

ÖZET

ALCHEMILLA L. CİNSİNE AİT BAZI TÜRLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN MCF-7 KANSER VE L929 FİBROBLAST HÜCRELERİNE ETKİSİ

ARAT, Esra

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Haziran 2012,80 sayfa

Sunulan bu çalışmada, *Alchemilla* cinsine ait *A.barbatiflora* , *A.tiryalensis* , *A.orduensis* , *A.speciosa* türlerinin MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücre hatları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.Bitki ekstraktlarının toksisite değerleri belirlenmiş,toksisitenin görüldüğü dozlarda apoptotik ve nekrotik etkiler araştırılmıştır. Sonuçların güvenilirliği açısından da xCELLigence RTCA ile hücrelerin zamana bağlı olarak değişen proliferasyon grafikleri tespit edilmiştir. Öncelikle bitki ekstraktlarının MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitesi belirlenmiştir . Toksisiteyi belirlemek amacıyla WST-1 metodu kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre *A.barbatiflora*'nın L929 fibroblast hücreleri üzerinde en fazla toksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. MCF-7 kanser hücrelerinde en yüksek toksik etki ise *A.tiryalensis*'te gözlenmiştir. Sonuç olarak L929 fibroblast hücrelerinde ekstraktların daha fazla toksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Ekstraktların apoptotik-nekrotik indeksini belirlemek amacıyla ikili boyama metodu kullanılmıştır. İkili boyama sonuçlarına göre L929 fibroblast hücrelerinde *A.barbatiflora*, diğer türlere göre en fazla apoptotik etkiye sahip türdür. MCF7 hücrelerinde ise apoptotik indeksin en fazl olduğu tür *A.tiryalensis*'tir. Nekrotik indeksler incelendiğinde L929 fibroblast hücresi için nekrotik

indeksin en yüksek olduğu tür *A.barbatiflora* olarak belirlenmiştir. MCF7 hücrelerinde ise *A.speciosa*'nın nekrotik etkisi diğeri türleri göre fazladır. Son olarak MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücrelerine ekstraktlar uygulandıktan sonra zamana bağılı olarak hücre proliferasyonları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: MCF-7, L929 fibroblast, apoptoz, nekroz, toksisite

ABSTRACT

THE EFFECT OF SOME SPECIES OF THE EXTRACTS OBTAINED FROM
ALCHEMILLA L. ON MCF-7 CANCER AND L929 FIBROBLAST CELLS

ARAT, Esra

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Postgraduate Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Mustafa TÜRK

June 2012, 80 pages

In the present study, the effect of some species of *Alchemilla L.* genus, *A. barbatiflora*, *A. tiryalensis*, *A. orduensis*, *A. speciosa* on L929 fibroblast and MCF-7 cancer cell was investigated. The toxicity values of plant extracts were specified, the apoptotic and necrotic effects were investigated in accordance with the doses seen in toxicity.

In terms of the credibility of the results, the time-dependent varying proliferation graphics of the cells were ascertained with xCELLigence RTCA. First of all, the toxicity of plant extracts on MCF-7 cancer and L929 fibroblast cells were identified. In order to identify the toxicity, the WST-1 method was used. According to the data obtained, it was seen that, *A. barbatiflora* has the most toxic effect on L929 fibroblast cells. Whereas, *A. tiryalensis* had the highest toxic effect on MCF-7 cancer cells.

As a result, it was observed that, extracts have much more toxic effect on L929 fibroblast cells. The double staining method was used to verify the apoptotic – necrotic index of extracts. In regards to the double staining results, *A. barbatiflora* is the type which has the highest apoptotic effect on L929 fibroblast cells. Yet, *A. tiryalensis* is the type which has the highest apoptotic index on MCF-7 cancer cells. When necrotic indexes were

examined, *A.barbatiflora* was identified as the type having the highest necrotic index for L929 fibroblast cell. But, *A.speciosa*'s necrotic effect on MCF-7 cells is more, when compared with the other types. Lastly, after the extracts were applied on MCF-7 cancer and L929 fibroblast cells, time-dependent cell proliferations were determined.

Key Words: MCF-7 cancer, L929 fibroblast, apoptosis, necrosis, toxicity

AILEME

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimde danışmanım olan, çalışmaya başladığım günden itibaren her zaman bana yol gösteren, deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, çoğu zaman hatalarımı görmezden gelen, bana sunduğu araştırma olanaklarının yanında hem bilimsel hem maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman kendime örnek aldığım çok kıymetli hocam , Sayın Doç.Dr.Mustafa TÜRK'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Tezimde yer alan bitki ekstraktlarının kullanılması için bana olanak sağlayan Sayın Prof.Dr.Yusuf MENEMEN'e ,

Bitki ekstraktlarının hazırlanmasında yardımcı olan Sayın Yrd.Doç.Dr.Bülent KAYA'a,

Bilimsel yönden kendimi geliştirmem için her zaman desteğini gördüğüm Sayın Doç.Dr.Siyami KARAHAN'a,

Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı müdürü Sayın Prof.Dr.Sedat AĞAN'a ve müdür yardımcısı Sayın Doç.Dr.Muhammet IŞIKLAN'a, KÜBTAL çalışma arkadaşlarıma ve özellikle Elif'e,

Hücre kaynaklarından faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Nanotıp ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı ve GATA Kanser Araştırma Merkezi'ne,

Her zaman başarılı olacağıma dair inançlarıyla bana güven veren çok kıymetli dostlarım Didem, Süheyla ve Melike'ye,

Verdiği öğütlerle benim için bazen abi, bazen arkadaş, bazen bir yol gösterici olan sayın Yrd.Doç.Dr. Murat LÜY'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum

Esra ARAT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1.Kanser	4
1.2.Kanser Tedavisi	8
1.2.1.Radyoterapi.....	8
1.2.1.1.Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar	8
1.2.2.İmmünoterapi.....	9
1.2.2.1.İmmünoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar	9
1.2.3.Kemoterapi.....	10
1.2.3.1.Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar	11
1.3.Meme Kanseri	12
1.3.1.Meme Kanseri Risk Faktörleri	13
1.3.1.1.Yaş	13
1.3.1.2.Cografik Varyasyon.....	13
1.3.1.3.Menapoz Yaşı	14
1.3.1.4.İlk Gebelik Yaşı.....	14
1.3.1.5.Aile Hikayesi	14
1.3.1.6.Önceki Benjin Meme Lezyonları.....	15
1.3.1.7.Radyasyon	15
1.3.1.8.Diyet	15
1.3.1.9.Kilo.....	16

