaşık reçete ve *Aloe vera* (aloe), *Boswellia carteri* (buhur) ve *Ricinus communis* (hintyağı) gibi ajanların da bulunduğu 700’den fazla doğal ajan bulunmaktadır. Hippokrat (M.Ö. 460-377 civarı) 400’den fazla doğal ajan toplamış ve bunların kullanım şeklini *Corpus Hippocratum*’da yayınlamıştır. Kavun suyunun laksatif, *Ornithogalum caudatum* (adasoğanı)’nın ise diüretik etkisinden bahsetmiş ve *Atropa belladonna* (güzelvrat otu)’nın özütünün nasıl anestetik olarak kullanılacağını anlatmıştır. Ayrıca, *Veratrum album* (beyaz marulcuk) özütünün antiemetik olarak (mide bulantısına karşı) kullanılmasını tavsiye etmiş, zeytinyağının yara iyileşmesindeki faydalarını anlatmıştır. Roma’lı doktorlar bu kapsamlı bilgilerin üzerine yeni bilgiler eklemiş ve kendi bakış açılarını oluşturmuştur. Pedanius Dioskorides, yaklaşık 600 bitki türevli ilacın dozunu ve etkisini açıklayan, Avrupa’da farmakolojinin temellerini attığı ‘*De Materia Medica*’yı derlemiştir. Bir başka ünlü Yunan hekim ve eczacı Galen ise, 540 bitki türevli ilaç kaydetmiş ve bitkisel özlerin sadece yararlı bileşenleri değil, aynı zamanda zararlı maddeleri de içerdiğini göstermiştir (Ji ve ark., 2009).

Bitkilerden elde edilen ilk etken maddenin 1805’te Alman kimyacı Serturme tarafından afyon bitkisinden izole edilen morfin olduğu, bunu 1820’de kınakının kabuklarından kinin, 1868’de yüksük otu (*Digitalin*) yapraklarından kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan digitalin ve 1890’da söğüt dalı kabuğundan asetil salisilik asidin izolasyonu takip ettiği bilinir (Baytop, 1984). Daha sonraları doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop, 1999; Başer ve

diğ, 2001; Kandemir ve Beyazoğlu, 2002; Ertuğ ve ark., 2004). Tedavi amacıyla kullanılan ve bilinen tıbbi bitki miktarının 20.000'e ulaştığı tahmin edilmektedir. Bunlardan 4.000 bitkisel ilaç yaygın bir şekilde kullanılırken, Avrupa'da 2.000 kadar bitkisel ilacın ticareti yapılmaktadır (Özgüven ve Şekeroğlu, 2007). Doğal ürün veri tabanlarında rapor edilen bileşiklerin sadece %41,4'ü biyolojik açıdan incelenmiştir (Shiezadeh ve ark., 2013).

Bitkiler, doğal ilaç hammade kaynaklarının önemli bir bölümünü kapsamaktadırlar. Kanser tedavisinde klinik olarak iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bitkilerden elde edilmiş bileşikler oldukça fazladır. Bu ilaçlar bitkilerin ham özleri veya onlardan izole edilmiş bileşiklerden üretilmiştir (Exposito ve ark., 2009; Ostermann ve ark., 2009; Liu ve ark., 2010; Ali ve ark., 2012; Tröger ve ark., 2012; Weissenstein ve ark., 2014; Iwamoto ve ark., 2015).

In vitro yöntemler ilaç buluşlarının temel taşı olmaktadır. Şu ana kadar doğal kaynaklardan izole edilen birçok ürün, *in vivo* ve/veya *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Ayrıca doğrudan bitkilerden hazırlanan özütler de tedavide önemli yer tutmaktadır. Birçok modern ilaç, kimyasal yollar ile modifiye edilmiş bitkisel kaynaklı moleküllerden geliştirilmektedir. Tam sentetik ilaçların yaklaşık yarısı, doğal bir ürünün aktif parçasını taklit eden, doğal ürünlerin analogları olarak üretilmektedir. Doğal bitkiler veya taklit ürünler, anti-kanser ilaçlar veya kanser kemopreventif, nutrasötikler, kozmesötikler olarak etkilere sahip olabilirler (Korkina ve Kostyuk, 2012). Kimyasal ilaçların yapımında büyük bir gelişme olmasına rağmen gelişmiş ülkelerde kanser tedavisi için yazılan reçeteli ilaçların %75'ini bitkisel kökenli etken maddeleri olan vinblastin, rezerpin, kinin, asetil salisilik asit (aspirin) gibi ilaçlar oluşturmaktadır (Mahata ve ark., 2012).

2.4.2. Kanser Tedavisinde Doğal Ürünlerin Kullanımı

Günümüzde anti-tümörojenik ve apoptotik etkisi kanıtlanmış birçok bitkisel kökenli bileşik tanımlanmıştır (Fulda ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2012; Korkina ve Kostyuk, 2012; Ramasamy ve ark., 2012).

Bitki kökenli anti-kanser ajanlar ile ilgili ilk çalışma Robert Noble ve Charles Thomas Beer tarafından, *Vinca rosea* olarak da bilinen *Catharanthus roseus*'tan elde

edilen vinka alkaloidler, vinblastin ve vinkristin üzerinde 1950'lerde gerçekleştirilmiştir (Mehdi ve ark., 2013). Günümüzde klinik kullanımda bulunan çoğu kanser kemoterapi maddeleri ya bitki kökenli ya da bitkisel kaynaklı bileşiklerin analoglarından elde edilmektedir. Örneğin, prostat kanserinde kullanılan kemoterapi ilaç sınıfından olan "Docetaxel", *Taxus baccata L.*'den (Adi Porsuk Ağacı) özütleme yöntemiyle elde edilmektedir ve D vitamini ile birlikte kemoterapide kullanılan doğal ürünlerdendir. Ginseng'in, kanserde anjiyogenezi ve ilaç direncini engellediği, tümör hücrelerinin tanınmasını arttırdığı, çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Sezgin, 2010). 1967 yılında (Monroe E. Wall ve Mansukh C. Wani) antimitotik etkiye sahip bileşik olarak *Taxus brevifolia* bitkisinin kabuğunda simbiyotik yaşayan bir mantarın sentezlediği antimitotik *taksol* izole edilmiştir. *Taksol* günümüzde akciğer, rahim ve meme kanseri olmak üzere pekçok kanser türünün tedavisinde kullanılmaktadır (Sgadari ve ark., 2000).

Bitkisel ürünler, sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahip olmalarına rağmen, toksisitelerinden tam olarak arınmış değildir (De Smet, 2004). Çeşitli bitkilerden elde edilen kimyasalların yapısal çeşitliliği, duyarlı ve dirençli fenotiplere sahip farklı kanser hücre tiplerinin ayrılmasında potansiyel bir öneme sahiptir. Bitkisel ürünlerin antikanser biyoaktivitelerinin tespiti için bitkilerin farklı kısımlarından (kök, gövde, yaprak, çiçek veya tohum gibi) özütler hazırlanarak öncelikle bitkinin sitotoksik etkisi araştırılmakta, daha sonra bitkilerin bileşikleri izole edilip etken maddeler tayin edilmektedir (Nemati ve ark., 2013).

Anti-kanser ilaçların birçoğu doğal ürünlerin taklitleri olarak üretilir ve bu ürünler ikincil metabolitler olarak tanımlanır. Yüksek bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin veya ikincil metabolitlerin tümöröenez üzerindeki etkileri *in vitro*'da kanser hücreleri üzerinde veya *in vivo*'da deneysel tümör modeli oluşturulan hayvanlar üzerinde araştırılmaktadır (Korkina ve Kostyuk, 2012).

Birçok geleneksel anti-kanser ajanların birincil sitotoksik etki mekanizması DNA hasarı ve apoptozun uyarılmasına dayanmaktadır. Kanser hücreleri, sitotoksik reaksiyonlara hücre döngüsü engellenmesi veya gecikmesi ile de cevap verebilir. Kemoterapötik maddelerin hızlı bölünen normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi ve bölünmeyi durdurmaları nedeniyle saç dökülmesi, bitkinlik, enfeksiyon vb. gibi yaygın yan etkiler görülebilir (Weissentein ve ark., 2014).

Bitkisel kökenli anti-kanser ilaçlardan az sayıda ajan klinik olarak kullanılmak üzere FDA (Food and Drug Administration - Gıda ve İlaç Dairesi)'dan onay almıştır. Bunlar için prostat tümörlerinde kullanılan *finasterid* ve meme tümörlerinde kullanılan *tamoksifen* örnek verilebilir. Birçok ikincil bitki metabolitlerinin *in vitro* ve hayvan deneylerinde kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engellediği, transforme hücrelerin apoptotik potansiyelini arttırdığı ve tümör hücrelerinin pro-anjiyogenik/metastatik potansiyelini düzenleme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlardan kemoterapide geniş çapta kullanılan *paklitaksel*, *vinblastin*, *vinkristin*, *etoposid*'e ek olarak son zamanlarda *artemisinin*, *kannabioide*, *resveratrol*, *kamptotesin* gibi bazı bileşikler klinik denemelerde kullanılmaya başlamıştır (Korkina ve Kostyuk, 2012).

Bitkiler, ilaç tedavisi ve diğer uygulamalarda potansiyel bir kullanıma sahip olan yeni kimyasal bileşiklerin kaynağını oluşturmaktadır. Bitkiler; alkaloidler, steroidler, taninler, glikosidler, uçucu yağlar, sabit yağlar, reçineler, fenoller ve flavonoidler gibi bileşikler yaprak, çiçek, ağaç kabuğu, tohum, meyve, kök gibi özel bölgelerde biriken birçok aktif bileşik içermektedirler. Bitki materyallerinin tedavi edici etkileri bu ikincil ürünlerin kombinasyonu ile ortaya çıkarılmaktadır (Kma, 2013).

2.4.3. Doğal ürünlerden özüt hazırlama yöntemleri

Çeşitli kanser hücre soylarında sitotoksik veya anti-kanser aktiviteye sahip bitki kökenli ürünlerin potansiyel etkilerini belirleyebilmek amacıyla, bitki özütleri (ekstre) farklı şekillerde hazırlanmaktadır. Özütleme (ekstraksiyon), standart işlemler ile seçici çözücüler kullanılarak bitki ya da hayvan dokularındaki inaktif bileşenlerden aktif bileşenleri ayırmak için kullanılan bir yöntemdir (Handa ve ark., 2008). Özütleme, doğal bileşiklerden ilaç formülasyonlarının hazırlanmasındaki ilk önemli adımdır. Modern özütleme yöntemleri, geleneksel bitkisel ilaçların gelişiminde oldukça etkilidir.

Bir bitki materyalinin özütlenmesi ve bileşiklerinin izole edilmesi aşağıdaki temel aşamaları kapsar (Gupta ve ark., 2012):

1. Toplama ve bitki materyalinin doğruluğunu kanıtlama
2. Kurutma
3. Boyut küçültme
4. Ekstraksiyon

5. Filtrasyon
6. Konsantrasyon
7. Kurutma ve sulandırma

Çeşitli bitkisel özütlerin farklı hazırlanış şekillerine göre (suda, etanolde, metanolde, kloroformda, heksanda, diklorometanda) farklı kanser hücre soylarında farklı etkilere sahip olduklarını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Örneğin, Arizona kaktüsünün (*Opuntia ficus-indica*) meyvesi olan kaktüs armudunun sulu özütünün HeLa hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu, kaktüs armudunun %1'lik solüsyonunun HeLa hücrelerinin %40-60'ını öldürdüğü, %5'lik solüsyonunun ise 5. günde hücrelerin tamamını öldürdüğü gösterilmiştir (Zou ve ark., 2005). *Paulownia coreana*'ın yapraklarından elde edilen kloroform özütünün HeLa hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Jung ve ark., 2012). *Goniothalamus macrophyllus*'un diklorometan özütünün HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak araştırılmış ve hücreler üzerinde iyi bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Alabsi ve ark., 2012; Kma, 2013).

2.5. TIBBİ KULLANIMDAKİ ENDEMİK TÜRLER

Yeryüzünün belirli bir bölgesinde yaşayan ve başka sahalarda rastlanmayan bitki ve hayvan türleri “endemik tür” olarak isimlendirilir. Endemik bir tür boyutu çok dar ya da çok geniş bir alan olabilir. Önemli olan, söz konusu bitki veya hayvan türünün yayılışının belirli bir bölgede olmasıdır. Ters durumlarında endemizmden söz edilemez. Canlılar doğal engellerle karşılaştıkları zaman, yayılışları kesintiye uğrar ve endemik topluluklar parçalanarak farklılaşır. Parçalanmış yaşam alanlarında gelişen türlerin gen yapıları değişerek yeni türler ortaya çıkar. Bir sahadaki endemizm oranı o alanın jeolojik yaşına, izolasyon derecesine ve süresine, ayrıca topografik özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bölge jeolojik olarak ne kadar yaşlı ise, orada çok öncelere ait flora veya fauna izleri bulma olasılığı da o kadar yüksek olur (Erinç, 1978).

Değişik ülkelere ait olan özel bitkiler, günümüzde çok farklı yerlerde yetiştirilebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), insanların %60'ının sağlık sorunları karşısında bitkilerden ilaç olarak yararlandığını tahmin etmektedir. Anadolu

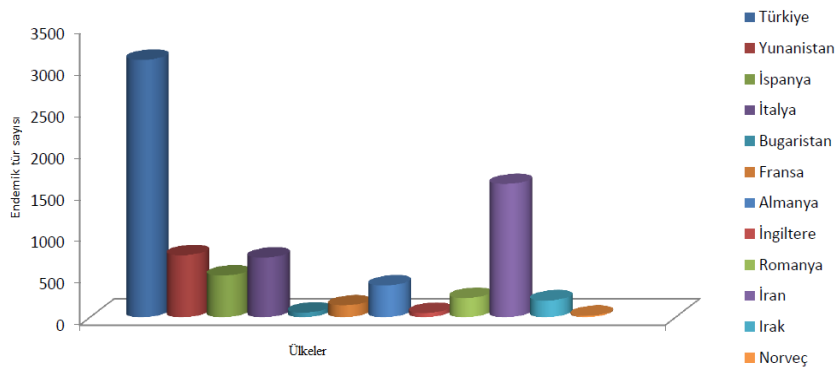
da bulunduğu doğal konumu sebebiyle birçok özel bitki florasına sahiptir. Halen yapılan çalışmalar ile yeni türler bulunmakta ve tanımlanmaktadır (Avcı, 2005).

2.5.1. Türkiye’de Endemik Bitki Çeşitliliği

Türkiye, dünyada bulunduğu coğrafik konum açısından birçok doğa özelliğini bulunduran bir ülkedir. Ülkemiz, Avrupa ve Asya’nın birleştiği yerde üç tarafı denizlerle çevrili, önemli bir coğrafik bölgenin üzerinde konumlanmıştır. Değişik iklim ve toprak özellikleri gösterir ve buna bağlı olarak da farklı coğrafik bölgelere ayrılmıştır. Bu bölgelere göre endemik bitki türlerinin dağılımı da değişmektedir.

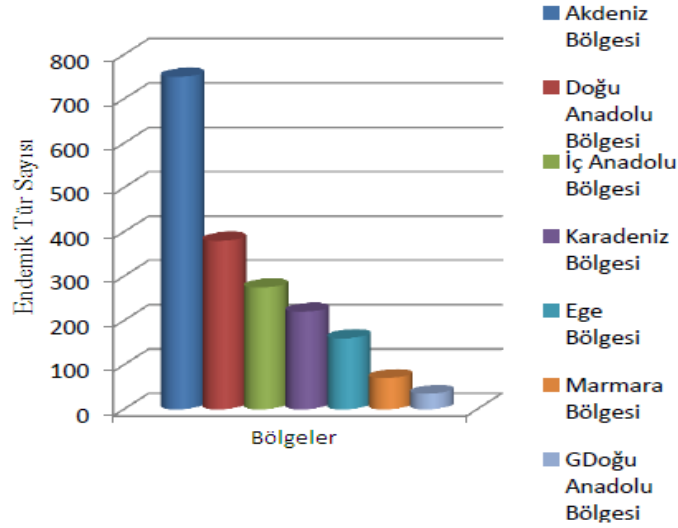
Türkiye iklim olarak ılıman kuşakta yer almaktadır. Bitki çeşitliliği açısından diğer ılıman kuşak ülkeleri arasında önemli bir yere sahip olan bitki florasının 1/3 kadarı endemik bitkilerden oluşmaktadır. Endemik türlerin bazıları dünyada önemli ekonomik değerlere sahiptir. Bu nedenle ülkemizde yetişen endemik türlerin korunması büyük önem taşımaktadır (Rigg ve ark., 2005).

Türkiye, coğrafi özelliklerine bağlı olarak çok fazla bitki çeşitliliğine sahiptir. Yapılan araştırmalarda 12.000’in üzerinde bitki taksonu (sınıfı) olduğu ve endemizm oranında %34 ile dünyada çok önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (Avcı, 2005). Türkiye, başka ülkelerle karşılaştırıldığında bu çeşitlilik daha da iyi anlaşılmaktadır. Şekil 2-2’de görüldüğü gibi Yunanistan, Avrupa kıtasında 800 ile en fazla endemik türe sahipken, Türkiye’de 3000’den fazla endemik tür bulunmaktadır (Karagöz ve ark., 2010).



Şekil 2-2: Ülkelere göre endemik tür sayıları (Yoğunoğlu, 2011’den).

Türkiye'nin endemik tür sayısı diğer ülkelere göre çok fazladır (Şekil 2-3). Topraklarımızda yetişen 100'den fazla bitki türünün geniş değişim gösterdiği 5 mikro gen merkezi vardır. Bunlar dünya üzerinde kültürü yapılan birçok bitkinin gelecekte yetiştirilebilmesi için önemli genetik kaynaklardır (Atik ve ark., 2010).



Şekil 2-3: Türkiye'deki coğrafi bölgelere göre endemik türlerin dağılımı ve sayısı (Yoğunoğlu, 2011'den).

Çeşitlilik açısından 1. bölge Akdeniz Bölgesi olup, en az endemik türe sahip bölge Güneydoğu Anadolu Bölgesidir (Yoğunoğlu, 2011).

2.5.2. *Centaurea* cinsi

Centaurea cinsi, Asteraceae familyasının Cyanaraceae tribusunda yer alan tek yıllık, iki yıllık ve çok yıllık otsu bitkilerdir (Davis, 1975; 1988; Güner, 2000). *Centaurea* cinsinin aynı veya farklı türleri farklı yörelerde yaşayan halk tarafından Çobangalgıdan, Acımık otu, Mavi Süpürge çiçeği, Peygamber düğmesi, Acımık, Gökbaş, Peygamber çiçeği, Kotankıran, Çandır diken, Deve diken, Eşek çalısı, Deligöz diken, Yaban diken, Eşek diken, Çakırdiken, Çalı süpürgesi, Gelindili, Sarı diken, Zerdal diken, Kötürüm, Çoban diken, Çobançökerten, Yandak diken, Deniz geveni, Kavgalaz diken, Kaynana dili gibi farklı isimlerle tanımlanmaktadır (Tuzlacı, 2006).

Centaurea cinsi (Asteraceae), özellikle Akdeniz Bölgesi ve Batı Asya'da olmak üzere dünya çapında 600'den fazla tür içermektedir. Bu cins, Türkiye'de 120'si yerli olmak üzere 180'den fazla tür ile temsil edilmektedir. Bu nedenle Türkiye, *Centaurea* için ana gen merkezidir (Aktümsek ve ark., 2013).

Centaurea türleri halk arasında özellikle kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı olarak, karaciğer ve böbrek rahatsızlıklarının tedavisinde, nefes darlığı, ülser ve sıtma hastalığı tedavisinde, baş, göz ve boğaz ağrılarının giderilmesinde, göz çevresinde görülen şişliklerin tedavisinde, sinüs enfeksiyonlarında, yılan ısırıklarına ve akrep sokmasına karşı, dikenleri siğile batırılarak siğillerin yok edilmesinde kullanılır (Baytop, 1999; Tuzlacı, 2006).

Centaurea türleri üzerinde yapılan çalışmalar ile bu türlerin yukarıda belirtilen etnobotanik kullanımlarını destekleyen antienflamatuvar, antipiretik, antitülserojenik ve antimalaryal etkilerinin yanında, antimikrobiyal, antiviral, düz kaslar üzerinde antispazmodik, hipoglisemik, immünolojik, nörotoksik, sitotoksik, vazodilatör, antidiyareik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Arif ve ark., 2004). *C. pulchella*, *C. drabifolio*, *C. triumphetti*, *C. depressa* ve *C. virgata* dahil olmak üzere birçok *Centaurea* türü tıbbi amaçlar için geleneksel olarak kullanılmaktadır. *C. triumphetti* ve *C. urvillei* subsp. *stepposa*'nın bazal yaprakları gıda maddesi olarak kullanılmakta ve taze iken yenmektedir. Ayrıca *C. iberica*'nın taze kökü, diğer kısımlarının soyulmasının ardından yenilebilmektedir (Aktümsek ve ark., 2013).

Aynı cinse ait değişik türlerde değişik etken maddelerin farklı dozlarda olabileceği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Aktümsek ve ark., 2011; Chicca ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012; Salla ve ark., 2013). Bu farklılıklar sıcaklık, toprak içeriği ve rakım (yükseklik) gibi çeşitli faktörlere bağlanmıştır.

Çeşitli *Centaurea* türleri ile bitkinin çeşitli bölgeleri uçucu yağ bileşimi, antioksidan kapasitesi ve ikincil metabolitlerinin tespiti için araştırılmıştır (Aktümsek ve ark., 2013). *Centaurea* türlerinin çoğunlukla toprak üstü kısımları çalışılmıştır. *Centaurea* cinsine ait olan türlerde genel olarak gayanolit, germakranolit, elemanolit ve ödesmanolit yapılarındaki seskiterpen lakton bileşikler, çok sayıda metoksi ve hidroksi grubu taşıyan flavonoidler ve lignanlar taşındıkları bulunmuştur (Zapesochneya ve ark., 1977; Ferguson ve ark., 2003; Trendaflova ve ark., 2007; Djeddi ve ark., 2008). *Centaurea* cinsi bitki türlerinden elde edilen uçucu yağlar veya özütünden izole edilen bazı bileşiklerin antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği saptanmıştır (Köse ve ark.,

2007; Djeddi ve ark., 2008; Rosselli ve ark., 2009). *Centaurea* cinsine ait bitki tohumlarından izole edilen lignan sınıfı bileşiklerin antioksidan özellik gösterdikleri ancak içlerinden bazılarının bu etkilerine ek olarak sitotoksik özelliklere sahip olduğu da ileri sürülmüştür (Forgo ve ark., 2012).

Centaurea cinsi ile total fenolik ve flavonoid içeriğini belirlemek, farklı *in vitro* testler kullanarak antioksidan özelliklerini gözlemlemek, bitkinin yağ asidi bileşimlerini tanımlamak amacı ile yapılan çalışmalar vardır (Tepe ve ark., 2006; Karamenderes ve ark., 2007; Aktümsek ve ark., 2013). *Centaurea*'da 30 adet özgün yağ asidi tanımlanmıştır. Araştırılan yağlar içerisinde linoleik ve linolenik asit içeriğinin total yağ asitleri içinde %30'luk bir değeri olduğu görülmüştür. *C.salicifolia* subsp. *abbreviata* ve *C. babylonica*'daki palmitik asit %29,3-%40,4 oranında iken, *C. pseudoscabiosa* subsp. *araratica* ve *C. pulcherrima* var. *pulcherimma* ise %29,81-%29,93 oranında linoleik asit bakımından zengindir (Aktümsek ve ark., 2011). Bu yağ asitleri insan vücudunda sentezlenmediğinden, *Centaurea* türlerinde bulunmaları oldukça önemli ve değerlidir.

Centaurea türleri önemli etken maddelere sahip olmalarından dolayı fonksiyonel besin formülasyonları için önemli bir kaynak oluşturabilecekleri düşünülmektedir.

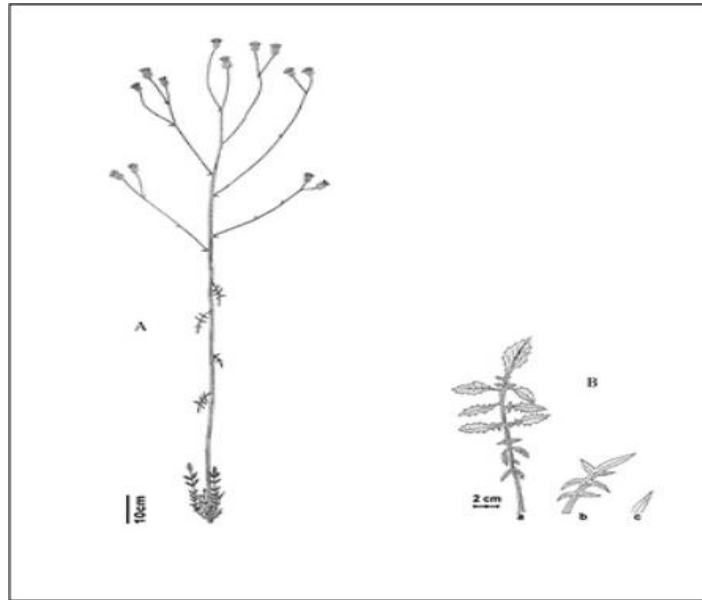
2.5.2.1. *Centaurea nerimaniae*

Centaurea cinsi, Türkiye'deki en zengin bitki çeşitidir. Bu bitki % 64'ü endemik olan 198 tür tarafından temsil edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan *Centaurea nerimaniae* (*C. nerimaniae*) Türkiye'nin İçel ili kuzeybatısında, Arslanköy ilçesine yakın Bolkar Dağı'ndan 2004 yılında toplanmıştır (Şekil 2-4). *C. nerimaniae* Güney Anadolu'ya endemiktir ve bir Akdeniz bitkisidir (Şekil 2-5). Bu yeni tür, Türk florasının araştırılması ve korunmasına değerli katkıları için Türk botanikçi Prof. Dr. Neriman ÖZHATAY onuruna adlandırılmıştır (Kültür, 2010).

C. nerimaniae bitki özütünün kimyasal bileşenleri henüz belirlenmemiş olup, bu bitki türü ve özütü ile ilgili herhangi bir *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışma bulunmamaktadır. Bu bitkinin özütü, HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre soyları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması amacıyla ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır.



Şekil 2-4: *Centaurea nerimaniae* sp. (Kültür, 2010).



Şekil 2-5: *C. nerimaniae* sp. (Kültür, 2010).

(A: tüm bitki yapısı, B: yapraklar; a: alt kısım, b: orta kısım, c: üst kısım)

***C. nerimaniae* bilgileri**

İsimlendirme: *Centaurea nerimaniae* Ş. Kültür sp. nov. (Asteraceae)

Lokalizasyon: C5 İçel, Mezitli-Arslanköy arası, Mezitli'den 30 km sonra, 900 m yükseklikte

Toplayan: Şükran Kültür ve Tuncay Kültür

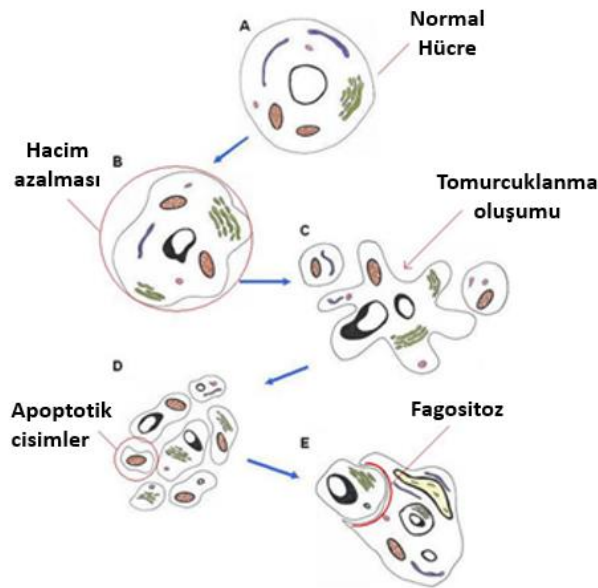
Teşhis eden: Şükran Kültür

Kodu: ISTE 98163

2.6. APOPTOZ

Apoptoz (programlı hücre ölümü), hücre proliferasyonunun kontrolü için veya DNA hasarına yanıt olarak hücrelerin seçtiği fizyolojik bir ölüm şeklidir. Embriyogenez, morfogenez, normal doku yenilenmesi gibi fizyolojik olaylar sırasında ya da çeşitli patolojik koşullarda hücre içi veya hücre dışı uyaranlar ile tetiklenebilmektedir.

Apoptozun tipik morfolojik özellikleri; hücre büzülmesi, hücre membranının tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu ve nükleus parçalanmasıdır (Şekil 2-6). Apoptozun erken evrelerinde hücre yüzeyinde birtakım değişiklikler ortaya çıkar. Plazma membranının iç yüzünde yer alan Fosfatidilserin (PS) membran dışına taşınır. Makrofajlar veya komşu hücreler, apoptotik hücreleri yüzeydeki bu molekülleri tanıyarak fagositoz ile yutarak ortadan kaldırırlar. Bu temizlik süreci organizmaların gelişimi ve homeostasisi için önemlidir. Annexin-V, fosfatidilserin'e bağlanan rekombinant bir protein olup, PS uçlarıyla güçlü bir şekilde etkileşir ve apoptozun tespitinde kullanılabilir. Apoptotik hücrenin bu şekilde yok edilmesi inflamasyon oluşumunu engeller. Bu işlem sonucunda veya sırasında oluşabilecek herhangi bir hata veya yetmezlik sonucunda çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir. (Hacker, 2000; Ziegler ve Groscurth, 2004; Elmore, 2007; O'Brien ve ark., 2008; Öztürk, 2009; Öztürk, 2011; Galuzzi, 2012).



Şekil 2-6: Apoptoz morfolojisi (<http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/>den uyarlama).

1.1.1. Apoptoz mekanizmaları

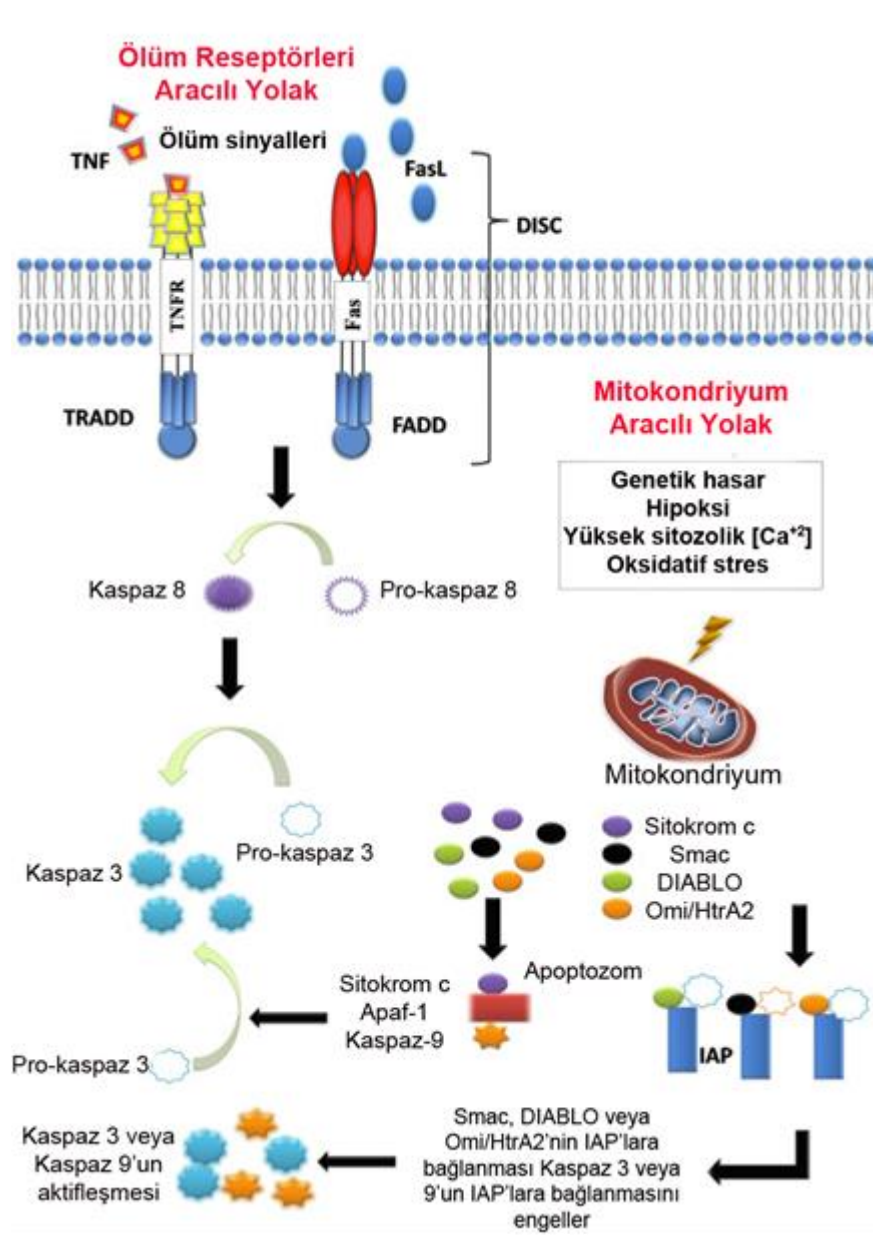
Apoptotik hücre ölümünde hücre içi veya hücre dışından gelen ölüm uyarılarına göre esas olarak iki hücresel mekanizma iş görür.

- 1) Ölüm reseptörleri aracılı yolak
- 2) Mitokondriyum aracılı yolak

Ölüm reseptörleri aracılı yolak: Hücre dışı ölüm sinyalleri toksinler, hormonlar, büyüme faktörleri eksikliği veya sitokinler olabilir. Hücre membranında yer alan ölüm reseptörleri (TNFR-1, Fas/CD95, TRAIL1, TRAIL2) ligandları ile etkileşerek ölüm sinyallerini hücre içine iletir. Ölüm reseptörlerinin sitoplazmik bölgelerinde yer alan ölüm bölgesi (death domain - DD) aktifleşerek sitoplazmadaki bir aracı protein ile etkileşir ve ardından kaspaz aktivasyonu gerçekleşir (Şekil 2-7). Örneğin Fas reseptörü Fas ligandı ile etkileştiğinde reseptörün sitoplazmik ucundaki DD uyarılır ve Fas ilişkili ölüm bölgesi içeren (FADD) adaptör protein ile etkileşerek ölüm sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleksi tanıyan bölgelere sahip olan prokaspaz-8 DISC'e bağlanır ve aktif kaspaz-8'e dönüştürülür. Kaspaz-8 de kaspaz-3'ü aktifleştirir. Bunun sonucunda birçok hücresel protein ve DNA yıkılarak apoptoz gerçekleşir. Bazı koşullarda ölüm reseptör yolağı ile alınan ölüm sinyali, mitokondri yolağı ile bağlantı kurabilir ve iki yolak birlikte çalışabilir. Özellikle DISC kompleksi kaspaz-8'i aktifleştirmede yetersiz kaldığı zaman kaspaz-8 Bid'i keser ve tBid oluşur. Bu da mitokondri membranına yerleşerek mitokondriyal yolağın tetiklenmesine neden olur. (Hacker, 2000; Ziegler ve Groscurth, 2004; Elmore, 2007; O'Brien ve ark., 2008; Öztürk, 2009; Öztürk, 2011; Galuzzi, 2012).

Mitokondriyum aracılı yolak: Büyüme faktörü eksikliği, hücre içinde aşırı kalsiyum (Ca^{+2}) birikimi, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi etkenler bu yolağı tetiklemektedir. Hücre içinden gelen ölüm sinyalleri ile Bcl-2 protein ailesinin kontrolünde olan mitokondriyum membranlarındaki porların geçirgenlik kontrolü bozulur ve mitokondriyumun membranları arasındaki alanda yerleşik olan sitokrom-c, AIF (apoptoz tetikleyici faktör) Endo-G, Smac/DIABLO, Htr/Omi gibi pro-apoptotik proteinler mitokondriyumdan sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınması geri dönüşümsüz bir adımdır (Şekil 2-7). Salınan sit-c, sitoplazmada

prokaspaz-9 toplayan adaptör protein Apaf-1 ile birlikte multimerik kaspaz aktifleştirici apoptozom kompleksini oluşturur, burada kaspaz-9 aktifleşir ve kaspaz-3'ü aktifler, ardından apoptotik yıkımlar başlar. Birçok hücrel protein ve DNA parçalanır. Smac/Diablo ve Htr2A/Omi, apoptoz inhibitör proteinlerinin negatif düzenleyicisidir. AIF ve Endo-G nükleusa taşınır ve DNA'nın fragmentasyonuna yol açan kromatin parçalanmasını başlatır. (Hacker, 2000; Ziegler ve Groscurth, 2004; Elmore, 2007; O'Brien ve ark., 2008; Öztürk, 2009; Öztürk, 2011; Galuzzi, 2012).



Şekil 2-7: Apoptoz mekanizmaları (Wong, 2011'den uyarlama).

2.6.1. Apoptozun kontrolünde rol alan proteinler

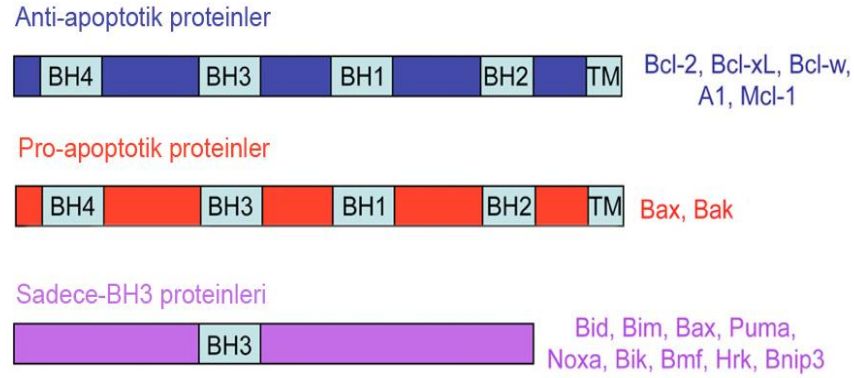
Apoptozun mitokondriyal olaylarının düzenlenmesi ve kontrolü Bcl-2 protein ailesinin üyeleri tarafından gerçekleştirilir. Bcl-2 protein ailesi hücrenin kaderinde önemli rol oynayan bir kontrol noktasında bulunur. Birçok durumda, apoptoz yollarının etkinleşmesi kaspazların aktifleşmesine yol açar. Apoptozun gerçekleşmesinde kaspaz ailesinden birçok proteaz iş görür. Apoptoz inhibitör proteinleri (IAP'lar) birçok uyarana karşı, hücrel IAP'lar kaspazların doğrudan inhibitörü olarak görev yapar. Tümör baskılayıcı protein olan p53'ün de apoptoz süresince Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunmaktadır. (Hacker, 2000; Ziegler ve Groscurth, 2004; Elmore, 2007; O'Brien ve ark., 2008; Öztürk, 2009; Öztürk, 2011; Galuzzi, 2012).

2.6.1.1. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesine ait proteinler mitokondri bütünlüğün korunmasında ve mitokondriye ait proteinlerin sitoplazmaya salınımının kontrol edilmesinde önemli rol oynarlar. Bcl-2 ailesi iki alt grupta toplanır; proapoptotik proteinler (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bmf, Hrk, Bik, Bok) ve antiapoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-B/Bcl2L10) (Şekil 2-8). Hücreler antiapoptotik ve proapoptotik Bcl-2 proteinlerinin dengesine bağımlı olarak apoptotik uyarılara karşı duyarlıdır. Proapoptotik Bcl-2 proteinleri hücrel hasar veya strese karşı sensör olarak görev yaparlar ve sitozolde bulunurlar. Hücrel stres uyarıları ile mitokondri yüzeyine göç ederler. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki etkileşim ile mitokondri membranlarındaki porların geçirgenlik kontrolü bozulur, mitokondriye özel bazı proapoptotik moleküller (Smac/Diablo, AIF, Endo-G ve sitokrom-C) bu porlardan sitozole kaçarlar ve apoptotik ölüm adımları ilerler.

Bcl-2 ailesinin homoloji gösteren, 4 ortak bölüm içeren “BH” bölgeleri (BH-1,-2,-3,-4) dimerizasyon işlevlerinde ve apoptozun kontrolünde önemlidir. Apoptotik uyarıya yanıt olarak öncelikle sadece-BH3 proteinleri, transkripsiyonel uyarım yolu ile (Bax, Noxa, Puma), proteoliz yolu ile (Bid), yeni bir hücrel yerleşim kazanarak (Bim, Bmf) veya defosforile olarak (Bad) aktiflenirler. Aktifleşen sadece-BH3 proteinleri

antiapoptotik Bcl-2 üyelerini baskılayarak apoptotik hücre ölüm mekanizmasını çalıştırır (Dewson ve Kluck, 2000; Petros ve ark., 2004).

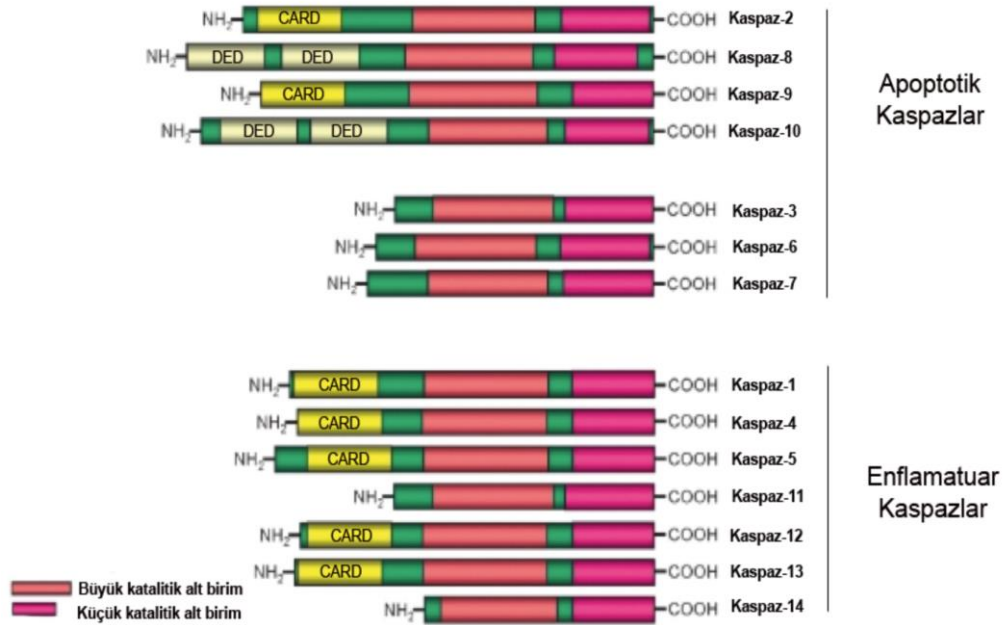


Şekil 2-8: Bcl-2 ailesi proteinleri (Martinou ve Youle, 2012'den uyarlama).

2.6.1.2. Kaspazlar

Kaspazlar, proteinleri aspartik asit bölgelerinden proteolitik olarak kesen sistein-aspartil proteazlardır. Sitoplazmada inaktif halde bulunurlar ve çeşitli uyarılarla aktifleşirler. Kaspaz şalesi oluşturarak apoptozun ilerlemesine katılırlar. Apoptozun hem morfolojik hem de biyokimyasal değişikliklerinden sorumludurlar. Hücreye ait yapısal ve fonksiyonel birçok sitoplazmik ve nuklear proteinlerin, ayrıca nuklear DNA'nın yıkılmasını gerçekleştirirler. Memelilerde kaspaz ailesinin 14 farklı üyesi bulunmuştur. Apoptozdan sorumlu kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9, -2, -10, -12) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) olmak üzere iki alt grupta toplanırlar (Şekil 2-9). Diğer kaspaz ailesi üyeleri kaspaz-1, -4, -5, -11 ve -13 ise *enflamatuar* kaspazlardır. Ölüm uyarıları başlatıcı kaspazları aktifleştirir, başlatıcı kaspazlar da efektör kaspazları uyarırlar. Başlangıç kaspazları olan kaspaz-8 ve -10, ölüm efektör bölgeleri (DED) ile, kaspaz-9 ve -2 ise (CARD) bölgeleri ile aktifleşirler. Hücresel yıkımdan sorumlu olan *efektör kaspazlar*, kaspaz-3,-6 ve -7'dir ve başlatıcı kaspazlar tarafından aktifleştirilir. Aktif kaspaz-3 bir seri hücresel proteinin yıkımı ile hücre ölümünün biyokimyasal ve morfolojik aşamalarının tamamlanmasında kilit rol oynar. Apoptozun en önemli belirteçlerinden birisi de nukleustaki DNA'nın internukleozomal

bölgelerden kırılmasıdır. Kaspaz-6 ve -3, nuklear parçalanmayı gerçekleştirir. Kaspaz-3, ICAD'i (kaspazla aktifleşen DNaz inhibitörü) serbestleştirir ve CAD (kaspaz bağımlı DNaz), kromatini internukleozom bölgelerinden kırarak nukleusun apoptotik parçalanmasını sağlar. Apoptoz tayininde DNA'nın nukleozomal üniteler şeklinde parçalara ayrılması jel elektroforezinde özel bir DNA bant şekli ile (DNA merdiven görüntüsü) ile tespit edilir. Kaspaz-6 ise nukleer laminlerin yıkılmasında, ardından kromatin yoğunlaşmasında ve nukleusun apoptotik parçalanmasında önemli rol oynar (Zhivotovsky, 2003; Salvesen ve Riedl, 2008).