1.3.1.10. Alkol Kullanımı.....	16
1.3.1.11. Sigara.....	16
1.3.2. Meme Kanseri Genetiği	16
1.3.3. Meme Kanseri ve Apoptoz.....	17
1.3.3.1. Meme Kanserinde Apoptoz.....	17
1.3.3.2. Apoptoz ve Moleküler Mekanizması.....	18
1.4. <i>Alchemilla L.</i> Cinsi	19
1.4.1. Flavonoidler	22
1.4.1.1. Flavonoidlerin Antikanserojen Özellikleri	26
1.4.1.2. Flavonoidler ve Çoklu İlaç Direnci	26
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	30
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar	30
2.2.1. Besiyeri Hazırlanması	30
2.2.2. Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	31
2.3. Ekstraksiyon.....	31
2.3.1. Ekstraksiyon Solüsyonlarının Hazırlanması.....	33
2.4. Hücre Kültürü	33
2.4.1. -80°C Derin Dondurucudan Alınan Hücrelerin Kültürünün Yapılması ve Tripsinizasyonu	33
2.4.2. Hücre Sayımı	34
2.4.3. MCF-7 ve Fibroblast Hücrelerinin İn vitro Kültürünün Hazırlanması	34
2.4.4. Bitki Ekstraktlarının MCF-7 ve Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Toksisitenin Belirlenmesi	35
2.4.5. Bitki Ekstraktlarının MCF-7 ve Fibroblast Hücrelerinde İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	35

2.4.6. xCELLigence RTCA ile Bitki Ekstraktlarının MCF-7 ve Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun Belirlenmesi	36
3.ARAŞTIRMA BULGULARI	38
3.1. MCF-7 ve L929 Fibroblast Hücrelerinin İn vitro Kültürlerinin Hazırlanması	38
3.2. WST-1 ile Toksisitenin Belirlenmesi	39
3.2.1. L929 Hücrelerindeki Toksisitenin Belirlenmesi	39
3.2.2. MCF-7 Hücrelerindeki Toksisitenin Belirlenmesi	43
3.3. İkili Boyama İle Belirlenen Apoptotik Nekrotik İndeks Sonuçları	45
3.3.1. Apoptotik İndeks Sonuçları	45
3.3.2. Nekrotik İndeks Sonuçları	51
3.4. xCELLigence RTCA ile Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	56
3.4.1. Bitki Ekstraktlarının L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonunun Belirlenmesi	56
3.4.2. Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonunun Belirlenmesi	61
4.TARTIŞMA ve SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Karsinogeneziste Apoptozis ile İlgili Olabilecek Genler/Proteinler	7
1.2.Flavon Bileşiği	23
1.3.Farklı Flavonoid Türleri	24
3.1.L929 Fibroblast Hücresi	38
3.2.MCF-7 Kanser Hücresi	39
3.3.İkili Boyama ile Boyanmış Apoptotik L929 Fibroblast Hücreleri	46
3.3.A. 200 µg/ml <i>A.barbatiflora</i> 'nın Uygulandığı L929 Fibroblast Hücresi	47
3.3.B. 100µg/ml <i>A.barbatiflora</i> 'nın Uygulandığı L929 Fibroblast Hücresi	47
3.3.C. L929 Fibroblast Hücresi Kontrol Grubu	48
3.4. İkili Boyama İle Boyanmış Apoptotik MCF7 Hücreleri	49
3.4.A. 200 µg/ml <i>Alchemilla tiryalensis</i> 'in uygulandığı MCF7 hücreleri	50
3.4.B. 100 µg/ml <i>Alchemilla barbatiflora</i> 'nın uygulandığı MCF7 hücreleri	50
3.4.C. MCF-7 Hücresi Kontrol Grubu	50
3.5. İkili Boyama İle Boyanmış Nekrotik L929 Hücreleri	52
3.5.A. 200µg/ml <i>Alchemilla barbatiflora</i> uygulanan L929 fibroblast hücreleri	52
3.5.B. 100 µg/ml <i>Alchemilla orduensis</i> uygulanan L929 fibroblast hücreleri	53
3.5.C. L929 Fibroblast Hücresi Kontrol Grubu	53
3.6. İkili Boyama İle Boyanmış Nekrotik MCF7 Hücreleri	55
3.6.A. 200µg/ml <i>Alchemilla speciosa</i> 'nın uygulandığı MCF7 hücreleri	55
3.6.B. 100 µg/ml <i>Alchemilla tiryalensis</i> 'in uygulandığı MCF7 hücreleri	55
3.6.C. MCF-7 Hücresi Kontrol Grubu	56
3.7. <i>A.barbatiflora</i> 'nın L929 Fibroblast Hücrelerindeki Proliferasyonu	57
3.8. <i>A.tiryalensis</i> 'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Proliferasyonu	58
3.9. <i>A.orduensis</i> 'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Proliferasyonu	59
3.10. <i>A.speciosa</i> ' in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Proliferasyonu	60
3.11. <i>A.barbatiflora</i> 'ın MCF-7 Hücrelerindeki Proliferasyonu	61
3.12. <i>A.tiryalensis</i> 'in MCF-7 Hücrelerindeki Proliferasyonu	62
3.13. <i>A.orduensis</i> 'in MCF-7 Hücrelerindeki Proliferasyonu	63
3.11. <i>A.speciosa</i> 'ın MCF-7 Hücrelerindeki Proliferasyonu	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. <i>A.barbatiflora</i> 'nın L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	40
3.2. <i>A.tiryalensis</i> 'in L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	41
3.3. <i>A.orduensis</i> 'in L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	41
3.4. <i>A.speciosa</i> 'ın L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	42
3.5. <i>A.barbatiflora</i> 'ın MCF7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	43
3.6. <i>A.tiryalensis</i> 'in MCF7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	43
3.7. <i>A.orduensis</i> 'in MCF7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	44
3.8 <i>A.speciosa</i> 'ın MCF7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi	45
3.9. L929 Fibroblast Hüresine Ait Apoptotik İndeks Sonuçları	46
3.10.MCF-7 Hüresine Ait Apoptotik İndeks Sonuçları	48
3.11.L929 Fibroblast Hüresine Ait Nekrotik İndeks Sonuçları	51
3.12.MCF-7 Hüresine Ait Nekrotik İndeks Sonuçları	54

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
ml	Mililitre
%	Yüzde
°C	Santigrat
CO ₂	Karbondiyoksit
µl	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MDRP1	Çoklu İlaç Direnç Proteini
ATP	Adenozintrifosfat
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12
FBS	Fetal Bovin Serum
PBS	Fosfat Buffer Saline

1.GİRİŞ

Son zamanlarda kanser tedavisinde alternatif yöntemler geliştirilmekle birlikte genel olarak radyoterapi, kemoterapi, gen terapi ve immün terapi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde en bilindik kanser tedavi yöntemi ise kemoterapidir [1].

Kanser terapi, kimyasal ajanlar kullanılarak kanser hücrelerinin öldürülmesini amaçlayan bir yöntemdir. Kimyasal ajanlar, kanserli hücrede DNA sentezini durdurarak, DNA tamirini engelleyerek, hücre bölünmesini engelleyerek, hücre bölünmesini bloke ederek ve enzimleri inhibe ederek etkisini göstermektedir. Genellikle kullanılan ajanlar, alkilleyici ajanlar, anti metabolitler, antitümör antibiyotikler, bitki alkaloidleri, steroid hormonlar, antisense oligonükleotidler ve metal taşıyan ilaçlardır. Antikanser ilaçları ağızdan, damar içine, kas içine intraperitoneal, intrapleural, intrathecal, topical olarak hastaya verilmektedir. Fakat bu yöntemler hastalarda kan hücrelerinin tehlikeli boyutta azalmasına, alerjik reaksiyonlara, saç dökülmesi vb. yan etkilere neden olmaktadır [2].