Şekil 2-9: Kaspaz ailesi (Lavrik ve Krammer, 2009'den uyarlama).

2.7. KANSER VE APOPTOZ

Yetişkin insan vücudunda her saniye mitoz ile yüzbinlerce yeni hücre oluşurken, homeostasinin sağlanması adına bir o kadarı da apoptoz ile ölmektedir. Apoptotik sinyallerdeki bozukluk çeşitli hastalıklarda birinci veya ikinci düzeyde rol oynayabilir.

Kanser, normal bir hücreyi malign bir hale çeviren değişiklikler/mutasyonlar nedeniyle, hücrelerin sayısının aşırı artmasına, apoptozun azalmasına veya apoptoza

direnç gösterilmesine neden olan bir hastalıktır. Bcl-2 ailesine ait proteinlerin anormal çalışması kanserde sıklıkla görülmektedir. Bcl-2 birçok kanser türünde aşırı ifade edilmekte ve apoptozun doğrudan baskılanmasına yol açarak kanserin gelişimine neden olmaktadır. Bcl-2 proteinin aşırı şekilde ifade edilmesi hematopoetik hastalıklarda sıklıkla görülmektedir.

Bax, Bak ve Bad gibi proapoptotik genlerdeki mutasyonlar veya aktivasyon değişiklikleri birçok kanser tipi ile ilişkilidir. İnsana özgü kanserlerin neredeyse yarısında onkogen etkinleşmesine, hipoksiye ve özellikle DNA hasarına bağlı olarak p53 mutasyonları görülmekte ve bu da büyümenin durmasına ve/veya apoptozun uyarılmasına neden olmaktadır. p53'ün hedef genleri arasında p21, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1 ve Fas bulunur. p53 aynı zamanda Bcl-2, Bcl-XL veya Survivin gibi antiapoptotik proteinlerin de ifadesini baskılar. Transkripsiyondan bağımsız p53 apoptoz yollarında p53 mitokondriye göç eder, Bcl-XL ile etkileşir, porların permeabilizasyon kontrolü bozulur ve sitokrom-c'nin salınmasına neden olur. Bim, Raf/Mek/Erk yolağını baskılayarak melanoma hücrelerinin öldürülmesinde önemli bir rol oynar.

Moleküler mekanizmaları hızlıca çözülen apoptotik hücre ölümünün engellenmesi veya uyarılmasına yönelik yeni teşhis ve tedavi modelleri geliştirilmektedir. Proapoptotik veya antiapoptotik genlerin mutasyonları ile veya bu moleküllerin yokluğu ya da aşırı ifadeleri ile apoptoz mekanizmasının bozulabildiği ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı bir çok çalışma ile gösterilmiştir. Apoptoz yolları gen tedavisi, antisens stratejiler, rekombinant bileşikler, klasik organik kimyasallar kullanarak engellenerek veya uyarılarak tedavi amacıyla birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır. Kanser tedavisinde çok sayıda geliştirilmiş ve piyasa sürülmüş olan apoptoz ile ilişkili ilaçlar bulunmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu, apoptozu kontrol eden genlerin ekspresyonları üzerine etkilidirler. Deneysel modeller ile hücre ölüm reseptörlerine agonist veya antagonist rekombinant moleküller ile ölüm reseptörlerinin işlevlerinin baskılandığı veya uyarıldığı gösterilmiştir. TRAIL agonistleri ile kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde klinik çalışmalar hızla devam etmektedir. Meme epitelinde Bcl-2 ekspresyonu östrojene bağımlıdır ve anti-östrojen etkili *tamoksifen*'in kullanımı ile meme kanserlerinde Bcl-2 ekspresyonları baskılanır ve apoptoz uyarılır. Bir diğer ajan olan *vitamin D* ve sentetik analogları, vitamin D reseptörlerini uyarır ve çoğu

antiapoptotik Bcl-2 ailesine ait genin, örneğin Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1'in ekspresyonunu baskılar. (Lockshin ve Zakeri, 2007; Hanahan ve Weiberg, 2011; Öztürk, 2009; Öztürk, 2011; Goldar, 2015).

2.8. HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİSİTE

Sitotoksiste, ölüm mekanizmalarından bağımsız kimyasal bir bileşiğin hücre öldürme özelliği olarak tanımlanır. Sitotoksiste testi, etken bir maddenin kanser hücreleri üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir yöntemdir. Geleneksel tedavi modelleri içinde yer alan sitotoksik kemoterapi, hala birçok kanser türü için tercih edilmektedir (Kumar ve ark., 2012). Kemoterapi amaçlı kullanılmakta olan sitotoksik maddeler, bölünme evresindeki bir hücreyi, G₀ fazındaki bir hücreye oranla daha fazla etkilemektedir. Bu nedenle, sitotoksik etkinin saptanması büyük önem taşımaktadır. Potansiyel antikanser bileşikler için yapılan tarama çalışmalarında sitotoksiste mümkün olan en düşük konsantrasyonda taranmalıdır (Mycek, 1998; Alabsi ve ark., 2012).

Sitotoksik etki, tümör hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesini önlemek amacıyla antikanser tedavilerde tercih edilir. Kullanılan sitotoksik ilaçlar, hücre çoğalmasının kontrolünde rol oynayan kinazlar, membran reseptörleri veya hücre içi sinyal moleküllerinin işlevlerine müdahale eder. Bu nedenle sitotoksik bir etki, hücre ölümünün uyarılmasından önce hücre büyümesi ve bölünmesini engelleyerek durdurmaktadır (Kustermann ve ark., 2013).

Hücre canlılığının ölçümü, hücre biyolojisinde temel adımdır. Sitotoksitenin saptanmasında çeşitli analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Klasik olarak Tripan mavisi testi, LDH testi, Nötral kırmızı testi, MTT, MTS, WST-1, XTT testleri gibi hücre canlılığını ve sitotoksiteyi tespit etmekte kullanılan birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerin yanı sıra son yıllarda hassas analizler yapabilen sistemler geliştirilmiştir (Berridge ve ark., 2005; Stoddart, 2011).

Klasik sitotoksik analiz yöntemleri:

Tripan Mavisi: Vital olmayan bir boyadır ve membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde birikmektedir. Tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin sayısı Hemositometre ile mikroskop altında tespit edilmektedir (Drake ve ark., 1972).

LDH Testi (laktat dehidrojenaz): LDH sızma testi, ekstraselüler medyumdaki laktat dehidrojenaz ölçümüne dayanmaktadır. İntraselüler LDH'nın kaybı (azalışı) ve kültür medyumuna salınımı, hücre membran hasarına bağlı olarak meydana gelen geridönüşümsüz hücre ölümünün belirteci olmaktadır (Koh ve Choi, 1987).

Nötral Kırmızı Testi: Nötral kırmızı, vital bir boyadır. Canlı hücrelerin içerisinde birikerek yaşayan hücrelerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Nötral kırmızı ile boyanan canlı hücrelerin oranı Hemositometre ile mikroskop altında sayılarak tespit edilmektedir (Borenfreund ve Puerner, 1985).

MTT (3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) Testi: Temel olarak, çoğalan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan (mor renkli) üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak spektrofotometre ya da ELISA okuyucu ile ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Formazan ürünü hücre membranları için geçirgen değildir, bu nedenle sağlıklı hücrelerde birikmektedir (Mossman, 1983).

MTS (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolyum) Testi: Fenazin metosülfat (PMS) varlığında, fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) içinde 490-500 nm. değerinde maksimum absorbansa sahip olan bir formazan ürününü üretir. MTT testindeki gerekli adımlar olmadan, hücre kültürüne doğrudan bir reaktif ekleme kolaylığı sunan tek aşamalı MTT testi olarak da tanımlanmaktadır (Malich ve ark., 1997).

WST-1 (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfopenil)-2H-tetrazolyum) Testi: Hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, sitotoksitesi ve radyoaktif olmayan ölçümü için uygulanan kolorimetrik bir testtir. Tetrazolyum türleri arasında en iyi alternatiflerden biridir. Diğer tuzlara göre çabuk renk değişimi göstermektedir (Ishiyama ve ark., 1996).

XTT (3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfopenil)-2H-tetrazolyum) Testi: XTT, renksiz ya da hafif sarı bir madde olup, indirgendiği zaman parlak turuncu rengini alır. Bu renk değişimi, sadece pozitif yüklü dördüncül tetrazol halkasının parçalanmasıyla gerçekleştirilir (Jost ve ark., 1992).

xCELLigence Sistemi (Gerçek zamanlı, hücre indeksi analizi): Hücresel biyolojik olaylar, bu sistem tarafından hiçbir işaretleme yapılmadan empedans tabanlı gerçek zamanlı hücre analizi ile tespit edilebilmektedir. Sistem, elektrodlu plakaların (E-plaka) zeminine yerleştirilmiş mikro-elektrodlar sayesinde elektriksel empedans ölçer (Şekil 2-10). Empedans ölçümü hücre sayısı, hücre canlılığı, hücre morfolojisi ve hücre hareketi dahil olmak üzere hücrelerin çeşitli biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgi verir (Ke ve ark., 2011).



Şekil 2-10: xCELLigence sistemi (Roche, 2008).

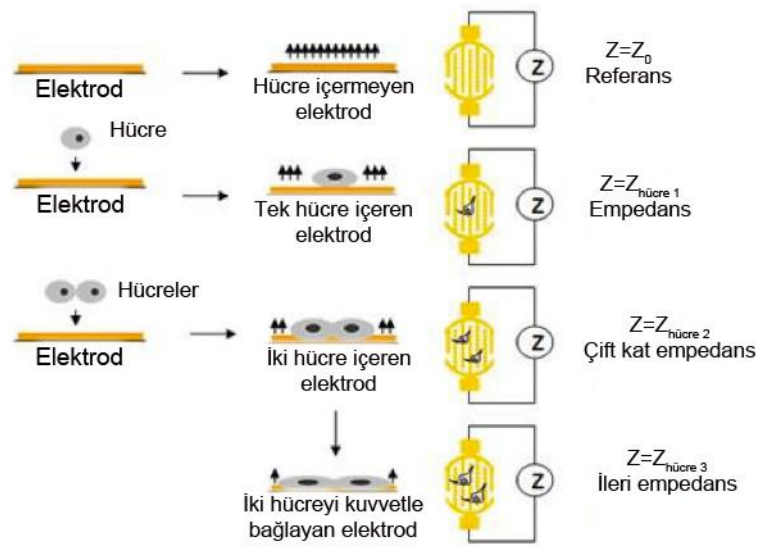
xCELLigence (Roche Applied Science, Mannheim, Almanya ve ACEA Biosciences, San Diego, CA) sistemi; empedans tabanlı gerçek zamanlı hücre analizörü, RTCA tek plaka istasyonu, entegre yazılım programı bulunan RTCA bilgisayarı ve tek kullanımlık 96'lık E-plaka olmak üzere 4 ana bileşenden oluşur (Roche, 2008; Ke ve ark., 2011).

RTCA sistemi, yapışkan (adherent) hücrelerin özel E-plakalardaki her bir kuyunun altında bulunan mikroeletrod sensörlerle etkileşerek yapışmasına ve bu kuyularda meydana gelen elektrik empedansdaki (öz direnç) değişiklikleri ölçmektedir (Şekil 2-11). Bu cihaz, hücre yapışması, çoğalması, hücre ölümü, yayılma ve diğer morfolojik değişikliklerin uzun dönemde ve gerçek zamanlı izlenmesine olanak verir (Kustermann ve ark., 2013).

Sistemin temelini oluşturan ve gerçek zamanlı olarak hücre empedansını ölçmekte kullanılan 96'lık E-plaka, tek kullanımlık olup 96 kuyucuk içerir. Her bir kuyucuğun alt kısmında altından yapılmış mikroeletrod sensör bulunur. Sistem,

mikroelektrodlar üzerine yapışan hücrelerin empedansını ölçer. Kuyucuklara ekilen hücre sayısı, ayrıca hücrelerin elektrodlarla etkileşebilme potansiyeli ve toplam hücre morfolojisi empedansı etkileyen faktörler arasında yer almaktadır (Urcan ve ark, 2010).

Ortamda $1\mu\text{A}$ kadar alternatif akım uygulanması, hücreler ile mikroelektrodlar arasında elektriksel alanın oluşmasını sağlar. Hücreler elektrodlar üzerine yerleştikleri andan itibaren, sistemden geçen akım hücrelerin elektrik empedansına eşit olur. Sistem tarafından sürekli olarak empedans ölçümü yapılır, empedans verileri bilgisayara gönderilir ve yazılım tarafından analizi gerçekleştirir (Ke ve ark., 2011).



Şekil 2-11: Hücrelerin elektrik empedansının ölçümünün şematik gösterimi (Roche, 2008).

Ortamda elektroda yapışmış bir hücre olmadığında, elektrodun empedansı, elektrod çözeltisinin ve kuyucuktaki boş çözeltinin etrafındaki iyonik çevrenin empedansına göre belirlenir. Ancak elektroda yapışmış hücreler olduğunda, elektrodun sensör yüzeyine yapışan hücreler bir yalıtkan gibi davranacağından ve elektrod çözeltisinin yüzeyindeki iyonik çevreyi değiştireceğinden, empedansta bir artışa sebep olur. Elektrod üzerinde ne kadar hücre çoğalırsa, alınan empedans değeri de o kadar artar. Elde edilen empedans değeri “hücre indeksi” adı verilen bir parametre ile ölçülür. Üretici firmanın önerdiği hücre indeksi en az 0,5, ideal olarak ise 1 ya da daha yüksek değer kabul edilir. Ayrıca, kullanılacak hücre sayısı, hücre indeksi/hücre sayısı lineer aralığında olmalıdır. Her bir kuyucuğun sahip olduğu elektrodtan alınan empedans

ölçüm değerleri, kuyucukta elektroda yapışmış hücre olup olmadığına, kuyucuğun elektrod geometrisi ve kuyucuktaki iyon konsantrasyonuna göre değişiklik gösterir (Roche, 2008; Martinez-Serra ve ark., 2014).

xCELLigence sistemi; ilaç geliştirme, toksikoloji, kanser, tıbbi mikrobiyoloji ve viroloji araştırmalarında çeşitli uygulamaların bir arada yapılabilmesi için dinamik, gerçek zamanlı, işaretleme içermeyen hücre analizini sağlayan hücre bazlı mikroelektronik bir biyosensör sistemidir (Ke ve ark., 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda 2013-2015 yılları arasında yapılmıştır.¹

3.1. BİTKİ ÖZÜTÜ

Çalışmada kullanılan endemik bir tür olan *Centaurea nerimanie* Ş. Kültür bitki özütü Doç. Dr. Gülay MELİKOĞLU'ndan (*İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı*) temin edildi. Bu çalışmada, Bolkar Dağı'ndan 2004 yılında Doç. Dr. Şükran KÜLTÜR tarafından toplanan bitkinin toprak üstü kısımları laboratuvar ısısında kurutulduktan sonra toz edildi. Saf metanol ile perkole edilip rotavaporda 30-35°C'de yoğunlaştırıldı. Elde edilen bitki özütü liyofilize edilerek kullanıldı.

3.2. HeLa ve MDA-MB-231 HÜCRE SOYLARI

HeLa (İnsan Servikal Adenokarsinom Hücreleri - Human Cervical Adenocarcinoma Cells): ATCC (American Type Culture Collection) kökenli olarak *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Radyobiyojoloji Anabilim Dalı*'ndan temin edildi.

MDA-MB-231 (İnsan Meme Adenokarsinom Hücreleri - Human Breast Adenocarcinoma Cells): ATCC (American Type Culture Collection) kökenli olarak *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı*'ndan temin edildi.

3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültüründe besiyeri olarak kullanılan medyum (DMEM, Gibco Lab.) distile suda çözündürülerek içerisine 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulagay) ile 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer) eklendi, daha sonra 0,22 µm olan steril filtreden (Millipore) geçirildi. Hazırlanmış olan stok besiyeri, +4 °C'de saklandı.

HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri, %10 Fötal Bovine Serum (FBS, Gibco Lab.) içeren Minimum Essential Medium'da (MEM), pH 7,2'de, 37°C'de, haftada iki kez

¹Hücre kültürü çalışmalarının bir bölümü İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

düzenli pasajları yapılarak yetiştirildikten sonra bu hücrelerin standart hücre kültürü besiyerine, % 10 FBS eklenerek ve pH'sı % 4,4'lük NaHCO_3 ile 7,2'ye ayarlanarak 25 cm^2 'lik steril kültür kaplarında, % 5 CO_2 ve % 95 hava içeren nemli atmosferde, 37°C'de tek tabaka kültür olacak şekilde inkübasyonları gerçekleştirildi.

3.3.1. Hücrelerin pasaj işlemi

HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri, yetiştirildikleri kültür kapları içerisinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde pasaj işlemine başlandı. Hücreler, bulundukları yüzeyden kaldırılmaları amacı ile 3 ml tripsin ile 4 dakika inkübe edildi. Süspansiyon edilen hücreler bulundukları kültür kabından toplanarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve tripsini baskılamak amacıyla üzerine 3 ml besiyeri eklendi. 500xg dönme hızında 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Çöken hücrelerin süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Deney için gerekli hücre sayıları hematositometre ile hesaplanıp, besiyeri ile sulandırma yapılarak, her deney için daha önce belirlenen optimum sayıda hücrelerin ekim işlemi gerçekleştirildi (Freshney, 2000).

3.3.2. Hücrelerin ekimi

Hücrelerin ekim işlemleri, sitotoksikite (xCELLigence sistemi) deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 10.000 hücre/ml; İmmünohistokimya (İHK) ve TUNEL yöntemleri için 24 kuyucuklu kültür kaplarına 150.000 hücre/ml, ayrıca apoptotik hücrelerin morfolojilerinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi amacıyla uygulanan DAPI boyaması için 20.000 hücre/ml olacak şekilde yapıldı. Hücrelerin ekim işlemlerinin ardından pH 7.2'de, %5 CO_2 ve % 95 hava içeren inkübatörde 37°C'de, 24 saat bekletilerek inkübasyon gerçekleştirildi.

3.4. ÖZÜTTEN FARKLI KONSANTRASYONLARIN HAZIRLANMASI

Deneylerde kullanılan *C. nerimaniae* bitkisinin toprak üstü kısımlarından metanolde hazırlanmış olan özütten farklı konsantrasyonların hazırlanmasında daha önce yapılmış olan çalışmalar referans alındı (Dağdeviren, 2010; Erel ve ark., 2014). *C. nerimaniae* bitkisinin özütü, serumsuz DMEM'de çözündürülerek steril filtreden geçirildi ve stok solüsyon elde edildi. Hazırlanan stok solüsyondan % 10 FBS içeren steril DMEM ile sulandırılarak 8 farklı konsantrasyon (0.001 - 0.005 - 0.01 - 0.05 - 0.1 - 0.5 - 1 - 5 mg/ml) hazırlandı.

3.5. GERÇEK ZAMANLI SİTOTOKSİSİTE ve HÜCRE İNDEKSİ ÖLÇÜMÜ

Özütün 8 farklı konsantrasyonun (0.001 - 0.005 - 0.01 - 0.05 - 0.1 - 0.5 - 1 - 5 mg/ml) HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre soyları üzerindeki sitotoksitesi ve hücre indeksinin analizi xCELLigence sistemi kullanılarak yapıldı (Ke, Wang, Abassi, 2011).

1. HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre soyları, kültür kaplarında (flasklarda) %75 doluluğa ulaştıktan sonra 1×10^4 hücre/100 μ l olacak şekilde resüspanse edildi.
2. İlk adımda cihazdaki 96 kuyulu özel plakaya (E-plate) 100 μ l medyum eklenerek sağlama değeri alındı. Daha sonra bu kuyulara ait hücre ekimleri (10.000 hücre/kuyu) yapıldı ve ardından E-plaka cihaza yerleştirildi.
3. xCELLigence (RT-CES, xCELLigence; Roche Applied Science, Mannheim, Germany, and ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) sistemine ait software programı açılarak plaka 19 saat boyunca tutuldu ve 19 saat sonra (hücre indeksi 1 olduğunda) 8 farklı konsantrasyonda hazırlanan özüt (0,001 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 mg/ml) hücreler ile muamele edildi.
4. Kontrol olarak 3 ayrı kuyuda özüt içermeyen %1 serumsuz medyum kullanıldı.
5. Özüt uygulamasının ardından empedansa bağlı hücre indeks değişimi (hücre canlılığı) 72 saat boyunca izlendi.
6. Uygulama 15'er dakikalık arayla 72 saat boyunca, 3 tekrarlı olarak yapıldı.
7. Bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC_{50} değeri, RTCA Software 1.2.1 kullanılarak hesaplandı.
8. HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre soyları için en uygun etken doz ve saat belirlemesi analizi yapıldı.

3.6. ETKEN DOZLARA GÖRE DENEY GRUPLARI

- A. HeLa (serviks adenokarsinomu) hücre soyu
 1. Kontrol grubu: Özüt uygulanmayan grup
 2. Deney grubu: *C. nerimaniae* özütünün etken dozunun uygulandığı grup
- B. MDA-MB-231 (meme adenokarsinomu) hücre soyu
 1. Kontrol grubu: Özüt uygulanmayan grup
 2. Deney grubu: *C. nerimaniae* özütünün etken dozunun uygulandığı grup

3.7. MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarında, morfolojik olarak apoptotik hücrelerin tespiti ve apoptotik indeksin belirlenmesi amacıyla 24'lü kuyulara 150.000 (TUNEL ve İHK) - 20.000 (DAPI) hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat boyunca 37°C inkübatörde bekletildi. Daha sonra, özütün xCELLigence sistemi ile belirlenen etken dozları HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarına belirlenen saat süresince uygulandı.