Eski tarihlerden beri özellikle Alchemilla cinsine ait türler yara yanık tedavisi, yaşlanmayı geciktirici, doğum sonrası vücudun kuvvetlenmesi vb. gibi amaçlarla halk arasında kullanılmaktadır. Bu bitkilerin içeriğine bakıldığında ise, ihtiva ettiği bileşiklerin bilimsel amaçlı kullanıldığı görülmektedir. Özellikle flavonoid içerikleri birçok bilimsel çalışmada araştırılmıştır. Bunlardan kanser ile ilgili araştırmalar dikkat çekicidir. Kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direnci (MDR, Multi Drug Resistance) kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. MDR, tek bir sitotoksik ajana maruz kalan kanser hücrelerinde, çapraz reaksiyon sonucu, birçok kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasıdır [2].

MDR, ATP- bağlanma kaseti (ABC) protein ailesine ait membran proteinlerince düzenlenmektedir. Bu ailenin bilinen ve en çok çalışılan proteinleri, MDR1 genince kodlanan MDR1(P-glikoprotein) ve MRP1 (multidrug resistance-

associated protein 1) genince kodlanan MRP1 proteinleridir. Bu proteinlerin dışında MRP2, MRP3 ve BCRP/MXR1 proteinleri de MDR oluşumunda rol alan proteinlerdir. MDR proteinleri, ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjii kullanarak kemoterapötik ilaçların hücre dışına taşınmasını sağlayan ATPaz'lardır [3].

Bitkisel bileşiklerden en önemlileri flavonoidler olup antikanserojen özellik taşımaktadırlar. Flavonoidlerin hücre içi fizyolojik rolleri yanında, çoklu ilaç direnci proteinlerinden MRP(Multi Drug Resistant Protein), BCRP(breast cancer resistant protein), P-gp ATPaz aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidlerin, MDR üzerindeki, inhibitör etkilerini tiplerine göre 4 sınıfta toplayabiliriz: a) MDR1, MRP1, veya MRP2 genlerinin ekspresyonunun inhibe edilmesi, b) flavonoidlerin taşıyıcı MDR proteinlerin NBD [4], TMD veya steroid bağlanma bölgelerine bağlanması [5] , c) proteinlerin ATP-az aktivitelerinin inhibe edilmesi ve d) MDR1'den bağımsız mekanizmalardır. Flavonoidler ayrıca plazma membran ATPaz, siklik AMP bağımlı protein kinaz ve protein kinaz C gibi birçok ATP bağlanma proteinlerini inhibe etmektedir[6]. Flavonoidlerin düzlemsel yapıları onların P-gp ile ilişkilerini belirlemektedir. Flavonoidler P-gp'nin ATP bağlanma bölgesine ve hidrofobik steroid bağlanma bölgesine bağlanmaktadır. Flavonoidlerin ,proteinlerin ATP bağlanma bölgesine bağlanırken nasıl bir oryantasyon yaptıkları tam olarak anlaşılamamıştır [7].

Kitagawa ve arkadaşlarının (2006), KB-32 MDR insan karsinoma hücrelerinde, P-gp substratı olarak Rhodamine 123 kullandığı çalışmada, yeşil çayda bulunan epigallocatechin gallate(EGCG)'nin, hücre içerisinde Rhodamine 123 birikimini 3.7 kat artırdığı, genisteinin çok az etki gösterdiği ve quercetin'in herhangi bir etkisinin genisteinden ve P-gp inhibitörü verapamilden daha fazla olduğu belirtilmektedir[8]. Critchfield ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, quercetin, kaempferol, galanginin HCT-15 kolon kanseri hücre serisinde, adriyamycin atılımını artırdığı bildirilmektedir[9]. Critchfield J.W ve ark (1994). Ancak başka bir çalışmada, quercetin kökenli hidrofobik bir maddenin MCF-7 meme kanseri serisinde, Rhodamine 123 atılımını ve hücrelerin MDR fenotipini ortadan kaldırdığı saptanmıştır[10]. Yine değişik çalışmalarda,

flavonollerin P-gp aşırı eksprese eden hepatositlerde ilaç atılımını inhibe ettiği bildirilirken, genistein BC19/3 (MDR1 transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri) hücrelerinde yüksek konsantrasyonda daunorubicin ve rhodamine 123 atılımını inhibe ettiği saptanmıştır [11,12].

Bu çalışmalar, flavonoidlerin MDR üzerindeki etkilerinin flavonoidlerin kimyasal yapılarına bağlı olduğunu göstermektedir. Kimyasal yapıları incelendiğinde, flavononların ve flavanolların C halkasında 2. Ve 3. Pozisyonda çift halkaya sahiptirler. Bu çift halkalar flavoneller ve flavonollar için önemlidir. Bu moleküller daha düzlemsel yapıya sahip oldukları için P-gp'nin hidrofobik aminoasitleriyle daha kolay etkileşime girebilirler. Bu bağın, flavonoidlerin MRP1 ve MRP2 ile olan etkileşimi için de önemli olabileceği önerilmiştir [5].

Flavonoidlerin hidrofobik özellikleri, onların inhibitör etkilerini belirleyen bir diğer önemli noktadır. Flavonoidlerin P-gp'nin NBD2 parçasına bağlanmasında ve proteinin direnç aktivitesinin inhibisyonunda hidrofobik özellik kritik bir parametredir. Hidrofobik etki, flavonoidlerin taşıdığı OH gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Polifenollerin hidrofobik kısımlarının P-gp'lerle etkileşiminde önemli olabileceği bildirilmiştir[8]. Ancak hidrofobik özellik tek başına P-gp ile olan ilişkiyi belirlemede yeterli değildir. Flavonoidlerin MDR üzerindeki etkilerinin birbirlerinden farklı ve çok boyutlu olduğu anlaşılmaktadır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı, hidrofobisiteleri, düzlemsel yapıları ve P-gp üzerindeki bağlanma bölgelerinin farklılığı onların MDR üzerine olan etkilerinde temel rol oynayan özelliklerdir[5,8]. Flavonoidlerin biyoyararlılığı sınırlıdır ve bu yüzden plazma konsantrasyonları çok düşüktür. MDR üzerinde flavonoidlerin sinerjistik etkilerinin değerlendirilmesi daha anlamlı olabilir [8].

Bu çalışmada ilk kez, endemik bitkilerden *Alchemilla L.* cinsine ait *A. Speciosa*, *A. Barbatiflora*, *A. Orduensis*, *A. Tiryalensis* türlerine ait ekstraktların ilaç dirençli olan (MDR pozitif) MCF-7 kanser ve fibroblast normal hücre hatlarındaki etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda öncelikle iki farklı metod ile ekstraktların toksik etkileri belirlenmiştir. Toksisitenin görüldüğü dozlarda, floresan boyalar kullanılarak MCF-7 hücrelerine apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

1.1. Kanser

Kanser, yaşanan çevrede karşılaşılan ve/veya hücrede ortaya çıkan, fiziksel kimyasal ya da biyolojik etkenlere maruz kalınması nedeniyle normal hücre DNA'sının değişime uğraması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır[13]. Tüm kanser hücreleri iki ortak özellik paylaşırlar. Bunlardan birincisi anormal hücre büyümesi ve bölünmesi, ikincisi ise hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılmasını ve istilasını (metastaz) engelleyen normal sınırlamalardaki anormalliklerdir. Bu işlevler normal hücrelerde uygun bir şekilde, zamanında ve yerinde ifade edilen genler tarafından denetlenmektedir. Fakat kanserli hücrelerde bu genler ya mutasyona uğrar ya da uygun olmayan şekillerde ifade edilirler. Hücreler yaşamları boyunca dışarıdan gelen çeşitli ajanlara maruz kalmaktadır. Bu ajanlar fiziksel (UV ve iyonize radyasyon), kimyasal (asbestos, anilin ve alkol) ve biyolojik (virüsler, mantar ve mantar zehiri) kanserojenlerdir. Hücrelerin bu ajanlara maruz kalmaları onların DNA'sında bir dizi değişikliğe yol açar. Bu değişiklikler mutasyon olarak tanımlanan tek bir baz çifti yer değişiminden, bir delesyondan ya da bir veya daha fazla baz çiftinin insersiyonundan meydana gelebildiği gibi kromozomun yapısında önemli bir değişikliğide içerebilir [14].

Kanser hücrelerini tehlikeli yapan, denetlenemeyen hücre çoğalması ve metastatik yayılmanın kombinasyonudur. Bir hücre, hücre büyümesi üzerindeki genetik kontrolünü kaybederse, çok hücreli bir yığın, iyi huylu bir tümör (benign tümör) olabilir. Bu tip bir tümör ameliyatla alınabilir ve genellikle ciddi bir hasara yol açmaz. Buna rağmen, eğer tümördeki hücreler bu yapıdan kurtulabilme, kan dolaşımına girebilme, diğer dokuları istila edebilme ve ikincil tümörler oluşturabilme yetisini ele geçirmişlerse, o zaman malign (kötü huylu, tehlikeli tümör) olurlar. Malign tümörlerin tedavileri zordur ve tehlike oluşturabilirler. Hücreler komşu dokuları istila edip yok ettikleri gibi lenfatik veya dolaşım yoluyla vücudun diğer kısımlarına metastaz yaparlar [14]. Kanser hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek için anjiyogenez ile kendi

beslenmelerini sağlarlar [15]. Hücrelerdeki mutasyonlar, onkogenlerin aşırı ifade edilmesi ve hücre döngüsü düzenleyicileri tümör gelişiminde önemli rol oynayan faktörlerdendir [16]. Hücresel döngü, sırasıyla G0, G1, S, G2, M fazlarından oluşmaktadır. Bununla birlikte, hücre döngüsünde bir sonraki aşamaya geçilmeden önce hücrenin kendi iç dengesini izlediği ve kontrol ettiği en az üç farklı kontrol noktası (G1/S, G2/M ve M) vardır. Bunlardan en önemlisi G1 fazından S fazına geçişi sağlayan G1/S kontrol noktasıdır. Bu kontrol noktasında hücre kendi boyutunu izler ve DNA' sının hasar görüp görmediğine karar verir. Eğer hücre uygun boyuta ulaşmayı başaramamış ya da DNA' sı hasar görmüş ise, hücre döngüsündeki ileri aşamalar bu koşullar doğrulana kadar durdurulur. Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü doğru ise hücre bu kontrol noktasını geçer ve S safhasına ilerler [14]. Döngüde rolü olan pek çok onkogen ve tümör baskılayan gen, G1 kontrol noktasındaki hatalarla ilişkilidir [17]. Çünkü hücre DNA'yı sentezlemeden önce DNA'nın bütünlüğü sağlanmalıdır. Bu sağlanmadan S fazına geçerse kontrolsüz hücre büyümesi ortaya çıkar. Mesela iyonizan radyasyon G1'den S fazına veya G2'den M fazına geçişi durdurmaktadır [18].

Karsinogenez çok faktörlü ve çok basamaklı bir olay olup, normal bir hücrenin kanser hücreğine dönüşmesi için çok sayıda genetik değişikliklerin olması gereklidir. Bunlar arasında; nokta mutasyonları, translokasyonlar, gen amplifikasyonları, hücresel onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin (antionkogen) inaktivasyonu gibi mekanizmalar yer alır.

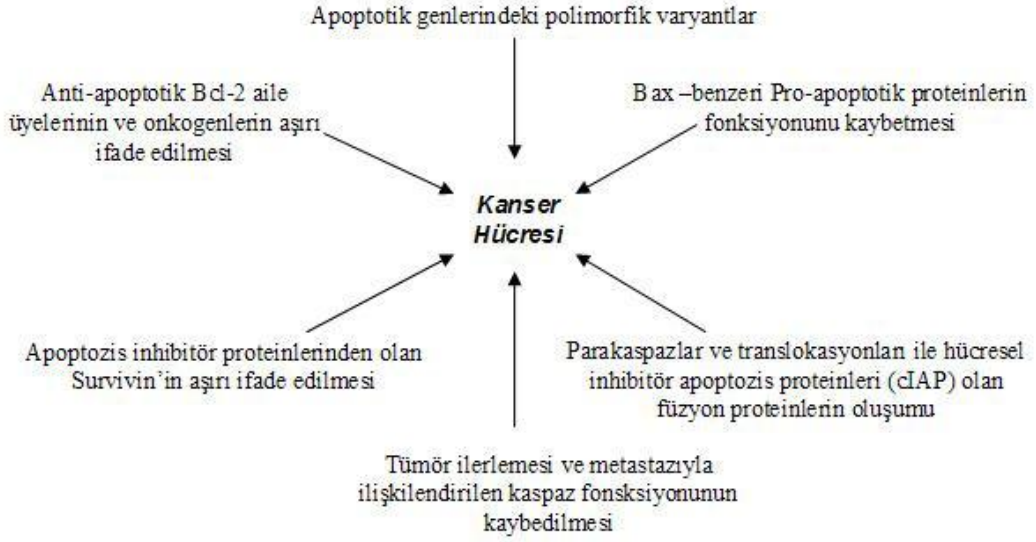
Hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden normal hücresel genler mevcuttur. Bunlardaki regülasyon bozukluğu ya da değişimler onkogenlere dönüşmelerine neden olmakta ve kanser gelişimiyle sonuçlanmaktadır.

Onkogenler regülatör elementlerden yoksundurlar. Onkogenlerin kodladığı proteinler onkoprotein adını alırlar. Büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal iletim proteinleri, nükleer regülatör faktörleri, hücre döngüsü proteinleri onkoproteinlerdir. Rb (retinoblastoma) geni ve P53 geni gibi antionkogenlerin (tümör süpresör genler) kodladığı proteinlerin normal fonksiyonu, hücre döngüsünün ilerlemesini ve hücre bölünmesini inhibe etmektedir. Bunlardaki mutasyonlar resesif özellik göstermektedir [19].