3.7.1. Faz-Kontrast Mikroskobu

C. nerimaniae bitkisinden hazırlanan özütün etken dozlarının uygulandığı HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinde meydana gelen değişimler, 48 ve 72 saat deney süresinin sonunda x20'lik objektifte Olympus CKX41 marka faz-kontrast mikroskobu ile incelendi. Deney gruplarındaki hücrelerde genel sitotoksosite ve apoptoza özgü oluşan morfolojik değişimler gözlemlendi.

3.7.2. Işık Mikroskobu

Hücre soyları, İmmünohistokimya ve TUNEL tekniklerinin uygulanması için aşağıdaki işlem sırasına uygun olarak hazırlandı.

1. Kültür kaplarında tek tabakalı hale ulaşan hücreleri yüzeye kaldırmak için 3 ml tripsin eklendi ve tripsin aktivasyonu için 4-5 dakika boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi.
2. Kültür kaplarından toplanan hücreler 5 dakika 500g'de santrifüj edildi.
3. Süpernatant uzaklaştırılarak pellete 1 ml medyum (DMEM) eklendi.
4. Hücreler pipetaj ile iyice homojenize edildi ve sayımları yapıldı.
5. Hücrelerin 24'lük kuyulara ekimi için gerekli olan ve önceden sterilize edilmiş olan 15cm'lik yuvarlak lameller alevden geçirilerek kuyulara yerleştirildi.
6. İHK ve TUNEL yöntemi için her bir kuyuya 150.000 hücre ekildi ve optimum hücre yoğunluğu sağlandı.
7. Lameller kuyulara yerleştirildikten sonra, HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri 150.000 hücre/kuyu olacak şekilde eklendi.
8. Eklenen hücrelerin üzerine kuyuları 1ml'ye tamamlayacak şekilde medyum eklendi.
9. Hücrelerin lamellere iyice tutunup yapışması için 24'lük plakalar 37°C'lik etüvde 1 gün boyunca inkübe edildi.

10. HeLa ve MDA-MB-231 hücreleri için belirlenen etken özüt dozları hazırlanarak steril filtrelerden (Millipore) geçirildi.
11. 24'lük plakalardan medyum uzaklaştırıldı. Kontrol ve deney grubu, 12'şerlik kuyular şeklinde ayarlandı.
12. Kontrol grubuna 1 ml medyum, her iki deney grubuna taze olarak hazırlanmış olan bitki özütünün etken dozları eklendi, ardından 1ml'ye tamamlanacak şekilde medyum ilave edildi.
13. HeLa (48 saat) ve MDA-MB-231 (72 saat) hücre soyları belirlenen saatler süresince 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.
14. İnkübasyon sonunda hücreler faz-kontrast mikroskop altında incelenerek ışık mikroskopi işlemleri için hazır oldukları tespit edildi.
15. Tween-20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle hücreler yıkandı.
16. Hücreler; İHK için %4'lük paraformaldehit ile, TUNEL yöntemi için %10'luk formol ile 20 dakika fikse edildi (fiksatifler steril filtreden geçirilerek kullanıldı).
17. Tween-20/PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle hücreler yıkandı.
18. İHK ve TUNEL yöntemlerine başlamadan önce için her bir kuyuya 1 ml PBS eklendi ve 24'lük plakalar daha sonra kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.7.2.1. İmmünohistokimya

Apoptoz belirteçlerinden olan aktif kaspaz-3 antikoru (Santa Cruz Biotech; Sc-7148, 1:100 dilüsyon) kullanılarak %4'lük paraformaldehit ile tespit edilen hücrelere uygulanan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile kit (Histostain-Plus Bulk Kit, Zymed LAB-SA Detection System, Amerika) içinde tavsiye edilen işlem sırası bazı değişiklikler ile optimize edilerek immünohistokimyasal boyama uygulandı (Wang, 2014).

1. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
2. Maskeleme (blocking) solüsyonu ile 20 dakika muamele edildi (istenmeyen antijenlerin baskılanması).
3. Aktif kaspaz-3 antikoru (1:100) ile bir gece +4°C'de nemli ortamda muamele edildi.
4. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
5. % 0.3 H₂O₂'de 10 dakika muamele edildi.

6. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
7. Biotin ile işaretli ikinci antikor ile 20 dakika muamele edildi.
8. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
9. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 20 dakika muamele edildi.
10. Hücreler, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
11. Substrat-kromojen (AEC = 3-aminoetil 9-karbazol) solüsyonu ile 20 dakika renk reaksiyonu (kırmızı) gözlenene kadar inkübe edildi.
12. Distile suda yıkandı.
13. Hücrelere 40 saniye boyunca metilen mavisi zıt boyası uygulandı.
14. Distile suda yıkandı.
15. İHK yöntemi uygulandıktan sonra kuyulardaki lameller dikkatli bir şekilde ince uçlu pens yardımıyla kaldırılıp, lamalar üzerine damlatılan gliserin-jelatin ile kapatıldı ve 1 saat 37°C'lik etüvde tutuldu.

İmmün boyama özgüllüğünün kontrolü: İmmün boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak İHK işlem sırasında primer antikor yerine PBS damlatılarak tüm işlem basamakları aynen uygulandı.

3.7.2.2. TUNEL Yöntemi

Apoptotik ölümün belirteçlerinden olan DNA kırıklarının *in situ* olarak saptanması için TUNEL metodu (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling) kit (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Peroxidase Kit -S7101-KIT, Chemicon, Almanya) içinde tavsiye edilen işlem sırası bazı değişiklikler ile optimize edilerek (Wu, 2008) uygulandı. Apoptotik süreçte kırılan DNA parçalarının 3'OH uçları, Terminal deoksinükleotidil transferaz (Tdt) enzimi kullanılarak digoksisigenin işaretli dUTP ile işaretlendi ve işlem sonunda işaretlenmiş apoptotik hücreler AEC (3-aminoetil 9-karbazol) ile boyanarak mikroskopta görünür hale getirildi.

1. Hücreler Tween-20/PBS (25µl Tween-20 + 50 ml PBS) ile 15 dakika yıkandı.
2. Hücreler, PBS ile hazırlanmış % 0.3 H₂O₂ ile 5 dakika oda ısısında muamele edildi (endojen peroksidazın maskelenmesi için).
3. Hücreler, 3 defa 2'şer dakika Tween-20/PBS ile yıkandı.
4. Lamellerin çevresi dikkatlice kurulanıp, hücrelerin üzerine 75 µl 1 x Dengeleyici Tampon konulup plastik lameller ile kapatıldı. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

5. Plastik lameller kaldırıldı, lamellerin etrafı kurulandı ve üzerlerine 55 µl TdT enzimi konularak plastik lameller ile kapatıldı. 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi.
6. Plastik lameller kaldırıldı, hücreler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dakika yıkandı.
7. Hücreler 3 defa 5'er dakika Tween-20/PBS ile yıkandı.
8. Her lamel üzerine 65 µl Anti-Digoksinin-Peroksidaz konuldu ve üzerlerine plastik lameller tekrar kapatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi.
9. Plastik lameller kaldırıldıktan sonra hücreler 3 defa 5'er dakika yıkandı.
10. Hücrelerin bulunduğu lamellerin etrafı kurulandıktan sonra her birine 75 µl AEC damlatıldı. 6-7 dakika sonra pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında kontrol edildi.
11. Renk reaksiyonunun oluşmasından sonra hücreler distile su ile 3 defa 1'er dakika yıkandı.
12. Hücreler zıt boyama için metil yeşili ile 2 dakika boyandı, distile su ile boyama durduruldu.
13. TUNEL yöntemi uygulandıktan sonra kuyulardaki lameller dikkatli bir şekilde ince uçlu pens yardımıyla kaldırılıp, lamalar üzerine damlatılan gliserin-jelatin ile kapatıldı ve 1 saat 37°C'lik etüvde tutuldu.

Uygulama esnasında taze olarak hazırlanan solüsyonlar:

% 0.3 H₂O₂ (PBS ile)

Tdt: 77 µl Reaksiyon Tamponu + 33 µl Tdt Enzimi = 110 µl

Durdurma/Yıkama tamponu: 10 µl Yıkama solüsyonu + 340 µl Distile Su = 350 µl

TUNEL Boyama özgüllüğünün kontrolü: Boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak hücre ekili lamele TUNEL işlem sırasındaki Tdt enziminin uygulandığı aşamada, Tdt enzimi yerine distile su damlatıldı. Daha sonra tüm işlem basamakları aynen uygulandı.

3.7.3. Floresan Mikroskopu

HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarına özüt uygulaması ile ortaya çıkan apoptotik hücrelerin ve nukleus morfolojilerinin tespiti için DAPI boyama yöntemi uygulandı ve floresan mikroskopunda incelendi (Huang, 2007).

1. Işık mikroskopi yönteminin işlem sırası aynen uygulandı. Sadece 6. ve 16. adımlar aşağıda verildiği şekilde uygulandı.
2. 6. işlem sırasında 24'lük plakalardaki her kuyucuğa 20.000 hücre/kuyu olacak şekilde HeLa ve MDA-MB-231 hücre soyları ekildi.
3. 16. işlem sırasında, hücreler saf metanol ile 20 dakika tespit edildi.
4. Tween-20/PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
5. Kuyucuklara PBS ile sulandırılan DAPI (SC-3598) (1:1000) eklendi ve 5 dakika karanlıkta inkübe edildi.
6. Lameller doğrudan lamalar üzerine kapatıldı.
7. Hazırlanan lamalar Olympus BX51 floresan mikroskopunda (λ_{ex} 364 nm; λ_{em} 454 nm) incelendi.

3.8. APOPTOTİK İNDEKS

Apoptotik indeksin tespiti, LEICA marka ışık mikroskopunda ve x20 büyütmede rastgele seçilen 12 alanda TUNEL pozitif olarak işaretlenen apoptotik ve normal nukleuslar sayılarak apoptotik indeks (Tunçdemir ve Öztürk, 2008) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Apoptotik indeks (AI)} = \frac{\text{Apoptotik nukleus sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Deney gruplarından elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinin sitotoksosite ölçüm sonuçları tek yönlü ANOVA'ya göre Tukey testi ile, deney gruplarının kontrol grubuna göre ve birbirleri ile olan anlamlılıkları ise Mann-Whitney *U* Testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ seviyesi temel alındı. Değerlendirmeler "GraphPad Prism version 6.00, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c" programı kullanılarak yapıldı.

3.10. Kullanılan kimyasal malzemeler

- 1- Antikor sulandırıcı (Zymed)
- 2- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) (Santa Cruz)
- 3- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco)
- 4- Etanol (Merck)
- 5- FBS (Fetal Bovine Serum) (İnvitrogen)
- 6- Formol (Merck)
- 7- Gliserol (Santa Cruz)
- 8- H₂O₂ (Hidrojen peroksit) (Merck)
- 9- Kaspaz-3 antikoru (Santa Cruz)
- 10- Paraformaldehit (Merck)
- 11- PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4) (Gibco)
- 12- Penisilin (İ.E. Ulagay)
- 13- Streptomisin (Pronapen, Pfizer)
- 14- Tripsin % 0.25 (İnvitrogen)

3.11. Kullanılan gereçler

- 1- Ayarlanabilir hacimli pipet seti (Eppendorf)
- 2- Balon joje (500, 1000 ml)
- 3- Buzdolabı (Ariston)
- 4- Derin dondurucu (-20 °C) (Elektrolux)
- 5- Enjektör (10, 50 cc)
- 6- Floresan mikroskop (Olympus BX 51)
- 7- Hassas terazi (Ohaus Galaxy 4000)
- 8- Işık mikroskobu (Leica DM 2500)
- 9- İnkübatör (CO₂'li) (Eppendorf)
- 10- İnvirt (faz-kontrast) mikroskop (Olympus, CKX41)
- 11- Kriyojenik tüpler (Santa Cruz)
- 12- Laminar kabin (ESCO Class II Type A2)
- 13- Mavi kapaklı şişe (100, 500, 1000 ml)
- 14- Membran filtre (0.22 µm) (Millipore)
- 15- Mezür (25, 50, 200 ml)
- 16- pH metre (Scheat pH-meter CG825)

- 17- Pipette controler (CAPP)
- 18- Saf su cihazı (Millipore Elix 3)
- 19- Santrifüj (Hettich EBA 8S)
- 20- Santrifüj tüpü (15, 50 ml) (Santa Cruz)
- 21- Serolojik Pipet (5 ml) (Santa Cruz)
- 22- Sonikatör (United Jewelry Tool Supplies)
- 23- Steril pipet uçları (10,100, 1000 µl) (Expell)
- 24- Thoma Lamı
- 25- xCELLigence cihazı (ACEA, Roche)
- 26- Yuvarlak Lamel (15 mm)
- 27- 25 cm² ve 75 cm² kültür kapları (Santa Cruz)
- 28- 12'lik, 24'lük ve 96'lık kuyucuklu plakalar (Santa Cruz)

3.12. Kullanılan tampon ve çözeltiler

1- %10'luk formol

% 37 Formaldehid (Merck)	100 ml
Distile su	900 ml

2- % 4'lük paraformaldehit

Paraformaldehit	4 gr
PBS	100 ml'e tamamlandı.

65⁰C'de karıştırıcı ile çözelti berraklaşınca kadar 1N NaOH damlatılarak karıştırıldı. Steril filtre ile süzüldü.

3- Fosfat tuz tamponu (PBS) (PH: 7.2-7.4)

NaCl	8.79 gr.
KH ₂ PO ₄	0.272 gr.
NaHPO ₄	1.135 gr.

1000 cc distile su ile tamamlandı.

3- Tween-20/PBS

Tween-20	25 µl
PBS	50 µl

4- Gliserin jel

Gelatin	1 g
Gliserol	7 ml
Ultra saf su	6 ml

5- H₂O₂

H ₂ O ₂	1 ml
PBS	9 ml

4. BULGULAR

4.1. GERÇEK ZAMANLI SİTOTOKSİSİTE ve HÜCRE İNDEKSİ ANALİZİ

Gerçek zamanlı hücre analizi için xCELLigence sisteminde E-plakalara ekilen (Tablo 4.1) HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarının hücre indeksinin 1'i geçtiği 19. saatte tespit edildi. Hazırlanan 8 farklı konsantrasyon, E-plaka yerleşimine bağlı olarak kuyucuklardaki hücrelere uygulandı ve özüt konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki sitotoksitesi ve canlılığa etkilerinin analizi RTCA software kullanılarak yapıldı.

Tablo 4-1: HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarının ekildiği ve 8 farklı özüt konsantrasyonunun ayarlandığı 96 kuyucuklu E-plaka yerleşimi (CN: *Centaurea nerimanica*).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	serumsuz medyum(0)	serumsuz medyum(0)	serumsuz medyum(0)	HELA(10000) CN(1.00mg/ml)	HELA(10000) CN(1.00mg/ml)	HELA(10000) CN(1.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(100.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(100.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(100.00ug/ml)
B	HELA(10000) 0	HELA(10000) 0	HELA(10000) 0	HELA(10000) CN(5.00mg/ml)	HELA(10000) CN(5.00mg/ml)	HELA(10000) CN(5.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(500.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(500.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(500.00ug/ml)
C	HELA(10000) CN(1.00ug/ml)	HELA(10000) CN(1.00ug/ml)	HELA(10000) CN(1.00ug/ml)				MDA-MB-231(10000) CN(1.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(1.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(1.00mg/ml)
D	HELA(10000) CN(5.00ug/ml)	HELA(10000) CN(5.00ug/ml)	HELA(10000) CN(5.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) 0	MDA-MB-231(10000) 0	MDA-MB-231(10000) 0	MDA-MB-231(10000) CN(5.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(5.00mg/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(5.00mg/ml)
E	HELA(10000) CN(10.00ug/ml)	HELA(10000) CN(10.00ug/ml)	HELA(10000) CN(10.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(1.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(1.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(1.00ug/ml)			
F	HELA(10000) CN(50.00ug/ml)	HELA(10000) CN(50.00ug/ml)	HELA(10000) CN(50.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(5.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(5.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(5.00ug/ml)			
G	HELA(10000) CN(100.00ug/ml)	HELA(10000) CN(100.00ug/ml)	HELA(10000) CN(100.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(10.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(10.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(10.00ug/ml)			
H	HELA(10000) CN(500.00ug/ml)	HELA(10000) CN(500.00ug/ml)	HELA(10000) CN(500.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(50.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(50.00ug/ml)	MDA-MB-231(10000) CN(50.00ug/ml)	dmem(0) 0	dmem(0) 0	dmem(0) 0

Sonuçlara göre, Şekil 4-1 ve Şekil 4-2’de gösterildiği gibi, özütün uygulandığı an 0. saat olarak kabul edildi. Canlılık eğrileri her 15 dakikada bir yazılım sistemi tarafından çizilerek, özüt konsantrasyonlarının HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri saptandı.

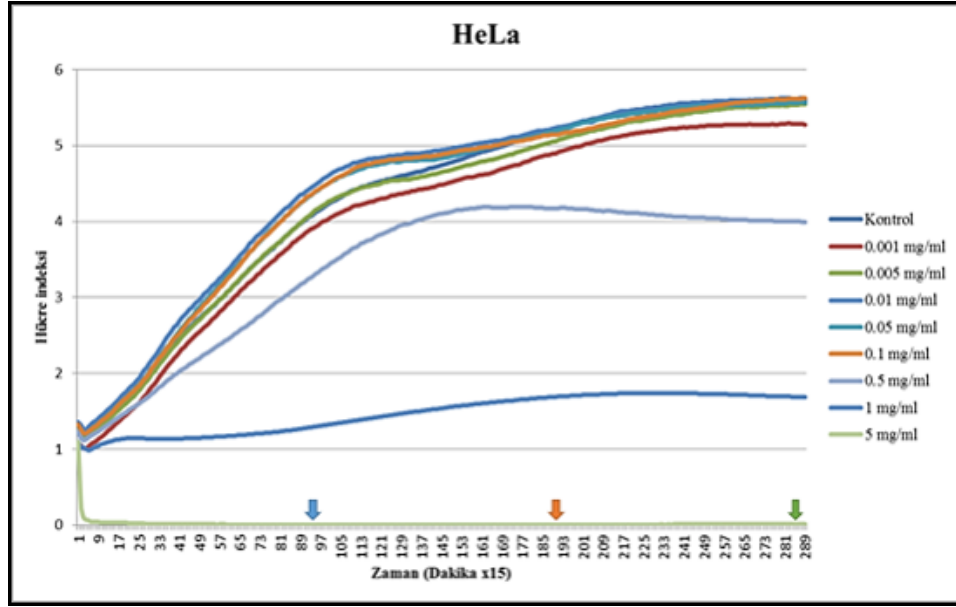
HeLa hücrelerinde (Şekil 4-1) en yüksek doz değeri olan 5 mg/ml’nin hücrelerin tamamına toksik etki gösterdiği, en düşük doz olan 0.001 mg/ml’den 0.01 mg/ml’ye kadar artan doz değerlerinin hücre ölümü üzerinde çok fazla etkili olamadığı, bu nedenle de HeLa hücrelerinin çoğalmaya devam ettiği tespit edildi. Özüt uygulanan HeLa hücre soyu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığı üzerine etki eden

ilk dozun 0.5 mg/ml olduğu, hücre indeksinde en etkili dozun ise 1 mg/ml olduğu ($p<0.001$) ve kontrole göre hücre canlılığını inhibe ettiği gözlemlendi.

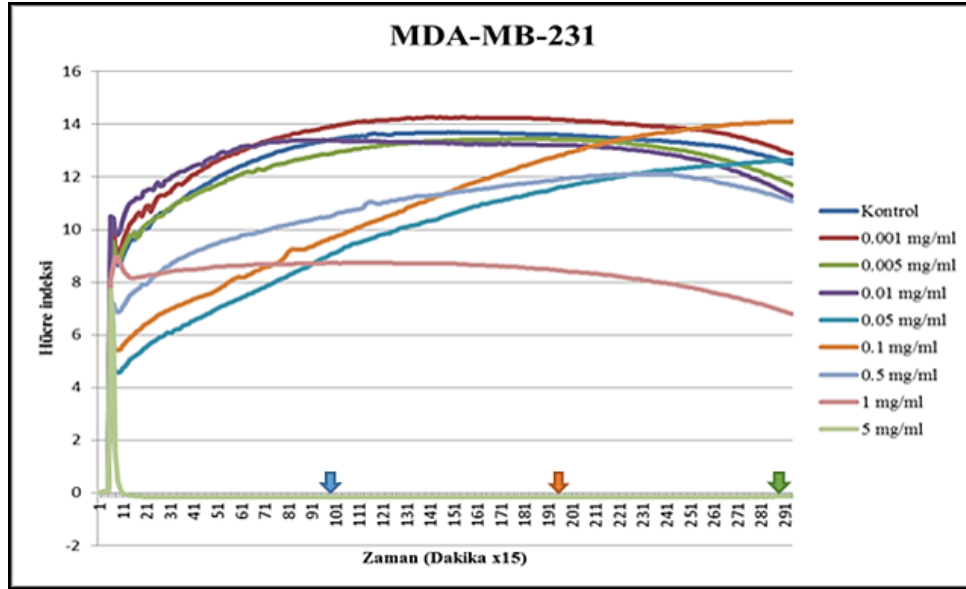
Zamana bağlı hücre indeksi grafiğinde (Şekil 4-2), MDA-MB-231 hücre soyunda en düşük doz değerinden 0.5 mg/ml'ye kadar artan konsantrasyonların hücre ölümü üzerinde etkili olamadığı, 5 mg/ml son doz değerinin HeLa hücrelerinde de görüldüğu gibi hücrelerin tamamına toksik etki gösterdiği saptandı. xCELLigence sisteminde MDA-MB-231 hücrelerine ait analiz sonuçlarında beklenenden farklı bir grafik elde edildi. 0.1 mg/ml ve 0.5 mg/ml dozlarında proliferasyon yönünde farklı bir eğri çizdikleri, ancak sitotoksik dozların 1-5 mg/ml arasında olduğu tespit edildi. Elde edilen hücre analiz grafiğindeki bu değişikliklerin MDA-MB-231 kanser hücresinin fenotipik özelliklerine bağlandı. Özüütün 1 mg/ml'lik dozunun hücrelere toksik etki göstermeye başladığı ve kontrol grubuna göre hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edildi ($p<0.001$).