Onkogenler, protoonkogen denen normal hücresel genlerden gelişir. Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre sinyalizasyonu ve hücre büyümesinin regülasyonunda önemli rol oynar. Bu genler mutasyon, kromozomal translokasyon, amplifikasyon veya transkripsiyonel disregülasyon ile aktive olarak anormal protein sentezine veya aşırı protein yapımına neden olur. Aktive olan protoonkogenlere onkogen, protein ürünlerine ise onkoprotein denir. Protoonkogenler, hücre içi sinyal iletilicileri, nükleer transkripsiyon faktörleri, hücre siklusunu kontrol eden proteinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörleri olmak üzere beş kategoriye ayrılır [20].

Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık ras onkogen ailesinde görülür. Bir başka mekanizma da, genin ekspresyonunu regüle eden bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir. Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatuar bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artar. Myc ailesi buna bir örnek oluşturur [21].

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak biraraya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler , tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır[22].(Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Karsinogenezis’de apoptozis ile ilgili olabilecek genler/proteinler [23]

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır[24]. Sinyal iletiminde meydana gelen mutasyonlar hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin % 20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır [25]. Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır.

Sinyal iletiminde yer alan moleküllerin ve sinyal yollarının karsinogenezdeki rollerinin ortaya konması ve bu yollara özgül inhibitör ajanlar ile yapılan klinik çalışmalar, kanser tedavisinde yeni ufukların açılmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımların ortak hedefi, en etkin kanser tedavisine ulaşmaktır[26].

1.2. Kanser Tedavisi

Kanser hastalıkları, insanların yaşam standardını olağanüstü etkileyen ve hatta onların ölümüne yol açabilen en önemli rahatsızlıklardan biri olarak önemini korumaktadır. Kanseri tedavisinde çok farklı yöntemler kullanılmakla birlikte kesin bir sonuç elde edilememiştir. Tedavide kullanılan bazı yöntemler aşağıda verilmiştir [27].

1.2.1. Radyoterapi

Radyoterapi, radyoaktif ışınlarla tedavi demek olup sadece uygulanan bölgeyi etkiler. Radyasyon, cerrahi müdahaleden önce kanserli bir tümörün küçültülmesi için, cerrahi müdahaleden sonra geriye kalan kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması veya anti-kanser ilaçları ile ölümcül bir durumda olan bir tümörün ortadan kaldırılması için kullanılabilir. Radyasyon özellikle lenf düğümleri veya ses tellerindeki habis tümörler gibi belli lokalize kanser çeşitlerinin tedavisinde etkilidir. Radyasyon tedavisi, Co-60 ya da Lineer Hızlandırıcı gibi cihazlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Radyoterapide kanser hücrelerinin bölünmesini engellemek amacıyla yüksek enerjili x ışınları kullanılır. Absorbe edilen radyasyonun birimi ' rad ' olarak bilinmektedir (1 rad: 1 kg maddenin 0,001 J enerji soğurmasıdır). Radyoterapi gören hasta tedavi süresince birkaç yüz rad' lık radyasyona maruz kalır. Radyoterapi esnasında, uygulanan bölgeye x ışınları ile belirli oranda bir enerji verilmektedir. Hedef; hücrelerin genetik materyalinin moleküler yapısını bozarak, bölünmelerini engellemektir. Radyoterapi cilt, beyin, meme, prostat ve rahim kanseri tedavilerinde etkin olarak kullanılmaktadır [28].

1.2.1.1. Radyoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar

Radyoterapinin amacı kanserli hücreleri yok etmektir, ama bu arada tedavi alanı içinde kalan sağlıklı hücreler de etkilenecektir. Radyoterapi bazen kan yapıcı sistemin ürettiği hücreleri etkileyebilir. Erişkin bir insanda kan hücrelerinin yapımı özellikle kemik iliği dokusunda gerçekleşir. Dolayısıyla

radoterapi alanı dahilindeki kemik dokusu hacmi arttıkça (omurga, kalça kemiği gibi) kanla ilgili yan etki riski de artar. Radyasyon tedavisinin uygulandığı her bölgede cilde ait birtakım yan etkiler gelişebilir. Bu yan etki riski, uygulanması planlanan toplam doz yükseldikçe artar. Yani daha çok 5 – 6 hafta süren uzun süreli tedavilerde ve tedavinin ileri dönemlerinde görülür. Koltuk altı, boyun gibi cilt dokusunun ince olduğu bölgelerde, anüs bölgesi, ağız içi gibi mukoza dokularında bu tip yan etki riski daha fazladır. Cilde ait yan etkiler, üzerine basmakla solan hafif kızarıklıklarla başlar (güneş yanığı gibi) ve sulu, açık yaralara kadar gidebilir. Bunların yanısıra bulantı, kusma, akciğer yetmezliği gibi sorunlarada yol açabilir [28].

1.2.2. İmmünoterapi

Vücuttaki immün sistem, yabancı madde olarak adlandırılan maddelere karşı denetleyici bir sistem olarak hareket eder. Kanser hücreleri de yabancı olarak kabul edilirler. Yıllardan bu yana araştırmacılar kanser hücrelerine karşı doğal immün reaksiyonu artırmaya çalışmaktadırlar. Böylesi bir metod bir tedavi metodu olarak kullanıldığında, bu tekniğe immünoterapi denir. Beyaz kan hücreleri (lökosit) tarafından normal olarak üretilen ve lenfokinler olarak bilinen biyolojik aktif maddelerin kullanımı immünoterapiye dahildir. En iyi kanıtlanmış olan immünoterapi aktif maddesi, viral bir enfeksiyona cevap olarak vücut tarafından üretilen interferonlardır [28]. Araştırmacılar son zamanlarda interferon alfa denilen bir interferon çeşidi ile birkaç çeşit kanserin kontrol altına alınmasında başarı elde etmişlerdir [29]. Özellikle saçaklı hücreli lösemi denilen kanserlerde önemli gelişmeler elde edilmiştir.

1.2.2.1. İmmünoterapi Karşılaşılan Olumsuzluklar

İmmünoterapi sonrası enjeksiyon yerinde meydana gelen bir takım kızarıklık ve şişmeler gibi lokal tepkiler gözlemlenmiştir. Daha az görülmekle birlikte, hırıltılı solunum, burun ve boğazda kaşıntı, burun tıkanıklığı ve/veya burun akıntısı, koroner damar yetersizliği, öksürük, deride kızarıklık ve kaşıntı, soluk

darlığı, göğüste sıkışma duygusu, dudaklarda ve göz kapaklarında şişme ve yutkunma zorluğu gibi yan etkiler de bildirilmiştir [30].