Özüt uygulamasının ardından 72 saat sonra elde edilen bulgular, xCELLigence sistemi RTCA software programı tarafından analiz edilerek detaylı bir şekilde değerlendirildi. HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatteki zamana bağlı empedans değerleri ile hücre indeksi değerleri (IC_{50} : hücrelerin yarısını inhibe eden doz değerı) elde edildi. Şekil 4-3'teki grafiklerde 24, 48 ve 72 saat sonunda HeLa hücre soyuna ait IC_{50} değerleri sırasıyla gösterildi. Bu değerlerin 24 saatte 1,2902 mg/ml, 48 saatte 1,4271 mg/ml ve 72 saatte 1,1278 mg/ml olduğu tespit edildi. Şekil 4-4'teki grafiklerde sırasıyla 24, 48 ve 72 saat sonunda MDA-MB-231 hücre soyuna ait IC_{50} değerleri gösterildi. Bu değerlerin 24 saat için 7,69 mg/ml, 48 saat için 5,503 mg/ml ve 72 saat için 3,67 mg/ml olduğu tespit edildi.

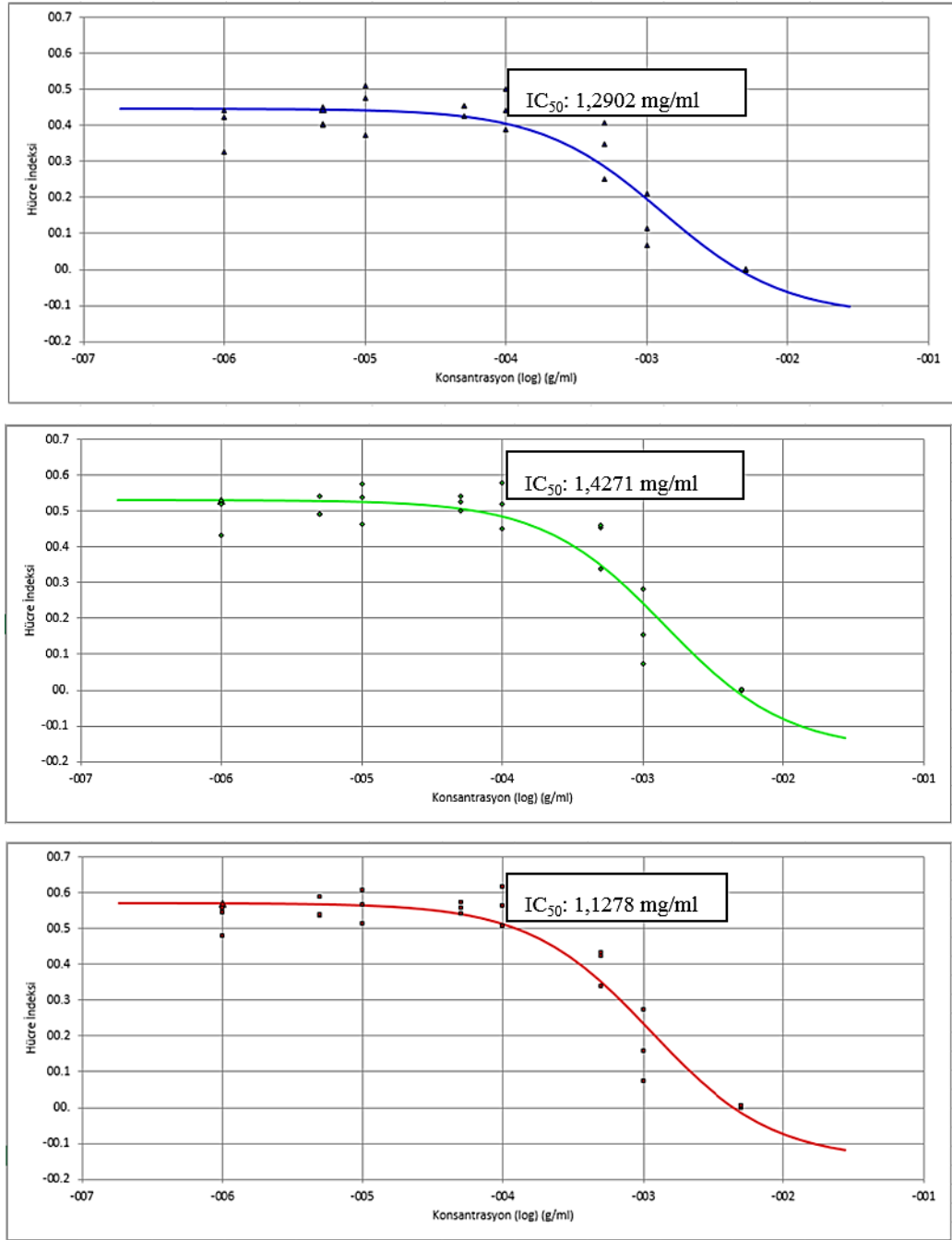
Elde edilen sonuçlara göre etken dozların zamana bağlı etkileri göz önünde bulunduruldu. Her üç zaman diliminde de HeLa hücre soyu için elde edilen IC_{50} değerleri birbirlerine çok yakın olduğundan, en uygun etken zamanı tespit edebilmek için 24, 48 ve 72 saatte belirlenen etken dozların HeLa hücreleri üzerindeki etkileri araştırıldı. En düşük etken doz (1,1278 mg/ml - 72 saat) zamana bağlı olarak hücrelere uygulandı ve 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskopunda gözlenen hücrelerde çok fazla harabiyet olduğu, bu dozun 72 saat sonunda hücre canlılığı üzerine güçlü toksik etki gösterdiği belirlendi. 24. saatteki etken doz (1,2902 mg/ml) uygulandığında ise hücrelerdeki çoğalmanın halen devam ettiği görüldü. Bu çalışmalar 3 kez tekrarlandı. Sonuç olarak, HeLa hücre soyu için 48 saatteki ve MDA-MB-231 hücre soyu için de 72 saatteki etken dozların uygulanması gerektiği tespit edildi.



Şekil 4-1: *C. nerimaniae* özütünün artan konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerindeki 72 saatlik gerçek zamanlı hücre analizi (↓: 24. saat, ↓: 48. saat, ↓: 72. saat).

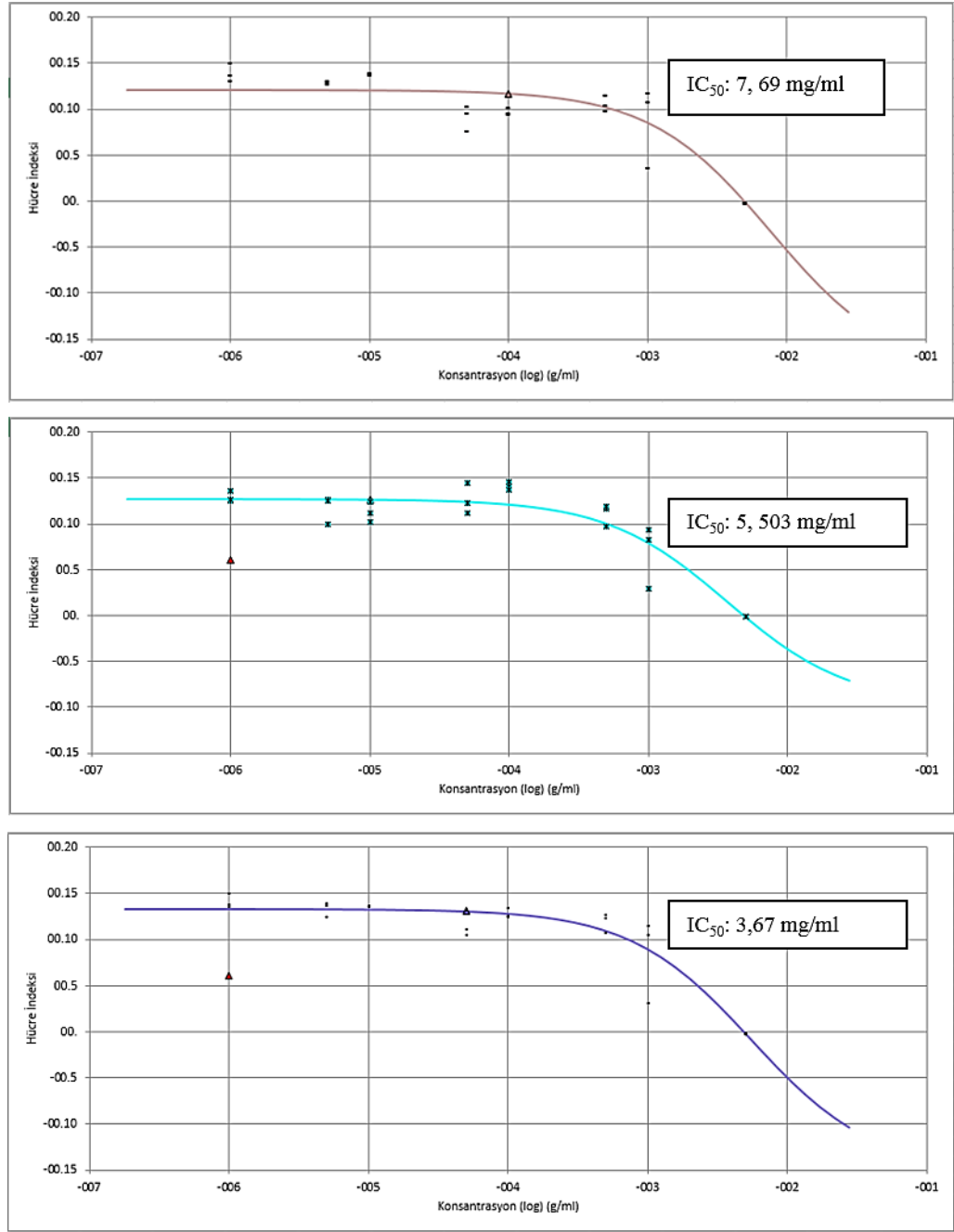


Şekil 4-2: *C. nerimaniae* özütünün artan konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki 72 saatlik gerçek zamanlı hücre indeksi analizi (↓: 24. saat, ↓: 48. saat, ↓: 72. saat).



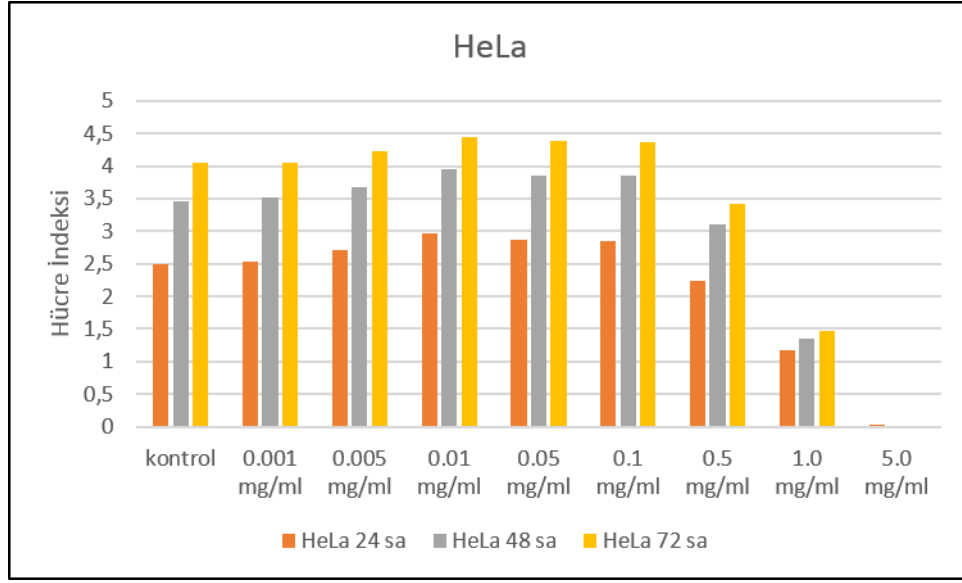
Şekil 4-3: 24, 48 ve 72 saat sürelerinin sonunda xCELLigence sisteminden elde edilen *C. nerimaniae* özütünün 8 farklı konsantrasyonunun HeLa hücreleri üzerindeki (IC₅₀) eğrileri.

(Tablo 4-1'e göre değerlendirilen kuyucuklar; B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3, G1, G2, G3, H1, H2, H3, A4, A5, A6, B4, B5, B6; Veri noktaları ortalama $\pm$ S.E.M değerlerini temsil etmektedir.)

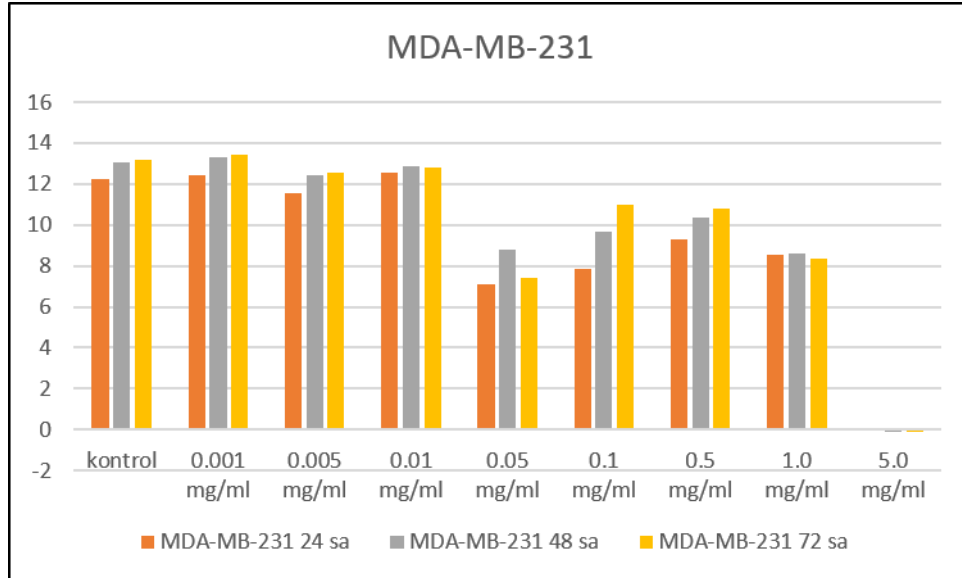


Şekil 4-4: 24, 48 ve 72 saat sürelerinin sonunda xCELLigence sisteminden elde edilen *C. nerimaniae* özütünün 8 farklı konsantrasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki (IC_{50}) eğrileri.

(Tablo 4-1'e göre değerlendirilen kuyucuklar; D4, D5, D6, E4, E5, E6, F4, F5, F6, G4, G5, G6, H4, H5, H6, A7, A8, A9, B7, B8, B9, C7, C8, C9, D7, D8, D9; Veri noktaları ortalama $\pm$ S.E.M değerlerini temsil etmektedir.)



Şekil 4-5: *C. nerimaniae* bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının HeLa hücre soyuna uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre indeksi değerleri

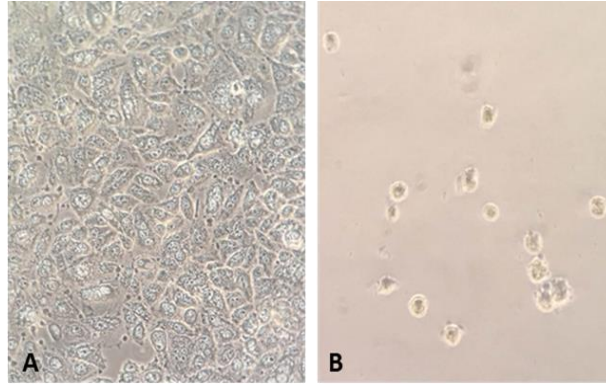


Şekil 4-6: *C. nerimaniae* bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre soyuna uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonundaki hücre indeksi değerleri

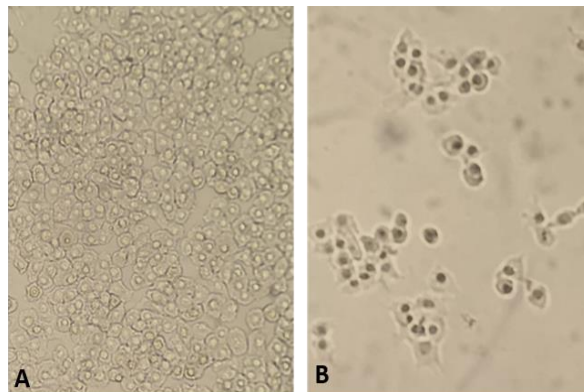
4.2. MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

4.2.1. Faz-Kontrast Mikroskobu

Centaurea nerimaniae özütünün sitotoksikite değerleri göz önünde bulundurularak en etkili olan dozun HeLa için (1,42 mg/ml) ve MDA-MB-231 için (3,67 mg/ml) olduğu saptandıktan sonra, *C.n.* deney grubunun uygulandığı hücre soylarında faz-kontrast mikroskobu ile morfolojik olarak tipik apoptotik hücreler gözlemlendi (Şekil 4-7, 4-8). Deney sürelerinin sonunda HeLa (48 saat) ve MDA-MB-231 (72 saat) hücre soylarında meydana gelen sitotoksik etkinin uygulanan konsantrasyon ve saate bağlı olarak arttığı görüldü.



Şekil 4-7: HeLa hücre soyunda (A) kontrol grubunun ve (B) *C. nerimaniae* bitki özütünün etken dozunun (1,42 mg/ml) uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskop görüntüsü (x20).



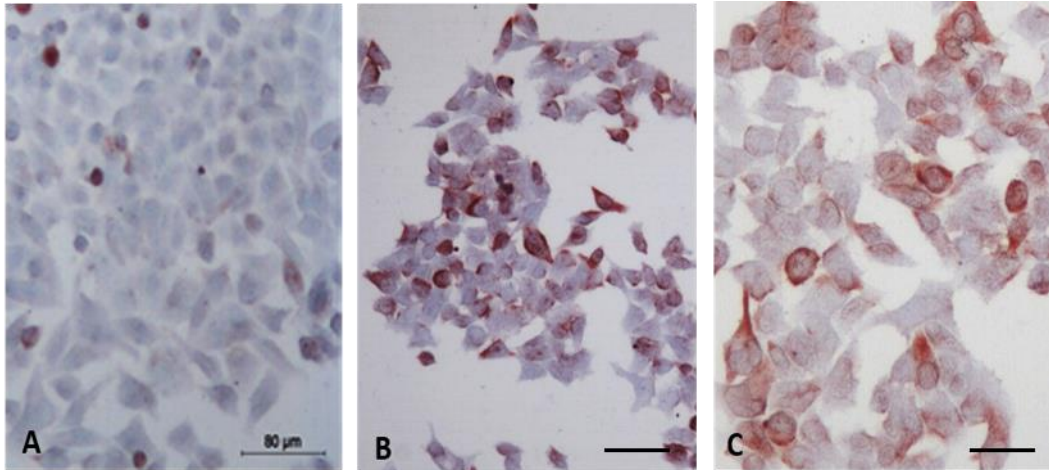
Şekil 4-8: MDA-MB-231 hücre soyunda (A) kontrol grubunun ve (B) *C. nerimaniae* bitki özütünün etken dozunun (3,67 mg/ml) uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskop görüntüsü (x20).

4.2.2. Işık Mikroskobu

4.2.2.1. İmmünohistokimya

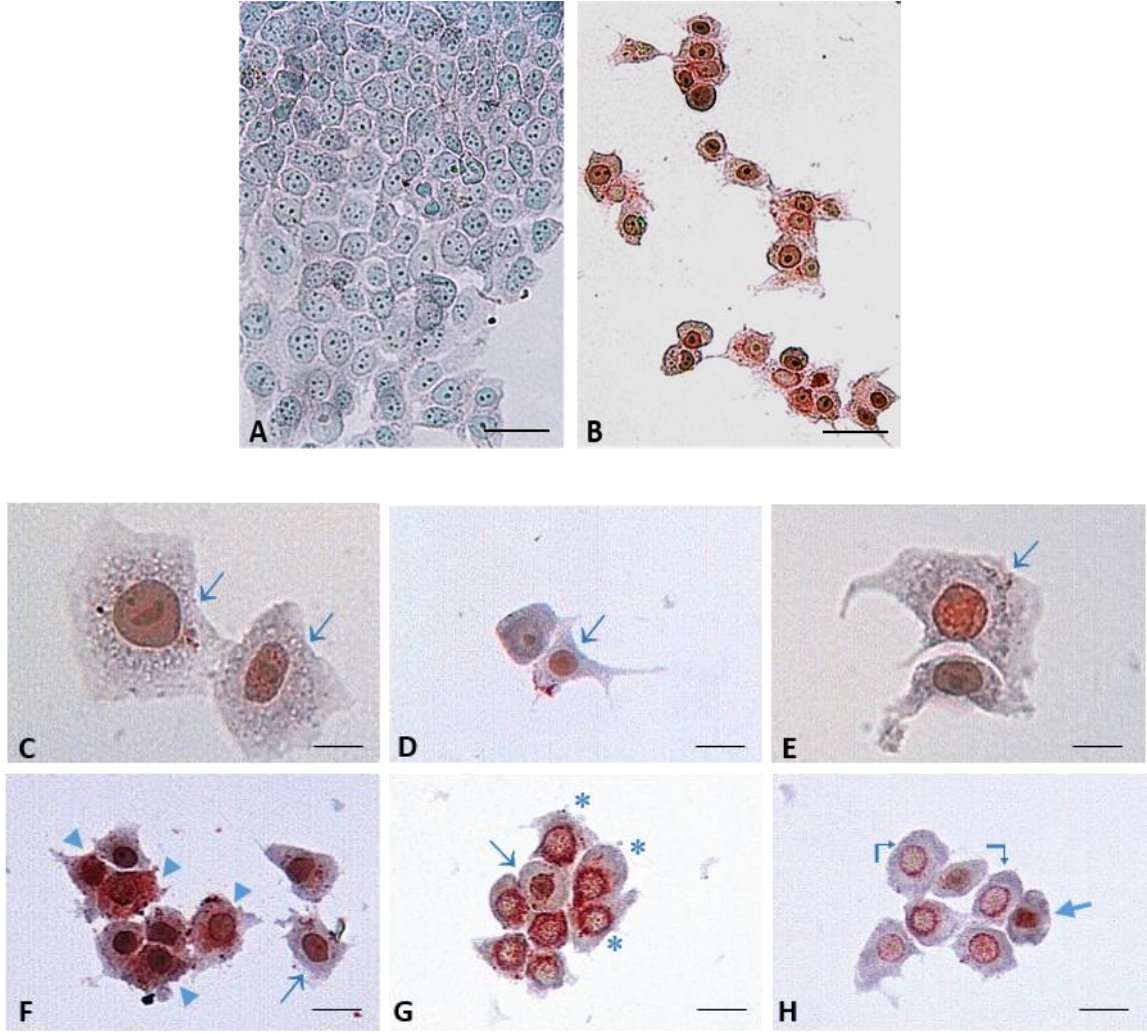
Aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama sonucu, sitoplazmaları boyanmış olan hücreler (Şekil 4-9, 4-10) kaspaz-3 (+) olarak değerlendirildi. Bazı hücrelerde aktif kaspaz-3 immünoreaktivitesi nukleusun sitoplazmik yüzeyine yakın bölgelerde yoğunlaşmış olarak saptandı. HeLa ve MDA-MB-231 hücre soylarında rastgele seçilen 12 alanda yapılan kaspaz-3 immünopozitif hücrelerin sayısı sonucunda, kaspaz-3 immünopozitif hücre sayımlarının ortalama değerleri (Tablo 4-2) ve grafiği (Şekil 4-12) verildi.

Aktif kaspaz-3 immünopozitif hücrelerin sayısı sonucunda, HeLa hücre soyunun deneyli grubunda kaspaz-3 immünopozitif hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış gösterdiği ($p<0.0001$) gözlemlendi (Şekil 4-9). MDA-MB-231 hücre soyunun deneyli grubunda da kontrol grubuna kıyasla aktif kaspaz-3 immünopozitif hücre sayısında artış gözlemlendi ($p<0.001$). Sadece MDA-MB-231 hücre soylarında etken dozda özüt uygulanan grupta apoptotik veya apoptotik olmayan morfolojilere sahip kanser hücrelerinde kaspaz-3 immün boyanmasının sitoplazma dışında, sadece nukleusta veya nukleus+sitoplazmada pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 4-10, 4-11). Bazı hücre gruplarında aktif kaspaz-3 nukleus pozitifliği ayrıca nukleusun çevresinde de belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 4-10).



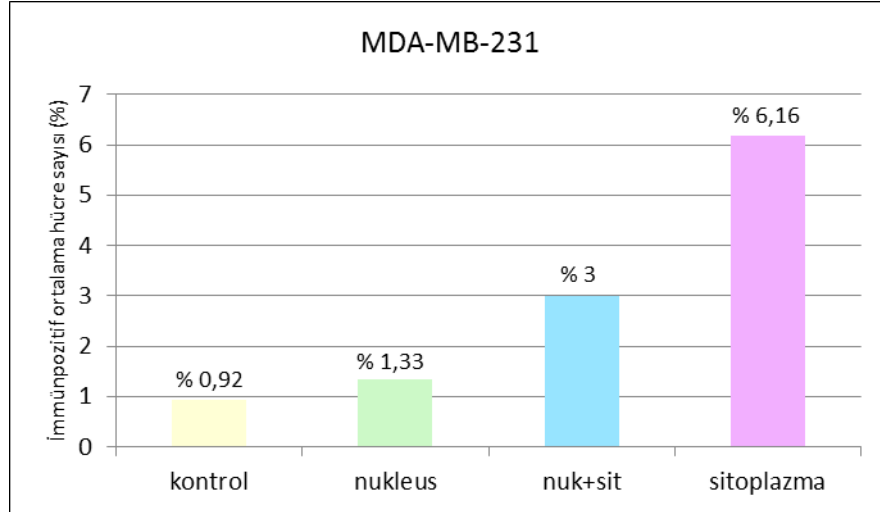
Şekil 4-9: HeLa hücre soyunda aktif kaspaz-3'ün immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

(A) Kontrol grubu ve *C. nerimaniae* bitki özütünün etken dozunun (1,42 mg/ml) uygulandığı (B, C) deney grubuna ait 48 saat sonunda sitoplazmaları aktif kaspaz-3 immünopozitif hücreler (Bar; A, B: 80 μ m, C: 40 μ m).



Şekil 4-10: MDA-MB-231 hücre soyunda aktif kaspaz-3'ün immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

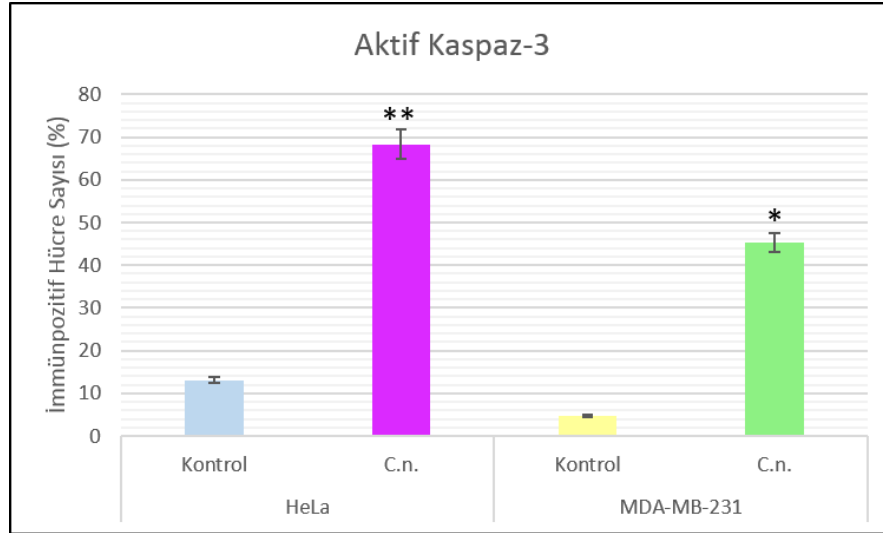
- (A) Kontrol grubu ve *C. nerimaniae* bitki özütünün etken dozunun (3,67 mg/ml) uygulandığı (B, C, D, E, F, G, H) deney grubunun 72 saat sonundaki aktif kaspaz immünopozitifliğinin ışık mikroskobu görüntüleri (C, D, E: nukleus aktif kaspaz-3 hücreler (↓); F: nukleus + sitoplazma (+) hücreler (▲), sadece nukleus (+) hücreler (↓); G: nukleus periferindeki sitoplazmada (+)'lık gösteren hücreler (*); H: sadece nukleus periferi (+) hücreler (↵)), (Bar: A, B, C, E: 20 µm; D, F, G, H: 40 µm).



Şekil 4-11: MDA-MB-231 hücre soyunda sitoplazmada, sadece nukleusta veya nukleus+sitoplazmada aktif kaspaz-3 immünopozitif hücrelerin ortalama sayısı.

Tablo 4-2: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait ortalama aktif kaspaz-3 immünopozitifliğinin değerleri.

	Kontrol	C. n.
HeLa	13,08 ± 5,47	68,34 ± 5,00
MDA-MB-231	4,63 ± 7,29	45,37 ± 30,10

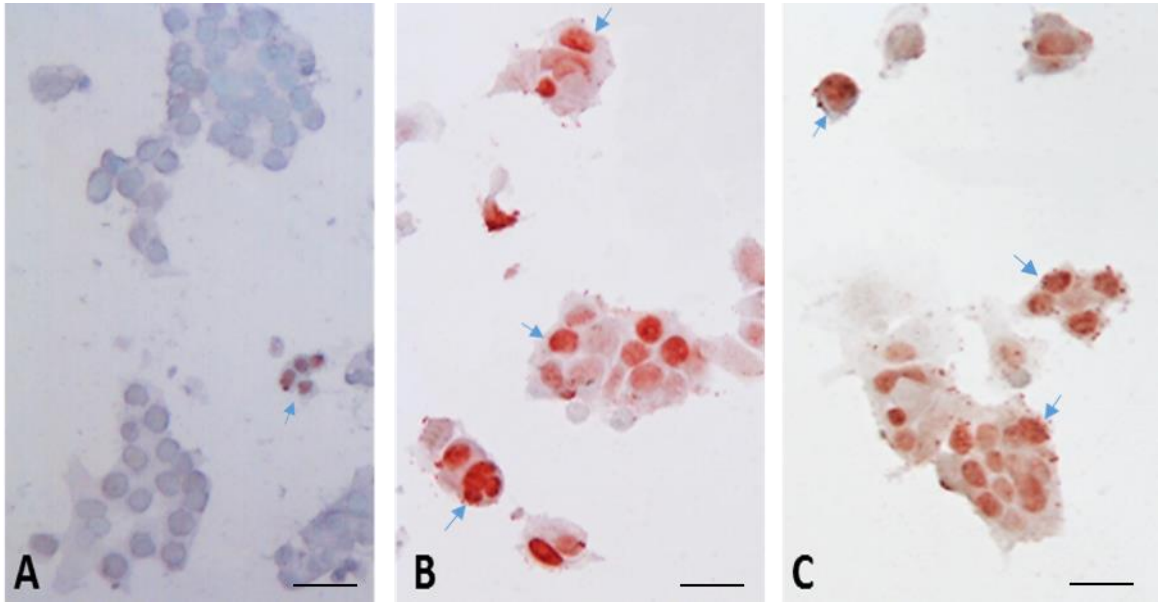


Şekil 4-12: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait aktif kaspaz-3 immünopozitif hücre sayımı sonuçlarının (%) istatistiksel değerlendirilmesi (MDA-MB-231, *p<0.001 kontrol grubuna göre; HeLa, **p<0.0001 kontrol grubuna göre).

4.2.2.2. TUNEL Yöntemi ve Apoptotik indeks

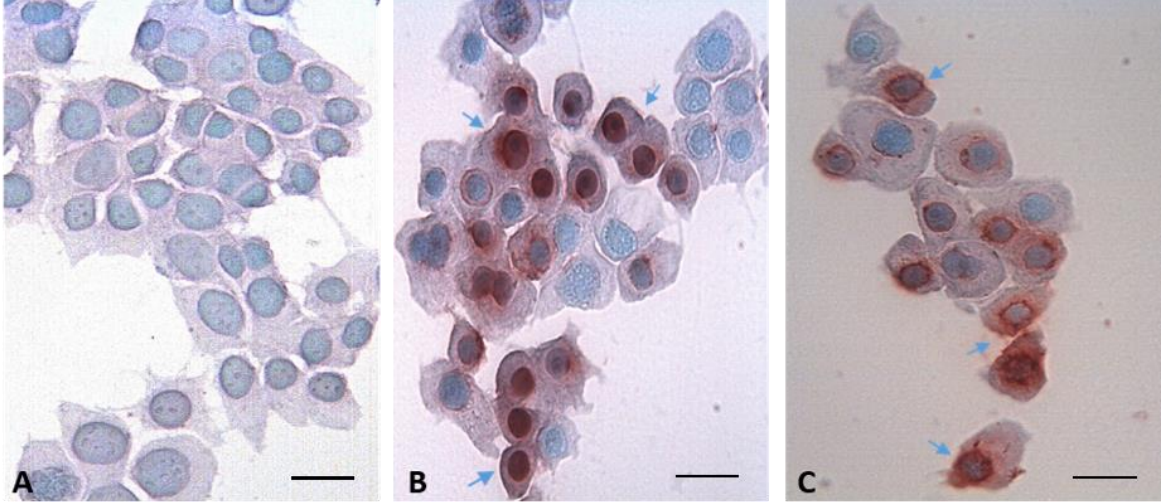
Apoptotik işaretli nukleuslara sahip hücreleri saptamak için yapılan TUNEL yöntemi sonucu, nukleusları kahverengi olarak boyanmış olan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi (Şekil 4-13, 4-14). TUNEL yöntemi ile boyanan hücrelerin, LEICA DM 2500 marka ışık mikroskopunda x20 objektif büyütmesi ile rastgele seçilen 12 alanda TUNEL (+) hücreler sayılarak apoptotik hücre indeksi hesaplandı (Tablo 4-3).

HeLa ve MDA-MB-231 *C.n.* deneyli gruplarında apoptotik hücre indeksi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek ($p<0.0001$) tespit edildi (Şekil 4-15). Ancak her iki hücre soyunun etken dozlarının uygulaması sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin HeLa hücrelerine kıyasla daha dirençli oldukları ve apoptotik indeksinin daha düşük ($p<0.0001$) olduğu tespit edildi (Şekil 4-16).



Şekil 4-13: HeLa hücre soyunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.

(A) Kontrol grubu ve *C. nerimaniae* bitki özütün etken dozunun (1,42 mg/ml) uygulandığı (B, C) deney grubunda 48 saat sonunda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (↑), (Bar; A: 80 µm, B, C: 40 µm).

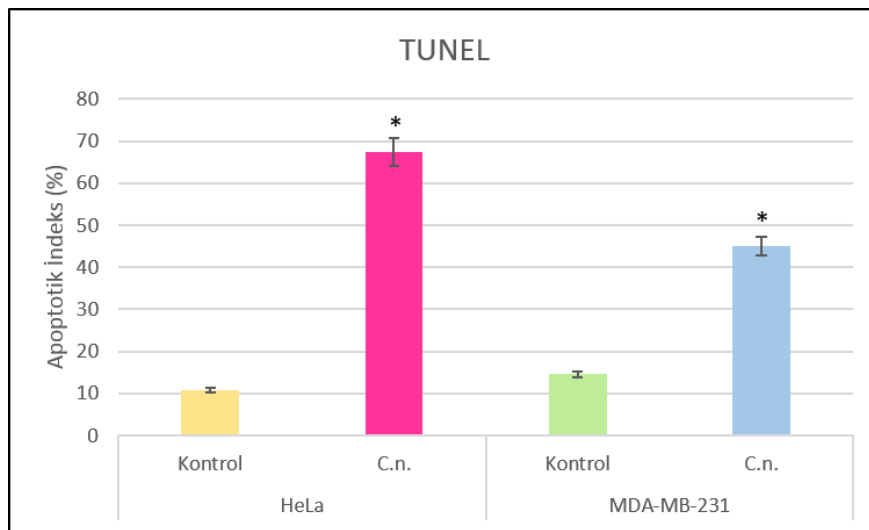


Şekil 4-14: MDA-MB-231 hücre soyunda TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin gösterilmesi.

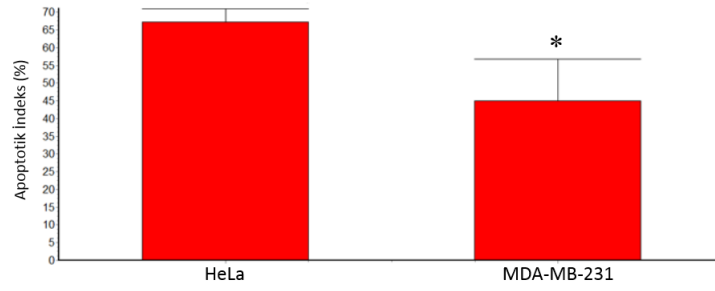
(A) Kontrol grubu ve *C. nerimaniae* bitki özütünün etken dozunun (3,67 mg/ml) uygulandığı (B, C) deney grubunda 72 saat sonunda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (↑), (Bar; A: 40 µm, B, C: 20 µm).

Tablo 4-3: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait ortalama apoptotik hücre indeksi değerleri.

	Kontrol	<i>C. n.</i>
HeLa	10,67 ± 7,06	67,34 ± 3,66
MDA-MB-231	14,54 ± 12,83	45,08 ± 11,79



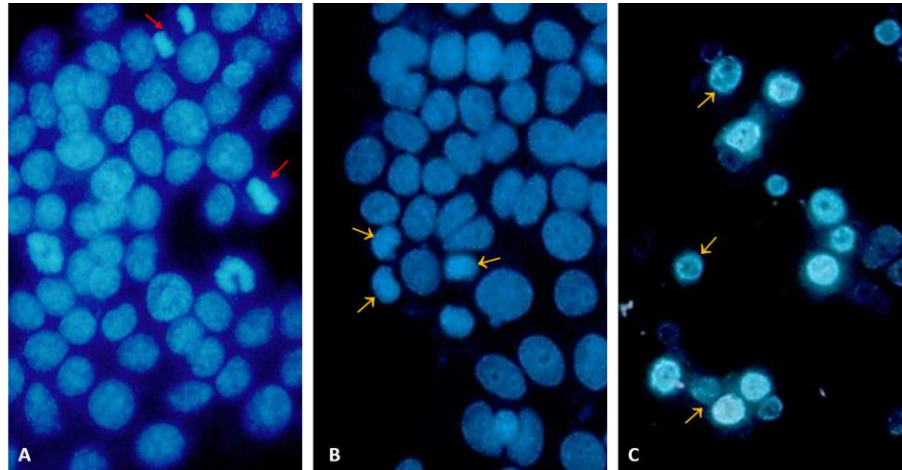
Şekil 4-15: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait apoptotik hücre indeksinin (%) kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi (*p<0.0001, kontrol gruplarına kıyasla).



Şekil 4-16: HeLa ve MDA-MB-231 deney gruplarına ait apoptotik hücre indeksinin (%) istatistiksel olarak değerlendirilmesi (HeLa deney grubuna kıyasla *p<0.0001)

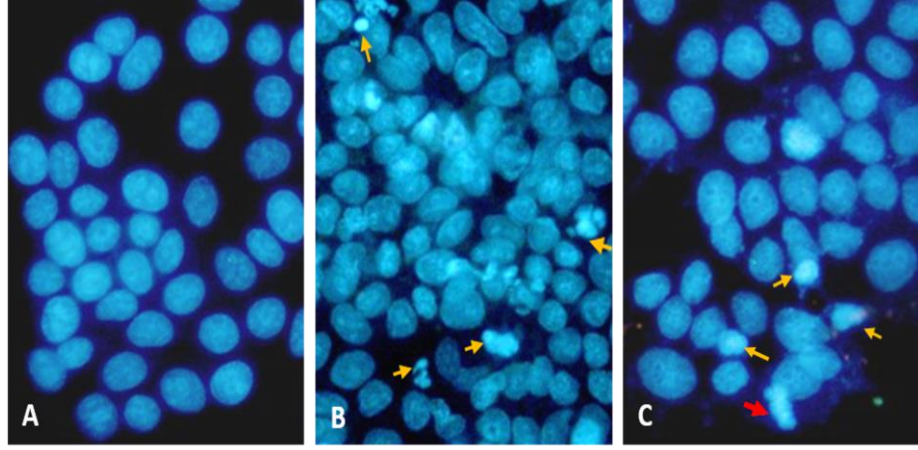
4.2.3. Floresan Mikroskop

Centaurea nerimaniae bitki özütünün (1,42 mg/ml) dozunun HeLa hücre soyu üzerine ve (3,67 mg/ml) dozunun MDA-MB-231 hücre soyu üzerine uygulanması sonucunda 48 ve 72 saat deney süreleri sonunda meydana gelen apoptoza özgü nükleus morfolojisinin özellikleri DAPI ile floresan mikroskopta gözlemlendi (Şekil 4-17, 4-18).



Şekil 4-17: HeLa hücrelerinin DAPI boyaması ile apoptotik hücelere ait nükleus morfolojilerinin floresan mikroskobunda gösterilmesi.

(A) Kontrol grubunda normal ve mitotik (↑) nükleuslar, ve *C. nerimaniae* özütünün etken dozunun (1,42 mg/ml) uygulandığı (B, C) deney grubunda 48 saat sonunda gözlenen apoptotik hücreler (↑), (x40).



Şekil 4-18: MDA-MB-231 hücrelerinin DAPI boyaması ile apoptotik hücelere ait nukleus morfolojilerinin floresan mikroskobunda gösterilmesi.

(A) Kontrol grubunda normal nukleuslar ve *C. nerimaniae* özütünün etken dozunun (3,67 mg/ml) uygulandığı (B, C) deney grubunda 72 saat sonunda gözlenen mitotik (↑) nukleus ve apoptotik hüceler (↑), (x40).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye için endemik bir bitki türü olan *Centaurea nerimaniae* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol özütünden 8 farklı konsantrasyon hazırlanarak HeLa (insan serviks adenokarsinomu) ve MDA-MB-231 (insan meme adenokarsinomu) hücre soyları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırıldı.

Dünya üstünde değişik bölgelerde endemik olarak yetişen *Centaurea* bitkisiyle, farklı tedavi amaçları için farklı türlerin özüt ve/veya bileşikleri ile yapılan çalışmalarda değişik etki mekanizmaları ortaya konulmasına rağmen (Koca ve ark., 2009; Csupor ve ark., 2010; Zengin ve ark., 2010; Aktümsek ve ark., 2013; Erel ve ark., 2014; Özbilgin ve ark., 2014; Koç ve ark., 2015) bu bitkiye ait türlerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri konusunda çok az sayıda çalışma vardır (Csupor ve ark., 2009; Csapi ve ark., 2010; Chicca ve ark., 2011; Erel ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012). *Centaurea* bitkisinin Türkiye’de yetişen endemik türleri ile yapılan daha önceki çalışmalarda antimikrobiyal (Yaylı ve ark., 2005; Buruk ve ark., 2006; Köse ve ark., 2007; Uğur ve ark., 2010; Kahrman ve ark., 2011), antibakteriyal (Uğur ve ark., 2009), antienflamatuar (Koca ve ark., 2009; Erel ve ark., 2014), antimalaryal (Özbilgin ve ark., 2013), antipiretik (Akkol ve ark., 2009), antiviral (Özçelik ve ark., 2007), antiülserojenik (Gürbüz ve ark., 2007; Yeşilada ve ark., 2004) ve antioksidan (Aktümsek ve ark., 2011; Zengin ve ark., 2012; 2013; Erel ve ark., 2014; Koç ve ark., 2015) etkileri gösterilmiştir. Sitotoksik etkileri konusunda ise sadece iki çalışma bulunmaktadır (Erel ve ark., 2011; Erel ve ark., 2014).