1.2.3. Kemoterapi

Kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapinin ana ilkesi; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya yok etmektir. Kemoterapide asıl amaç; hastayı tedavi etmek, yaşam süresini ve hastalıksız dönemi uzatmak, semptomları engellemek veya kontrol altına almak ve böylece yaşam kalitesini yükseltmektir [31]. Kemoterapide kullanılan ilaçlara “Antineoplastikler”, “Sitotoksik ajanlar” veya “Antikanser ilaçlar” olarak adlandırılmaktadır [32]. Kanserin türüne göre kemoterapinin amaçlarını şöyle sıralayabiliriz [33].

a) Kanseri tedavi etmek; kanser hücrelerine ait izler tümüyle ortadan kalktığında kanser tedavi edilmiş sayılır.

b) Kanseri kontrol etmek; kanser hücreleri, tümörden ayrılarak kan dolaşımı veya lenf damarları yoluyla vücudun başka bölgelerine gidebilirler. Ulaştıkları bölgeye yerleşerek yeni tümörler oluşturabilirler. Genel olarak kanserin yayılımını önlemek ve büyümesini yavaşlatmak, kanserin kontrol altında tutulması olarak kabul edilir.

c) Kanserin yol açtığı belirtileri gidermek; bazı kemoterapi uygulamalarının temel amacı hastanın yaşam niteliğini yükseltebilmek için ağrı ve benzeri belirtileri ortadan kaldırmak ya da hafifletmektir[34,35].

Kanser tedavi yöntemleri arasında olan radyoterapi, hastalığın lokalize olduğu durumlarda etkili olurken, kemoterapinin en büyük avantajı, metastaz varlığında ya da hastalığın yaygın olduğu durumlarda uygulanabilir olmasıdır. İlk sitostatik ilaç olan nitrojen mustard, I. Dünya Savaşı sırasında kemik iliğinin baskılayıcı tepkisinin fark edilmesiyle ortaya çıkmıştır. O zamandan bu yana kansere karşı etkili olan ilaçların arayışı sürmüştür ve kemoterapinin amacı, hastalığın bulgularını hafifletmekten iyileştirmeye doğru bir ilerleme göstermiştir [34,35].

Kemoterapi ilaçlarının çoğu hücre gelişim hızını düşürmektedir. Bunu DNA ile etkileşerek (normal hücrelere oranla kanser hücrelerinin onarmakta etkisiz olduğu hasarlara yol açarak) veya hücre bölünmesine müdahale ederek yaparlar, bu da hücrenin daha fazla bölünmesini engellemekte ve genellikle apoptotik oluşuma yol açabilmektedir [28]. Ancak bazı durumlarda kanser hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirebilmektedir. Geliştirilen bu direnç hücre membranında bulunan P-glikoproteini'nin çok sayıda ekspres edilmesi ile oluşmaktadır. Bu protein bir pompa görevi yapmakta ve hücre içerisindeki kemoterapötik ajanları hücre dışına atmaktadır. Çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance-MDR) olan hücrelerde MDR gen amplifikasyonu olup, RNA'larında yüksek oranda P-glikoprotein yapıldığı düşünülmektedir.

1.2.3.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar

Kemoterapi yaygın kullanıma rağmen kemoterapi ile uygulanan ajanların tedavi edilmesi istenilen bölgeye ulaşmaları ve tolere edilebilmeleri oldukça zordur. Bu yüzden değişik yan etkilere ve ilaç direnci gelişimine sebep olmaktadır. Bu yan etkilerin derecesi ve görülme sıklığı, uygulanan kemoterapi cinsine, dozlarına, uygulama şekline, tedavi süresine, tedavi aralıklarına ve hastanın kişisel özelliklerine bağlı olarak değişiklikler gösterir. Kemoterapinin bireyde görülen yan etkileri, ilaçların özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte; bulantı, kusma, iştahsızlık, tat ve koku değişiklikleri, mukozit, diyare, konstipasyon, yorgunluk, halsizlik kanserli hastalarda en sık görülen semptomlar arasında yer almaktadır [31, 35].

Bulantı ve kusma; kemoterapinin önemli bir yan etkisidir. Bu durum bazı hastaların kemoterapiyi reddetmesine veya başlanmış olan tedavinin yarım kalmasına yol açar. İştahsızlık; pek çok nedeni olmakla birlikte; nörolojik disfonksiyon, tümörün gastrointestinal sisteme etkisi, tat ve koku duyularında bozulma, kronik bulantı ve kusma, psikolojik etmenler, artmış glikoneogenez, tümörün ürettiği sitokinler sonucunda gelişebilir. Tat ve koku değişiklikleri; uygulanan tedaviye bağlı olarak kanser hastalarında tat alma duyusunda kayıp

(ageusia), artış (hypergeusia) ve azalma (hypogeusia) olabilir. Kemoterapi sırasındaki tat değişikliklerinin nedenleri arasında; ilaçların tükürüğe geçmesine bağlı koku ve tat değişiklikleri, çürük diş, kötü ağız hijyeni, enfeksiyonlar, geniz akıntısı, reflü sayılabilir [36].

Mukozit; oral mukozanın ülserasyonu ve enflamasyonu ile karakterize, kanser tedavilerine bağlı gelişen, hayatı tehdit eden enfeksiyonların kaynağı olabilen önemli bir yan etkidir [37].

Diyare; kemoterapi, anksiyete, stres gibi nedenlerle gastrointestinal sistemin aktif olarak bölünen epitelyal hücrelerinin hasarı sonucu oluşabilir. Diyare antineoplastik ilaç dozunda azalma ilaç uygulamasının geciktirilmesi ya da ara verilmesi gibi istenmeyen etkilere yol açabilir. İlaç ve radyasyon dozunun azaltılması ya da geciktirilmesi geçici olarak diyareyi düzeltebilir. Ancak bu durumda antineoplastik ilaca karşı duyarlılık azalır ve ilacın tedavi edici etki düzeyi sınırlandırıldığı için tümöre karşı cevabı negatif olarak etkiler. Konstipasyon; kemoterapinin nörotoksik etkisi, narkotik ajanların kullanımı, hareketsizlik, yeme alışkanlığında değişiklikler, dehidratasyon, hipokalsemi nedenleri ile gelişebilir. Ciddi ağrı, bulantı ve kusmaya neden olabilen konstipasyon hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir [38].

Yorgunluk; kanserli hastalarda sık görülen sorunlardan birisidir. Kemoterapinin yan etkisi olarak ortaya çıkan bulantı, kusma, diyare, ağrı, immobilité, anemi ve malnütrisyon gibi faktörlerle ilişkili olarak ortaya çıkar.

Halsizlik; kanser hastalarının en yaygın semptomlarından birisi olmasına rağmen sıklıkla göz ardı edilir. Kanserde halsizlik, normal insanlarda görülen halsizlikten farklıdır. Normalde halsizlik aktiviteyle ilişkilidir ve dinlenmekle geçer, oysa kanserde görülen halsizlik şiddetli, aktiviteden bağımsız ve dinlenmekle düzelmeyen karakterdedir [39].

1.3.Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup her yıl bir milyon yeni meme kanseri tanısı konulmaktadır [40]. Avrupa'da yılda

180.000, Amerika Birlesik Devletleri'nde (ABD) yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri görölme sıklığı ve mortalitesi cografi bölgeye, kültüre, ırka, etnik kökene ve sosyo-ekonomik duruma göre degisiklik göstermektedir. Hawaii, Kaliforniya, Kanada yılda yüzbinde 80–90 görölme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı deger Japonya'da sadece yüzbinde 12–15 arasındadır. Bindokuzyüzyetmisten bu yana Japonya, Singapur ve Çin'de ekonomideki batı tarzı gelisim ve dogurganlığın batıya benzemesi nedeniyle meme kanseri görölme oranındaki fark giderek azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde ise görölme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinde doguya dogru gittikçe azalmaktadır. Görölme sıklığındaki en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te ortaya çıkmıştır [40]. Ülkemizde kansere yönelik saglıklı kayıt ve bildirim sisteminin olmaması nedeniyle, meme kanserine ait ulusal veriler yeterli olmamakla birlikte; Sağlık Bakanlığı'nın 1999 yılı verilerine göre, meme kanseri kadınlarda görülen kanserler arasında % 24.1 (2390 vaka) oranıyla en sık görülen kanser türüdür ve insidansı giderek artmaktadır [41]. Ayrıca ülkemizde yapılan baska bir çalışmada, İzmir' de kadınlarda en sık görülen kanserin % 26.7 ile meme kanseri olduğunu belirtmistr[42].

1.3.1.Meme Kanseri Risk Faktörleri

1.3.1.1. Yaş

Yasla birlikte meme kanseri risk insidansının yükseldigi ve menapoz dönemine kadar her 10 yılda ikiye katlandığı daha sonra ise dramatik bir şekilde azaldığı bildirilmistir. Akciger kanseri ile karşılaştırıldığında genç yasta görölme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmistir [40].

1.3.1.2. Coğrafik Varyasyon

Batı ülkeleri ile uzakdogu ülkeleri arasında meme kanseri görölme sıklığı birbirinden oldukça farklıdır ve bu fark gittikçe azalmaktadır. Japonya'dan Hawai'ye göçeden göçmenlerle yapılan çalışmalarda, göçmenlerin meme

kanseri oranının bir veya iki generasyon sonra göçtükleri yerlerin oranına yaklaştığı görülmüştür. Bu da çevresel faktörlerin genetik faktörlere göre oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir[40].

1.3.1.3. Menapoz Yaşı

Hayatlarında menstruasyona erken başlayan veya geç menapoza giren kadınlarda yüksek bir meme kanseri riski görüldüğü rapor edilmektedir. 55 yaşından sonra doğal bir menopoz geçiren kadınların, 45 yaşından önce menopoz tecrübesi geçiren kadınlara göre neredeyse iki kat meme kanseri gelişim riski taşıdığı bildirilmiştir [43,47].

1.3.1.4. İlk Gebelik Yaşı

Hiç çocuk sahibi olamama ve ilk doğumun geç yaşta gerçekleşmesinin yaşam süresindeki meme kanseri insidansını arttırdığı belirtilmiştir[46,48,49]. 30 yaşından sonra ilk çocuğa sahip olanlarda meme kanseri riskinin, 20 yaşından önce ilk çocuğa sahip olanlara göre iki kat daha fazla olduğu bildirilmiş olup, en fazla risk taşıyan grubun ise 35 yaşından sonra çocuk sahibi olan kadınların olduğu ve bunların hiç çocuk sahibi olamayanlardan da daha fazla risk taşıdıkları bildirilmiştir. Erken yaşta ikinci çocuğa sahip olmanın meme kanseri riskini daha da azalttığı bildirilmektedir[50].

1.3.1.5. Aile Hikayesi

Batı ülkelerinde meme kanserlerinin % 10'undan fazlasının genetik yatkınlıkla alakalı olduğu belirtilmektedir. Meme kanseri gelişiminde genellikle sınırlı penetransla otozomal dominant olarak kalıtımın söz konusu olduğu, yani her iki cinsiyetle hatta bazı ailelerin kendilerinde kanser gelişimi olmadan da anormal geni aktarabileceği bilinmektedir. Ancak meme kanseri gelişimi ile ilgili olabilecek genlerin sayısı su anda tam olarak bilinmemektedir. Yüksek riskli ailelerin (yani yakın akrabalarında dört veya daha fazla meme kanseri

bulunması) ogunda, sırasıyla 17 ve 13 nolu kromozomların uzun kollarına yerleşmiş olan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki bozukluklar sıklıkla rapor edilmiş ve üzerinde önemle durulmuştur [51,52]. Genlerin her ikisinin de çok büyük genler olduğu ve mutasyonların hemen her pozisyonda oluşabildiği bilinmektedir. Bir kadının birinci dereceden akrabası (anne, kızkardeşi veya kızı) 50 yaşından önce hastalık gelişimi göstermişse, o kadının meme kanseri riskinin iki veya daha fazla kat yükseldiği, eğer daha erken yaşta hastalık gelişimi göstermişse o zaman riskin daha da artabileceği bildirilmiştir [40].

1.3.1.6. Önceki Benign Meme Lezyonları

Siddetli atipik epitelyal hiperplazili kadınların, memelerinde herhangi bir proliferatif değişiklik olmayan kadınlara göre, dört ile bes kat kadar daha yüksek oranda meme kanseri gelişim riski taşıdıkları ve bunun yanında ailesinde meme kanseri hikayesi varsa bu riskin daha da artabileceği belirtilmiştir[40].

1.3.1.7. Radyasyon

İkinci Dünya savaşı süresince radyasyona maruz kalmış genç kızlarda meme kanseri açısından katlanmış bir risk gözlemlenmiştir. Bunun yanında iyonize radyasyon yaşamın ileri safhalarında bu riski arttırmaktadır [40]. İyonize radyasyonun bayan uçuş görevlileri, hemşireler, kimyacılar ve yalıtım işçilerinde meme kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir [53,55].

1.3.1.8. Diyet

Popülasyonlarda günlük yağ alımı ve meme kanseri insidansı arasında yakın bir korelasyon olsa da, meme kanseri ve yağ alımı arasındaki ilişki tam olarak güçlü ya da tutarlı değildir. Bununla birlikte insan diyetinde çok çeşitli doğal karsinogenler bulunmakta olup, bunların çoğunun oksijen radikalleri oluşturarak DNA hasarına yol açabileceği bilinmektedir [56].

1.3.1.9. Kilo

Postmenapozal dönemdeki kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini iki kat arttırdığı, bununla birlikte premenapozal dönemdeki kadınlar arasında ise bu insidansın azaldığı gösterilmiştir [57].

1.3.1.10. Alkol Kullanımı

Bazı çalışmalar alkol tüketimiyle meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olabileceği öne sürmektedir, örneğin yüksek oranda alkol kullanan kadınlarla yapılan bir çalışmada alkol alımının meme kanseri riskini %15 arttırabileceği bildirilmiştir [58].