Centaurea türlerinden farklı çözeltiler (metanol, etanol, kloroform, vb.) kullanılarak hazırlanan özütlerin yanında ayrıca hazırlandıkları bitki bölümlerine bağlı olarak da farklı etkilere sahip oldukları gösterilmiştir. Erel ve ark. (2014), *C. aphrodisea*, *C. athoa*, *C. hyalolepis*, *C. ibericave* *C. polyclada* türlerinden elde edilen kloroform ve metanol özütleri ile SK-MEL (insan deri malignant melanoma), BT-549 (insan meme karsinomu), KB (insan oro-laringeal skuamöz karsinomu), SK-OV-3 (insan ovaryum adenokarsinomu) hücre soyları üzerindeki çalışmalarında *C. athoa*’nın kloroform özütünün tüm tümör hücre soylarında sitotoksik etki (40–56 µg/ml) gösterdiğini, buna karşılık *C. polyclada*’nın kloroform özütünün BT-549, KB, SK-OV-3

hücrelerinde (sırasıyla, 30, 33 ve 47 $\mu\text{g/ml}$) en güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Türlerin metanol özütlerinin ise çoğunlukla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Csapi ve ark. (2010), *C. arenaria* kloroform özütünün 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lık etken dozunun HeLa, A431 (insan deri epidermoid karsinomu) ve MCF-7 (insan meme adenokarsinomu) hücre soylarında antiproliferatif etkiye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Aynı cinse ait farklı türler içerisinde, birtakım etken maddelerin değişik dozlarda bulunabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Aktümsek ve ark., 2011; Chicca ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012; Salla ve ark., 2013). Bu farklılıkların sıcaklık, toprak içeriği ve rakım gibi çeşitli faktörlere bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. *Centaurea*'nın çeşitli türlerinin birçok etken madde içerdiği, özellikle çok sayıda metoksi ve hidroksi grubu içeren flavonoidler ve lignanların dışında bazı türlerde linoleik asit ve palmitik asit gibi çeşitli yağ asitleri içerdikleri de tespit edilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı *Centaurea* türlerinin gıda endüstrisinde, kozmetikte ve ilaç yapımında kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Zapesochaya ve ark., 1977; Ferguson ve ark., 2003; Trendaflova ve ark., 2007; Djeddi ve ark., 2008; Aktümsek ve ark., 2013).

Forgo ve ark. (2012), Macaristan'da endemik olarak yetişen *Centaurea jacea* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan kloroform özütleri ile yaptıkları bir çalışmada, insan tümör hücre soyları üzerindeki güçlü antiproliferatif etkisinin özütün içerdiği flavon ve seskiterpenoidlere bağlı olduğunu göstermişlerdir. Aynı özütün HeLa, MCF-7 ve A431 hücreleri üzerindeki büyüme inhibisyon aktiviteleri incelenmiş, hücre soyları üzerindeki en yüksek aktiviteyi *Centaureidin* adlı flavonol göstermiştir (IC_{50} : HeLa=0,08; MCF-7=0,13; A431=0,35 μM). Ayrıca izole edilen diğer bileşiklerden; *apigenin*, *cirsilol*, *hispidulin* ve *cnicin*'in de kanser hücre soyları üzerinde orta derecede antiproliferatif etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Erel ve ark. (2011), endemik bir tür olan *C. calolepsis* türünün ikincil metabolitlerini incelemiş ve *Cnicin*'in, LLC-PK1, SK-MEL, KB, BT-549, SK-OV-3, Vero (Afrika yeşil maymun böbrek fibroblastları) ve LLC-PK11 (domuz böbrek epitelyal hücreleri) hücre soylarındaki sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, *Cnicin*'in Vero hücreleri için toksik olmadığı fakat LLC-PK11 (IC_{50} : 23 μM) hücreleri üzerinde çok az bir toksisite gösterdiği, ayrıca diğer 4 kanser hücre soyları arasında SK-MEL ve BT-549 hücrelerinde (sırasıyla IC_{50} : 14 ve 18 μM)

sitotoksiste gösterdiği gözlemlenmiştir. Böylece *Cnicin* maddesinin sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Centaurea nerimaniae türü ile daha önce yapılmış herhangi bir *in vivo* ve *in vitro* çalışma bulunmamaktadır ve kimyasal içeriği henüz tespit edilmemiştir. Bu çalışma ile ilk kez *Centaurea nerimaniae*'den hazırlanan metanol özütünün HeLa ve MDA-MB-231 hücre soyları üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri saptanmıştır. İçerdiği bileşiklerin izolasyonları tamamlandığında sitotoksik ve apoptotik etkilere neden olan maddelerin tespiti önemli bir rol oynayacaktır.

Malign dokularda kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün uyarımı, kanser ilaçlarının geliştirilmesinde stratejik bir öneme sahip olmuştur (Ramasamy ve ark., 2012; Parsaee ve ark., 2013). Çoğunluğu bitkilerin ham özütlerinden ve/veya bileşiklerinden yararlanılarak yapılan doğal kaynakların antikanser etkilerinin araştırılmasında, hayvan deneyleri ve klinik çalışmalardan önce kanser hücre soyları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkinin değerlendirilmesi yapılmaktadır (Ramasamy ve ark., 2012).

Sitotoksiste ve hücre canlılığını tespit etmek amacıyla kullanılan Tripan mavisi, MTT ve XTT gibi yöntemlerin yanında son zamanlarda yeni sistemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada hücre canlılığı ve sitotoksistenin tespit edilmesi amacıyla kullanılan xCELLigence sistemi, hiçbir işaretleme yapılmadan gerçek zamanlı olarak görüntüleme sağlayan çok yönlü bir araçtır. Diğer klasik yöntemlere göre farklı konsantrasyonların farklı zaman dilimlerindeki etken dozlarının belirlenmesi için hassas analizler yapabilen ve kısa sürede daha hızlı sonuç veren güvenilir bir sistemdir (Urcan ve ark., 2010; Ke ve ark., 2011; Daker, 2012; Yalçın ve ark., 2013; Özdemir ve Ark, 2014) *Centaurea nerimaniae* bitki özütünün 8 farklı konsantrasyonunun HeLa ve MDA-MB-231 kanser hücre soylarındaki sitotoksik etkilerini ve hücre canlılığını ölçmek için hücre indeksi (CI) profilleri xCELLigence sistemi kullanılarak tespit edildi. *Centaurea nerimaniae* metanol özütünün hücreler üzerindeki zamana bağlı sitotoksik etken dozları, HeLa hücre soyunda 48. saatte 1,42 mg/ml ve MDA-MB-231 hücre soyunda 72. saatte 3,67 mg/ml olarak belirlendi.

Bu çalışmada HeLa hücre soyu için 48. saatte 1,42 mg/ml olarak saptanan sitotoksik etken dozun, daha önce HeLa hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında (Shiezadeh ve ark., 2013; Matic ve ark., 2013; Akindele ve ark.,

2015) kabul edilebilir sınırlarda olduğu ve bu dozun apoptotik hücre ölümünü belirgin olarak indüklediği gösterildi. Ancak MDA-MB-231 hücre soyu için 72. saatte 3,67 mg/ml olarak tespit edilen sitotoksisite düzeyinin gerek daha önce bu hücre soyu ile yapılan sitotoksisite çalışmalarına (Meng ve ark., 2011; Wong ve ark., 2013; Shebaby ve ark., 2014) gerekse antikanser ajanları için önerilen sitotoksite düzeylerinin üzerinde olduğu tespit edildi. MDA-MB-231'in etken dozunun sitotoksik ve apoptotik etkilerine rağmen HeLa hücreleri ile kıyaslandığında MDA-MB-231 hücre soyunun daha dirençli olduğu ve kullanılan özütün HeLa hücre soyu için anti-kanser amaçlı kullanımının daha uygun olabileceği düşünüldü. Ancak daha sonraki çalışmalarda *C. nerimaniae* özütü farklı maddelerle (kloroform, etanol, vd.) çözündürüldüğünde MDA-MB-231 hücre soyu üzerindeki etkilerinin araştırılması uygun olacaktır.

Centaurea nerimaniae'nin sitotoksik etken dozunun HeLa ve MDA-MB-231 soyları üzerindeki hücresel etkilerini değerlendirmek amacıyla morfolojik görüntüleme yöntemleri kullanıldı ve apoptozun uyarıldığı tespit edildi. Etken doz uygulanan gruplarda hem HeLa hem de MDA-MB-231 hücre soyunda faz-kontrast mikroskobu ve floresan mikroskobu altında apoptotik hücrelerin nukleuslarında meydana gelen tipik morfolojik değişiklikler tespit edildi. Etken doz uygulamaları ile HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinde yuvarlaklaşma, membran tomurcuklanması, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimler gibi apoptoza özel morfolojik değişimler tespit edildi. Her iki hücre soyu grubunda sitotoksik etken dozların apoptotik hücre ölümünü uyardığı TUNEL yöntemi ve aktif kaspaz-3 tayini ile de desteklendi.

Apoptoz uyarılması ile sitoplazmada bulunan aspartat-spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivasyonu apoptoza özgü morfolojik değişimlerin ortaya çıkmasında çok önemli bir role sahiptir. Apoptoz uyarıcıları ile mitokondriyumdan sitokrom-c'nin sitozole salınımından sonra, sit-c, Apaf-1, dATP ve prokaspaz-9, birlikte apoptozomu oluştururlar ve kaspaz-9 bu komplekste aktifleştirilir, aktif kaspaz-9 da kaspaz-3'ü etkin hale getirir. Diğer taraftan dış kaynaklı apoptoz uyarıcıları ile ölüm reseptörleri aracılığı ile aktifleştirilen kaspaz-8 de kaspaz-3'ü aktifleştirir. Kaspaz-3, başta hücre iskeleti proteinleri olmak üzere hücre içinde birçok işlevsel ve yapısal proteinin yıkılmasında rol alır. Ayrıca ICAD'i keserek aktifleşen endonukleaz, CAD'ın nukleusa girişini sağlar, nukleusta DNA fragmentasyonuna neden olarak hücreyi ölüme götürür. (Hacker,

2000; Ziegler ve Groscurth, 2004; Elmore, 2007; O'Brien ve ark., 2008; Salvesen ve Riedl, 2008; Öztürk, 2011; Galuzzi, 2012).

Kaspaz-3 aktivasyonu, apoptotik sinyal iletiminde ve işlevlerinde çok önemli bir rol alır ve apoptotik hücre ölümünün bir belirteci olarak kabul edilir. Bu çalışmada HeLa için kullanılan özütün 1,42 mg/ml dozu, MDA-MB-231 için 3,67 mg/ml dozunun sitotoksik etkisinin apoptoz üzerinden ve kaspaz-3 aktivasyonu uyarılması ile ilişkili olduğu tespit edildi. Her iki hücre soyunda da özüt uygulaması yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla kaspaz-3 aktivasyonunun anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edildi.

Apoptoz belirteci olarak kabul edilen kaspaz-3 aktivasyonunun tespiti için kullanılan İHK boyama yöntemi ile sitoplazmaları pozitif boyanan hücreler, apoptotik hücreler olarak kabul edilir. Bu çalışmada da sitoplazmaları boyanan kaspaz-3 (+) hücreler, özütün uygulandığı HeLa hücrelerinde ($p<0.0001$) ve MDA-MB-231 hücrelerinde ($p<0.001$) kontrol gruplarına kıyasla yüksek oranda tespit edildi. Ancak özellikle her iki hücre soyu karşılaştırıldığında, HeLa hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonunun MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu ($p<0.0001$) ve MDA-MB-231 hücrelerinin bu özüte karşı kaspaz bağımlı apoptotik hücre ölümüne daha dirençli olduğu sonucuna varıldı.

Bu çalışmada gözlenen bir diğer önemli bulgu da MDA-MB-231 hücre soyuna ait deney grubunda tespit edildi. Etken dozun uygulandığı grupta, hücrelerin sitoplazmalarının haricinde nükleus ve/veya sitoplazma pozitifliklerinin de varlığı saptandı. Apoptozun uyarılmasının ardından nükleusun morfolojik değişikliklerinden sorumlu olan aktif kaspaz-3 normal koşullarda sitoplazmada yerleşik olarak bulunur. Ancak diğer bazı çalışmalarda da, nükleusta kaspaz-3 immünpozitifliğinin gözlemlendiğine dair bulgular bildirilmiştir (Martins ve ark., 1997; Gu ve ark. 1999; Kim ve ark., 2000). Kim ve ark. (2000), Leydig hücre kültüründe, EDS (etan dimetanesülfonat)'nin apoptozu indüklediğini TUNEL (+) ve kaspaz-3 (+) ile tespit etmişler ve çalışmalarında kaspaz-3 İHK boyanmalarının sitoplazma haricinde nükleusta da olduğunu göstermişlerdir. Özellikle yoğun nüklear kaspaz-3 immünreaktivitesinin TUNEL (+) hücrelerde olduğunu vurgulamışlar, EDS uygulamasından 12 ve 24 saat sonra gözlenen bu boyanmanın aktif kaspaz-3'ün nükleusa transportu ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sitoplazmadaki aktif kaspaz-3'ün nükleusa taşınmasındaki rolünün ne

olduğu bilinmemekle birlikte, DNA fragmentasyonu ve apoptotik işlemlerdeki nukleusun terminal olaylarının gerçekleşmesinde rol alan birtakım proteinlerin aktivasyonları ile ilgili rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kamada ve ark. (2005), anti-Fas antikoru ile uyarılan HepG2 (insan karaciğer karsinomu) hücrelerinde, aktif kaspaz-3'ün p17 ve p12 alt ünitelerinin İHK ile nukleustaki varlıklarını göstermişlerdir. GFP (yeşil floresan protein) kullanarak kaspaz-3'ün nukleusa aktif olarak taşındığını göstermişler, bu konuda henüz bilinmeyen ve saptanmayan birtakım taşıyıcı proteinlerin iş gördüğünü ve transport mekanizmalarının moleküler yollarının aydınlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Daha sonra Lou ve ark. (2010), aktif kaspaz-3'ün crm-1-bağımsız nuklear eksport sinyali (NES) taşıdığını ve bazı koşullarda henüz bilinmeyen birtakım mekanizmalarla herhangi bir apoptotik uyarı olmaksızın da nukleusa taşındığını ileri sürmüşlerdir. Kamada ve ark. (2005) bazı durumlarda aktif kaspaz-3'ün yoğun bir şekilde nukleusun sitoplazmik yüzüne bakan bölgesinde yoğunlaştığını, nukleusların çevresinde veya içinde pozitif olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. Aktif kaspaz-3 tarafından kesilen CAD, DFF 40 (DNA fragmentasyon faktörü 40) ve Acinus (apoptotik kromatin kondensasyon indükleyici) gibi bazı nukleus çevresinde bulunan sitoplazmik substratların apoptoz indüksiyonundan sonra nukleusa geçtikleri ve apoptotik nuklear morfolojiyi oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da MDA-MB-231 hücre soyunda özütün etken dozunun uygulandığı grupta, Kim ve arkadaşlarının (2000) Leydig hücreleri üzerine EDS uygulamasıyla uyardıkları apoptotik hücrelerde gözlemledikleri gibi, hem TUNEL pozitif hücrelerde hem de apoptotik olmayan kanser hücrelerinde kaspaz-3 nuklear pozitifliğinin olduğu, bazı hücre gruplarında ayrıca nukleusun çevresinde aktif kaspaz-3 immünpozitifliği belirgin olarak gözlemlendi. Nukleustaki kaspaz-3'ün varlığının tespit edilmesine karşın, halen buradaki rolünün ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Faleiro ve Lazebnik (2000), kaspaz-9'un nuklear transportu bozduğu, özellikle nuklear porların difüzyon limitlerini arttırdığı ve kaspaz-3'ün bu yolla nukleusa geçtiğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da metastatik özelliği güçlü olan MDA-MB-231 hücrelerindeki nuklear aktif kaspaz-3 varlığının, hücre soyunun apoptotik yollarındaki yanıtına bağlı olabileceği ve nukleusta DNA fragmentasyonunu kontrol eden

proteinlerin veya hücre döngüsünü kontrol eden proteinlerin üzerinde rolü olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada ayrıca MDA-MB-231 deneyli grupta, bazı TUNEL pozitif hücrelerde nuklear kondensasyonun belirgin olarak nukleus periferine yerleştiği tespit edildi. Zhou ve ark. (2009), UC14 (insan mesane hücre soyu) hücrelerinde apoptoz uyarımından sonra TUNEL boyamasının özellikle periferik nuklear kromatin kondensasyonu şeklinde olduğunu ve bu hücrelerde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonuna dair bir bulgu tespit etmediklerini bildirmişlerdir. Kaspaz bağımsız DNA fragmentasyonu olduğunda, bazı durumlarda TUNEL pozitifliğinin bu şekilde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan özütün MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız gibi farklı yollardan hücreleri apoptoza götürdüğü düşünüldü.

Bu tez çalışmasında, ülkemize özgü endemik bir bitki olan *Centaurea nerimaniae* bitki özütünün farklı konsantrasyonlarının, HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik, apoptotik ve anti-tümoral etkilere sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu tez çalışması, *C. nerimaniae* bitki özütü ile yapılan ilk çalışma özelliğine sahiptir.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, yeni ve daha etkili anti-tümöral ajanların bulunmasında ülkemizde yetişen endemik türlerin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu endemik türler, bilimsel alanda sağlayacağı fayda dışında, ülkemiz ekonomisine de önemli katkıları olacağından büyük öneme sahiptir.

Daha sonraki çalışmalarda *Centaurea nerimaniae*'den izole edilecek etken bileşiklerin kimyasal yapılarının belirlenmesi ile her birinin sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik hücre yolakları üzerindeki moleküler etkilerinin tespit edilmesi, özütün kansere karşı yeni bir ajan olarak değerlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

Adey, A., Burton, JN., Kitzman, JO., Hiatt, JB., Lewis, AP., Martin, BK., et al. (2013). The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature*, 500, 207–211.

Adjei, IM., and Blanka, S. (2015). Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: A biomaterials approach. *Journal of Functional Biomaterials*, 6, 81-103.

Akindele, AJ., Wani, ZA., Sharma, S., Mahajan, G., Satti, NG., Adeyemi OO. (2015). *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of root extracts of *Sansevieria liberica* gerome and labroy (Agavaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 560404, 11 pages.

Akkol, EK., Arif, R., Ergun, F., Yeşilada, E. (2009). Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 18, 210-5.

Aktümsek, A., Zengin, G., Guler, GO, Cakmak, YS., Duran, A. (2011). Screening for *in vitro* antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. Species from Turkey Flora. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2914-2920.

Aktümsek, A., Zengin, G., Guler, GO., Cakmak, YS., Duran, A. (2013). Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chemistry*, 141, 91–97.

Alabsi, AM., Ali, R., Ali, AM., Al-Dubai, AR., Harun, H., Abu Kasim, NH., Alsalahi, A. (2013). Apoptosis induction, cell cycle arrest and *in vitro* anticancer activity of Gonothalamin in a cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 5131-6.

Ali, R., Mirza, Z., Ashraf, MD., Kamal, MA., Ansari, SA., Damanhour, GA. (2012). New anticancer agents: Recent developments in tumor therapy. *Anticancer Research*, 32, 2999-3006.

Alia M., Mateos R., Ramos S., Lecumberri E., Bravo L., Goya L. (2006). Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition*, 45, 19–28.

Aliabadi, A., Hasanvand, Z., Kiani, A., and Saber, S. (2013). Synthesis and *in vitro* cytotoxicity assessment of n-(5-(Benzylthio)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl) acetamide with potential anticancer activity. *Mirabdali Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 687-693.

Arif R., Küpeli E., Ergun F. (2004). *Centaurea* L. Türlerinin biyolojik aktivitesi (Derleme), *GÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 17, 149-164.

Atik, AD., Öztekin, M., Erkoç, F., (2010). Biyoçeşitlilik ve Türkiye'deki endemik bitkilere örnekler. *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 30, 1.

Avcı, M. (2005). Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi*, 13, 27-55.

Banerjee, R., Kamrava, M. (2014). Brachytherapy in the treatment of cervical cancer: a review. *International Journal of Women's Health*, 6, 555–564.

Başer, HC. (2001). Phytochemical diversity in the flora of Turkey, plants of the Balkan Peninsula: into the Next Millenium, Proceeding of the 2nd Balkan Botanical Congress (Ed. N. Özhatay), İstanbul, 517–528.

Baytop, T. (1984). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, 3637, Ecz. Fak. No. 40, İstanbul, 240-376.

Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. *Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul, 4-10.

Benazzi, C., Al-Dissi, A., Chau, CH., Figg, WD., Sarli, G., de Oliveira, JT., and Gartner, F. (2014). Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology. *The Scientific World Journal*, 919570, 16 pages.

Berridge, MV., Herst, PM., Tan, AS. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-52.

Bertheu, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., et al. (2013). p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast*, 2, 27-9.

Binkhorst, L., Mathijssen, RH., Jager A., van Gelder, T. (2015). Individualization of tamoxifen therapy: Much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treatment Reviews*, 41, 289-99.

Bisi, A., Gobbi, S., Merolle, L., Farruggia, G., Belluti, F., Rampa, A., Molnar, J., et al. (2015). Design, synthesis and biological profile of new inhibitors of multidrug resistance associated proteins carrying a polycyclic scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 471-480.

Blagosklonny, MV. (2005). Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. *Cell Death and Differentiation*, 12, 592-602.

Borenfreund, E., and Puerner, JA. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24, 119-24.

Brown, AJ., Trimble, CL. (2012). New technologies for cervical cancer screening. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2, 233-42.

Buruk, K., Sokmen, A., Aydin, F., Erturk, M. (2006). Antimicrobial activity of some endemic plants growing in the Eastern Black Sea Region, Turkey. *Fitoterapia*, 77, 388-91.

Chen, G. and Emens, L.A. (2013). Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62, 203-16.

Chicca, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertugrul, K., Flamini, G., Nieri, P. (2011). Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 3066-3070.

Constance, J.E., and Lim, C.S. (2012). Targeting malignant mitochondria with therapeutic peptides. *Therapeutic Delivery*, 3, 961-979.

Csapi, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Berenyi, A., Forgo, P., Szabo, P., and Hohmann, J. (2010). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapy Research*, 24, 1664-1669.

Csupor, D., Blazso, G., Balogh, A., Hohmann, J. (2010). The traditional Hungarian medical plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 193-195.

Dağdeviren, Ö. (2010). Acı Çiğdem (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum baytopiorum* C.D.) ekstrelerinin Hela hücreleri üzerine anti-tümöral etkilerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi.

Davis, P.H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, 10, 590.

De Smet P.A. (2004). Health risks of herbal remedies: an update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 76, 1–17.

Degterev, A. and Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 378-90.

Deng, X., Song, H., Zhou, Y., Yuan, G. and Zheng, F. (2013). Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin *in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6, 1155-1158.

Dewson, G., and Kluck, RM. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2, 9-22.

Djeddi, S., Argyropoulou, C., Skaltsa, H. (2008). Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp *grisebachii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 336-339.

Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsac, C. and Skaltsaa, H. (2008). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3725-3731.

Drake, WP., Ungaro, PC., Mardiney, MR. (1972). Formalin-fixed cell preparations as standards for use in the automated trypan blue cytotoxic assay. *Transplantation*, 14, 127-30.

El-Najjar, N., Dakdouki, S., Darwiche, N., El-Sabban, M., Saliba, N.A. and Gali-Muhtasib, H. (2008). Anti-colon cancer effects of Salograviolide A isolated from *Centaurea ainetensis*. *Oncology Reports*, 19: 897-904.

Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.

Erel, ŞB., Demir, S., Nalbantsoy, A., Ballar, P., Khan, S., Karabay Yavasoglu, NU., Karaalp, C. (2014). Bioactivity screening of five *Centaurea* species and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical Biology*, 52, 775-81.

Erel, ŞB., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S., Krenn, L. (2011). Secondary metabolites of *Centaurea calolepsis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical Biology*, 49, 840-849.

Erinç, S. (1978). Changes in the physical environment in Turkey since the end of the last glacial: in Brice, W. C., ed., *The Environmental History of the Near and Middle East*, Academic Press, London, ss. 87-110.

Ertuğ, F. (2004). Bodrum yöresinde halk tıbbında yararlanılan bitkiler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. *Bildiriler kitabı* (Ed. K.H.C. Başer ve N. Kırimer), 76–93.

Eskander, RN., and Tewari, KS. (2015). Immunotherapy: An evolving paradigm in the treatment of advanced cervical cancer. *Clinical Therapeutics*, 37, 20-38.

Evan, GI., Vousden, KH. (2011). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411, 342-347.

Exposito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, MH., Cusido RM., and Palazon, J. (2009). Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 109-121.

Faleiro, L., and Lazebnik, Y. (2000). Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *Journal of Cell Biology*, 151, 951-959.

Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, MS. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11, 52 – 67.

Ferguson, CA., Nahar, L., Finnie, D., Kumarasammy, Y., Reid, R., Mir-Babayev, NF., Sarker, SD. (2003). *Centaurea scabiosa*: a source of dibenzyl butyrolactone lignans. *Biochemistry and Systematic Ecology*, 31, 303-305.

Ferlay, J., Soerjomataram, EM., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., et al. (2013). Cancer incidence and mortality worldwide: *International Agency for Research on Cancer*, No. 11, Lyon, France.

Foo, JB., Yazan, LS., Tor, YS., Armania, N., Ismail, N., Imam, MU., et al. (2014). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in caspase-3 deficient MCF-7 cells by *Dillenia suffruticosa* root extract via multiple signalling pathways. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 197.

Forgo, P., Zupko, I., Molnar, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J. (2012). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*, 83, 921-925.

Freshney, RI., 2000, Cell Lines, Culture of animal cells: a manual of basic technique, Wiley-Liss, New York, 177-194.

Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International Journal of Molecular Science*, 9, 1096-1107.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, JM., Alnemri, ES., Baehrecke, EH., Blagosklonny, MV., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 15, 1-14.

Goldar, S., Khaniani MS., Derakhshan, SM., Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 2129-2144.

Gu, J., Dong, RP., Zhang, C., McLaughlin, DF., Wu, MX., Schlossman, SF. (1999). Functional interaction of DFF35 and DFF45 with caspase-activated DNA fragmentation nuclease DFF40. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 20759-20762.

Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 8, 26.

Gürbüz, I., Yeşilada, E. (2007). Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various *in vivo* and biochemical techniques. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 284-91.

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301, 5-7.

Hanahan, D., and Weinberg, RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, 646-74.

Handa, SS., Khanuja, SP., Longo, G., and Rakesh, DD. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International Centre For Science and High Technology*. Trieste: ICS UNIDO.

Harput, Ş. (2010). Yeni İlaç Geliştirme Çalışmalarında Tıbbi Bitkiler. *Merkezefendi Geleneksel Tıp Dergisi*, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Zeytinburnu, İstanbul.

Hon Lee, PN., and Shing Ho, W. (2013). Antiproliferative activity of gambogic acid isolated from *Garcinia hanburyi* Hep3B and Huh7 cancer cells. *Oncology Reports*, 29, 1744-1750.

Howat, S., Park, B., Oh IS., Jin Y., Lee E., and Loake, GJ. (2014). Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *New Biotechnology*, 31, 242-5.

http://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=tr.html

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/hela/helacells.html>

http://php.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php?title=2009_Group_2_Project.html

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., et al. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, 1518-20.

Iwamoto, LH., Vendramini-Costa, DB., Monteiro, PA., Tasca Goiz Ruiz, AL., de Oliveira Sousa, IM., Foglio, MA. (2015). Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 948737.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010). Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60, 277-300.

Ji, HF., Li, XJ., and Zhang, HY. (2009). Natural products and drug discovery. *EMBO reports*, 10, 194-200.

Joosse, SA., Gorges, TM., Pantel, K. (2015). Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*, 7, 1-11.

Jost, LM., Kirkwood, JM., Whiteside, TL. (1992). Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunological Methods*, 147, 153-65.

Jung, S., Moon, HI., Ohk, J., Lee S, Li, C., Kim, SK., Lee, MS. (2012). Inhibitory effect and mechanism on antiproliferation of isoatriplicolide tiglate (PCAC) from *Paulownia coreana*. *Molecules*, 17, 5945-1.

Kahriman, N., Tosun, G., İskender, NY., Karaoglu, AŞ., Yaylı, N. (2012). Antimicrobial activity and a comparative essential oil analysis of *Centaurea*

pulcherimma Willd. var. *pulcherimma* extracted by hydrodistillation and microwave distillation. *Natural Product Research*, 26, 703-12.

Kalluri, R., Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 392-401.

Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., and Hunter, T. (2005). Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *The Journal Of Biological Chemistry*, 280, 857–860.

Kandemir, A. ve Beyazoglu, O.: Köse dağlarının (Gümüşhane) tıbbi ve ekonomik bitkileri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6, 148-157.

Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, YL., Girard, L., Gandhi, J. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *Public Library of Science One*, 4 (7):e6146.

Karagöz, A., Zencirci, N., Tan, A., Taşkın, T., Köksel, H., Sürek, M., Toker, C. ve Özbek, K. (2010). Bitki genetik kaynaklarının korunması ve kullanımı. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 155-177, Ankara.

Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S., & Khan, I. A. (2007). Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. *Phytotherapy Research*, 21, 488–491.

Ke, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, YA. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in Molecular Biology*, 740, 33-43.

Kim, J-M., Luo, L., and Zirkin, BR. (2000). Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology*, 141, 1846-1853.

Kma, L. (2013). Roles of plant extracts and constituents in cervical cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 3429-36.

Koca, U., Süntar, IP. Keles, H., Yeşilada, E., Akkol, EK. (2009). *In vivo* anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. Ex Spreng. *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 551-6.

Koç, S., Isgor, YG., Shomali Moghaddam, N., Yildirim, O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical Biology*, 53, 746-51.

Koh, JY., Choi, DW. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods*, 20, 83-90.

Korkina, L. and Kostyuk, V. (2012). Biotechnologically produced secondary plant metabolites for cancer treatment and prevention. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 265-275.

Kozovska, Z., Gabrisova, V., Kucerova, L. (2014). Colon cancer: Cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 68, 911-916.

Köse, Y., Iscan, G., Demirci, B., Baser, KH., Celik, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis*. *Fitoterapia*, 78, 253-4.

Kuete, V., Seo, E., Krusche, B., Oswald, M., Wiench, B., Schröder, S., et al. (2013). Cytotoxicity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional Korean Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 341724.

Kumar, M., Nagpal, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A, Singh. S., et al. (2012). Targeted cancer therapies: the future of cancer treatment. *Acta Biomedica*, 83, 220-33.

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14, 32-43.

Kustermann, S., Boess, F., Buness, A., Schmitz, M., Watzele, M., Weiser, T., et al. (2013). A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in Vitro*, 27, 1589-1595.

Kültür, Ş. (2010). *Centaurea nerimaniae* sp. nov. (Asteraceae) from South Anatolia, Turkey. *Nordic Journal of Botany*, 28, 613-616.

Lavrik, IN., and Krammer, PH. (2009). Life and death decisions in the CD95 system: main proand anti-apoptotic modulators. *ACTA Naturea*, 1, 80-3.

Li, WY., Chana, SW., Guob, DJ., Chunga, MK., Leunga, TY., Yua, PH. (2009). Water extract of *Rheum officinale* Baill. induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 and human breast cancer MCF-7 cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 251-256.

Liu, B., Bian, H., Bao, J. (2010) Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287, 1–12.

Lockshin, RA, Zakeri, Z: Cell death in health and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1214-24.

Luo, M., Lu, Z., Sun, H., Yuan, K., Zhang, Q., Meng, S. (2010). Nuclear entry of active caspase-3 is facilitated by its p3-recognition-based specific cleavage activity. *Cell Research*, 20, 211-222.

Macklndoe, JH. (1979). Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49, 272-7.

Mahata, S., Maru, S., Shukla, S., Pandey, A., Mugesh, G., Das, BC., et al. (2012). Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 15.

Makkouk, A. and Weiner, GJ. (2014). Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Research*, 75, 5-10.

Malich, G., Markovic, B., Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124, 179-92.

Martin, HL., Smith, L., Tomlinson, DC. (2014). Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 6, 1-13.

Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Munoz-Capo, S. Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, JC. (2014). xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets and Therapy*, 7, 985-994.

Martinou, JC., and Youle, RJ. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental Cell*, 21, 92-101.

Martins, LM., Kottke, T., Mesner, PW., Basi, GS., Sinha, S., Frigon, Jr N., et al. (1997). Activation of multiple interleukin-1b converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7421-7430.

Marzo, I., Naval, J. (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: Promises and pitfalls. *Biochemical Pharmacology*, 86, 703-710.

Matic, IZ., Aljancic, I., Zizak, Z., Vajs, V., Jadranin, M., Milosavljevic, S., et al. (2013). *In vitro* antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 36.

Mehdi, WA., Zainulabdeen, JA., Mehde, AA. (2013). Investigation of the antioxidant status in multiple myeloma patients: effects of therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, 3663-7.

Meng LY., Liu, HR., Shen, Y., Yu Q., Tao, X. (2011). Cochinchina momordica seed extract induces G2/M arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by modulating the PI3K/Akt pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 3483-8.

Miller, K., Neilan, B., and Sze, MY. (2008). Development of taxol and other endophyte produced anti-cancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 3, 14-19.

Moghaddam, G., Ebrahimi, SA., Rahbar-Roshandel, N., Foroumadi, A. (2012). Antiproliferative activity of flavonoids: influence of sequential methoxylation state of the flavonoid structure. *Phytotherapy Research*, 26, 1023–1028.

Moirangthem, DS., Laishram, S., Borah, JC., Kalita, MC., and Talukdar, NC. (2014). *Cephalotaxus griffithii* Hook.f. needle extract induces cell cycle arrest, apoptosis and suppression of hTERT and hTR expression on human breast cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 305.

Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Mycek, MJ., Harvey, RA., Champe, PC. (1998). Kemoterapötik İlaçlar, Oktay, Ş., Farmakoloji, *Nobel Tıp Kitapevleri*, 373-400, İstanbul.

Nemati, F., Dehpouri, AA., Eslami, B., Mahdavi, V., Mirzanejad, S. (2013). Cytotoxic properties of some medicinal plant extracts from Mazandaran, Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15:e8871.

O'Brien, MA. and Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18, 572-585.

Obiorah, IE., Fan, P., Sengupta, S., Jordan, VC. (2014). Selective estrogen-induced apoptosis in breast cancer. *Steroids*, 90, 60-70.

Olsson, M. and Zhivotovsky, B. (2011). Caspases and cancer. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1441-1449.

Ostermann, T., Raak, C., and Büssing, A. (2009). Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer*, 9, 451.

Özbilgin, A., Durmuskahya, C., Kayalar, H., Ostan, I. (2014). Assesment of *in vivo* antimalarial activities of some selected medicinal plants from Turkey. *Parasitology Research*, 113, 165-73.

Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T., Yeşilada, E. (2007). Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiology Research*, 164, 545-52.

Özgüven, M., and Şekeroğlu, N. (2007). Agricultural practices for high yield and quality of black cumin (*Nigella sativa* L.) cultivated in Turkey. *Acta Horticulturae*, 756, 329-338.

Öztürk, M. (2009). Apoptoz ve Kanser. Bölüm 1. Kanser Biyolojisi. *Pediyatrik Onkoloji* Editör; Alp Özkan. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Sayfa: 63-82.

Öztürk, M. (2011). Apoptosis and Disease. In *Methods for Cellular and Molecular Diagnostics in Human Pathology*, 44-63. (Eds. A Chesca and M Öztürk) İstanbul University, Press House.

Park, G., Kim, HG., Hong, S-P., Kim, SY., Oh, MS. (2013). Walnuts (Seeds of *Juglandis sinensis* L.) protect human epidermal keratinocytes against UVB-induced mitochondria-mediated apoptosis through upregulation of ROS elimination pathways. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27, 132-140.

Parsaeea, H., Asilib, J., Mousavic, SH., Soofid, H., Emamib, SA., and Tayarani-Najarane, Z. (2013). Apoptosis induction of *Salvia chorassanica* root extract on human cervical cancer cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 75-83.

Petros, AM., Olejniczak, ET., Fesik, SW. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644, 83-94.

Piccolella, M., Crippaa, V., Messia, E., Tetel, MJ., Poletti, A. (2014). Modulators of estrogen receptor inhibit proliferation and migration of prostate cancer cells. *Pharmacological Research*, 79, 13-20.

Pilatova, M., Varinska, L., Perjesi, P., Sarissky, M., Mirossay, L., Solar, P., et al. (2010). *In vitro* antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicology in Vitro*, 1347–1355.

Ramasamy, S., Wahab, NA., Abidin, NZ., Manickam, S., Zakaria, Z. (2012). Growth Inhibition of human gynecologic and colon cancer cells by *Phyllanthus watsonii* through apoptosis induction. *Public Library of Science One*, 7: e34793.

Rigg, L., Lenczewski, M. Ve Jones, L. 2005, Endemism and ultramafic soils in New Caledonia: *Araucaria laubenfelsii* as a case study, Association of American Geographers, 2005 Annual Meeting, Abstracts.

Roche Diagnostics GmbH. (2008). Introduction of the RTCA SP Instrument. RTCA SP Instrument Operator's Manual, A. Acea Biosciences, Inc.; 2008. pp. 14–16.

Rosselli, S., Bruno, M., Maggio, A., Raccuglia, R.A., Bancheva, S., Senatore, F., Formisano, C. (2009). Essential oils from the aerial parts of *Centaurea cuneifolia* Sibth. & Sm. and *C-euxina* Velen., two species growing wild in Bulgaria. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 426-431.

Safarzadeh, E., Sandoghchian Shotorbani, S., Baradaran, B. (2014). Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4 (Suppl 1), 421-427.

Salla, M., Fakhoury, I., Saliba, N., Darwiche, N., Gali-Muhtasib, H. (2013). Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanapartholide. *Journal of Natural Medicines*, 67, 468-479.

Salvesen, GS., Riedl, SJ. (2008). Caspase mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 615, 13-23.

Samarghandian, S., Borji, A., Farahmand, SK., Afshari, R., and Davoodi, S. (2013). *Crocus sativus* L. (Saffron) stigma aqueous extract induces apoptosis in alveolar human lung cancer cells through caspase-dependent pathways activation. *BioMed Research International*, 417928.

Sezgin, C. (2010). Kanserde Bitkilerle Tedavide Örnek Uygulamalar. *Merkezefendi Geleneksel Tıp Dergisi*, Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, Zeytinburnu, İstanbul.

Sgadari, C., Toschi, E., Palladino, C., Barillari, G., Carlei, D., Cereseto, A., et al. (2000). Mechanism of paclitaxel activity in Kaposi's Sarcoma. *Journal of Immunology*, 165, 509-517.

Shajahan-Haq, AN., Cheema, MS., Clarke, R. (2015). Application of metabolomics in drug resistant breast cancer research. *Metabolites*, 5, 100-18.

Shebaby, WN., Mroueh, M., Bodman-Smith, K., Mansour, A., Taleb, R., Daher, CF., El-Sibai, M. (2014). *Daucus carota* pentane-based fractions arrest the cell cycle and increase apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 387.

Sherer, WF., Syverton, JT., and Gey, GO. (1953). Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine*, 97, 695-710.

Shiezadeh, F., Mousavi, SH., Amiri, MS., Iranshahi, M., Tayarani-Najaran, Z., and Karimi, G. (2013). Cytotoxic and apoptotic potential of *Rheum turkestanicum* Janisch root extract on human cancer and normal cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 811-819.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2014). Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 64, 9–29.

Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., and Lorberboum-Galski, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *Scientific World Journal*, 721402.

Stoddart, MJ. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods in Molecular Biology*, 740, 1-6.

Sun, Y., Gui, T., Shimokado, A., and Muragaki, Y. (2013). The role of Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome (TRPS)1 in apoptosis during embryonic development and tumor progression. *Cells*, 2, 496-505.

Şimşek, I., Aytekin, F., Yeşilada, E., Yıldırım, Ş. (2004). Anadolu’da halk arasında bitkilerin kullanılış amaçları üzerinde etnobotanik bir çalışma, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. *Bildiriler kitabı*. (Ed. K. H. C. Başer ve N. Kırimer), 434-457.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, HA., Yumrutas, O., and Sokmen, A. (2006). Screening of antioxidative properties of the methanolic extracts of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey., *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Benth) Borm., *Centaurea mucronifera* DC. And *Hieracium cappadocicum* Freyn from Turkish flora. *Food Chemistry*, 98, 9–13.

Tomao, F. Papa, A., Zaccarelli, E., Rossi, L. Caruso, D., Minozzi, M., et al. (2015). Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *OncoTargets and Therapy*, 8, 177-93.

Treasure, J. (2005). Herbal medicine and cancer: An introductory overview. *Seminars in Oncology Nursing*, 21, 177-183.

Trendafilova, A., Todorova, M., Bancheva, S. (2007). Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*. *Biochemistry and Systematic Ecology*, 35, 544-548.

Tröger, W., Zdrálek, Z., Stankovic, N. and Matijasevic, M. (2012). Five-year follow-up of patients with early stage breast cancer after a randomized study comparing additional treatment with *Viscum album* (L.) extract to chemotherapy alone. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 6, 173–180.

Tunçdemir M., Öztürk M. (2008). The effects of ace inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Molecular Histology*, 39, 605-616.

Tuzlacı, E. (2006). ‘Şifa Niyetine’ Türkiye’nin Bitkisel Halk İlaçları. *Alfa Yayınları*, İstanbul.

Uğur, A., Sarac, N., Ceylan, O., Duru, ME., Beyatli, Y. (2009). *In vitro* study of antibacterial activity on multi-resistant bacteria and chemical composition of the chloroform extract of endemic *Centaurea drabifolia* subsp. *cappadocia*. *Natural Product Communications*, 4, 1267-70.

Uğur, A., Sarac, N., Ceylan, O., Duru, M. (2010). Antimicrobial activity and chemical composition of endemic *Centaurea cariensis* subsp. *niveo-tomentosa*. *Natural Product Research*, 24, 861-72.

Unger-Saldana, K. (2014). Challenges to the early diagnosis and treatment of breast cancer in developing countries. *World Journal of Clinical Oncology*, 5, 465-77.

Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., Reichl, FX. (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental Materials*, 26, 51-58.

Wang, JY., Sun, S., Liu, L., and Yang, WS. (2014). Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells with active components of *Menispermum dauricum*. *Genetics and Molecular Research*, 13, 3545-3552.

Weissenstein, U., Kunz, M., Urech, K. and Baumgartner, S., et al. (2014). Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 6.

Wong, FC., Woo, CC., Hsu, A., Huat Tan, BK. (2013). The Anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. *Public Library of Science ONE*, 8, e78021.

Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30:87.

Wu, CT., Lai, JN., Tsai, YT. (2014). The prescription pattern of Chinese herbal products that contain Dang-Qui and risk of endometrial cancer among Tamoxifen-treated female breast cancer survivors in Taiwan: A population-based study. *Public Library of Science one*, 9:e113887.

Wu, KY., Wang HZ., Hong, SJ. (2008). Mechanism of mitomycin-induced apoptosis in cultured corneal endothelial cells. *Molecular Vision*, 14, 1705-1712.

Yaylı, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolaylı, S., Coşkunçelebi, K., Karaoğlu, S. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, 66, 1741-5.

Yeşilada, E., Gürbüz, I., Bedir, E., Tatlı, I., Khan, IA. (2004). Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 213-9.

Yoğunoğlu, A. (2011). Endemik değeri olan bitkiler raporu. *Fırat Kalkınma Ajansı*, Sektörel Araştırmalar Serisi, 5, Tunceli.

Zapesochnaya, GG., Eustratova, RI., Muhametzhonov, MN. (1977). Methoxy flavones from certain *Centaurea* species. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5, 706-707.

Zengin, G., Cakmak, YS., Guler, O., Aktümsek, A. (2010). *In vitro* antioxidant capacities and fatty acid compositions of three *Centaurea* species collected from Central Anatolia region of Turkey. *Food Chemical Toxicology*, 48, 2638-41.

Zhang, H., Qian, Y., Liu, Y., Li, G., Cui, P., Zhu, Y. (2012). *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 32, 621-626.

Zhivotovsky, B. (2003). Caspases: the enzymes of death. *Essays in Biochemistry*, 39, 25-40.

Zhou, J., Zhang, X., Ashoori, F., McConkey, DJ., Knowles, MA. (2009). Early RB94 produced cytotoxicity is independent of caspase activation and 50 kb DNA fragmentation. *Cancer Gene Therapy*, 16, 13-19.

Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological features of cell death. *Physiology*, 19, 124-128.

Zou, DM., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, JM., Wang, J., et al. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4, 25-6.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	N. Sera	Soyadı	KAYACAN
Doğ.Yeri	ŞİŞLİ	Doğ.Tar.	02.10.1990
Uyruğu	T.C.	Email	serakayacan@gmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2015
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Özel Evrim Lisesi	2007

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi		57

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,72757	68,74680	61,59246

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Windows 2001/XP	Çok iyi
Word – Excel - Powerpoint	Çok iyi
İnternet	Çok iyi