Bununla birlikte meme kanseri insidansı ile alkol tüketimi arasındaki bu bağlantının tam tutarlı olmadığı ve bu bağlantının alkolden başka diğer diyet faktörlerinden de kaynaklanabileceği öne sürülmektedir [40].

1.3.1.11. Sigara

Sigara kullanımının meme kanseri etiyolojisindeki önemi tartışmalı bir konu olsa da, meme kanseri riski ile sigara kullanımı arasında çok zayıf bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir [59,60].

1.3.2. Meme Kanseri Genetiği

Genetik digisiklikler germline mutasyonlarla kalıtılır veya sonradan somatik mutasyonlarla kazanılır. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevresel karsinojenlere maruz kalmayla oluşabilir, bunlar fiziksel (örneğin, iyonize radyasyon), kimyasal (ör;polisiklik hidrokarbonlar) ve biyolojik karsinojenlerdir (ör, virüsler) [61]. Birkaç üyesi etkilenmiş olan ailelerde meme kanserinin kalıtıldığı anlaşılabılır. BRCA1, BRCA2, ATM ve p53 genleri, yüksek allelik

varyantlarıyla kalıtsal meme kanserine yol açan en önemli genler arasında yer almaktadırlar [62]. Bunlar, tümör supresör genlerdir ve tahmini olarak erken ortaya çıkan meme kanserlerinin ailesel grupta olanlarının yaklaşık %50'sinde önem taşıdıkları bildirilmiştir [63,64]. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasına, DNA hasarında hücrel cevaba, transkripsiyonel düzenlemeye ve hücrel proliferasyona dahil olurlar [51]. BRCA1 kromozom 17 üzerinde bulunur ve otozomal dominant geçiş gösterir, kalıtsal kadın meme kanserlerinin büyük çoğunluğundan (%42) sorumlu olduğu görülür [52]. Kalıtsal kanserlerde BRCA2 genini taşıyan 13q bölgesinin olmaması, muhtemelen, genetik değişiklikleri baslatmasıyla ilişkili bir durum olarak işaret edilmektedir [65]. BRCA2 genindeki mutasyonlar, kalıtsal meme kanserli kadın vakaların %32 sinde ve erkek meme kanserli vakaların çoğunda gösterilmiştir [52]. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların olduğu ailelerde, bu mutasyonların yanında kadınlar 70 yaşına gelmişse, riskin %80' leri aşması söz konusudur. Ailesel vakalara karşın, düşük penetranslı genlerin, meme kanserinin sporadik vakalarına katkıda bulunduğu ve diğerlerine oranla daha geç yaşta teşhis edildiği gösterilmiştir [66]. Tüm bu verilerden hareketle, meme tümörleri oluşumuna birçok genetik ve çevresel faktörün aracılık edebileceği kaçınılmaz bir sonuçtur.

1.3.3. Meme Kanseri ve Apoptoz

1.3.3.1. Meme Kanserinde Apoptoz

Normal meme gelişimi hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Tümör gelişiminin yalnızca kontrolsüz hücre proliferasyonu ile değil, bununla birlikte azalmış apoptoz sonucu olması bunun güçlü bir kanıtıdır. Proliferasyon ve apoptoz arasındaki denge kemoterapi, radyoterapi ve hormonal tedavilerin cevabında, tümör gelişimi veya gerilemesini belirlemede çok önemlidir. Tüm bu olaylarda apoptozun indüklenmesi oldukça önemli bir yer tutmaktadır [67,70].

Meme, doğumdan sonra ergenlik ve hamilelik olmak üzere iki ayrı fizyolojik süreçle gelişimini tamamlayan birkaç organdan biridir. Bu safhalar süresince

memenin proliferasyon ve farklılaşmasında belirgin değişiklikler meydana gelmektedir [71].

Normal gelişim ve homeostazide meme bezinde proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü arasındaki denge çok önemlidir. Hücre proliferasyonunun fazla olması veya apoptozun azalması durumları, mutasyonların birikmesine ve böylece meme kanserine sebep olabilmektedir. Duktal karsinoma insitu ve invazif meme kanserlerinde yapılan çalışmalarda apoptozun invazif meme kanseri çevresindeki normal meme epitelinde proliferasyondaki artışa kıyasla azaldığı görülmektedir [72,74]. Meme kanserinde apoptozla ilgili yapılan bir diğer çalışmada da, preinvazif duktal lezyonlarla invazif karsinoma arasındaki mitotik:apoptotik indekslerin farklılıkları gösterilmiştir. Çalışmaya göre az farklılaşmış hiperplazik meme lezyonlarında, az farklılaşmış duktal karsinoma in situlara göre mitotik indeks ve apoptozda artma olduğunu; ama az farklılaşmış invazif meme kanserlerinde mitotik indekste daha fazla artış olduğunu ve bununla birlikte apoptozda ise nispi azalma olduğunu sunmuşlardır [75].

1.3.3.2. Apoptoz ve Moleküler Mekanizması

Apoptoz kontrollü bir hücre ölüm şekli olup, çok hücreli organizmaların gelişim ve homeostazilerinde merkezi bir rol oynar. Akut doku hasarı ve inflamatuvar cevabı uyaran nekroz ölüm şekline kıyasla apoptoz düzenli bir yol şeklinde görülür. Apoptotik hücre ölümü, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve stoplazmik membran parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklerle bağlantılıdır. Apoptozun bozulması, transforme edici mutasyonların toplanmasını kolaylaştırarak, anormal olarak uzayan hücre yaşamına sebep olan karsinogenez mekanizmalardan biri olarak belirtilmektedir [76]. Memeli hücrelerinde karakterizasyonu iyi anlaşılan iki apoptotik yol mevcuttur.

Ekstrensik yolak olarak da adlandırılan ilk yolak, ölüm reseptörleriyle uyarılmakta olup, bunlar tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin alt grubudur. İntrensik yolak olarak adlandırılan ikinci yolak ise, mitokondri katılımlı, Bcl-2 protein ailesi tarafından iletilen ve kontrol edilen bir yolaktır

[77,78]. Her iki yolak da baslatıcı kaspazların aktivasyonuna sebep olarak, efektör kaspazlar aktive edilmektedir. Kaspazlar, sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlardır ve aktive olmaları posttranslasyonel seviyede düzenlenmektedir. İlk başta inaktif prokaspazlar olarak sentez edilirler ve bu prodomenler, küçük altbirim ve büyük altbirimden oluşurlar. Baslatıcı kaspazlar, kaspaz-2 ile kaspaz-9'da olduğu gibi kaspaz aktive eden bölge (CARD), kaspaz-8 ile kaspaz-10'da olduğu gibi ölüm oluşturan bölge (DED) gibi uzun prodomenler içerirler. Bu prodomenler, kaspazların diğer proteinlerle etkileşime girerek kendilerinin aktivasyonlarının düzenlenmesine olanak sağlarlar. Buna karşılık efektör kaspazlar, çok küçük prodomenlere sahiptirler. Kaspaz kaskadı, ölüm baslatıcı sinyalleme kompleksi (DISC) oluşumu ile sonuçlanan ölüm reseptör tetiklenmesiyle veya apoptozom adlı intrinsik protein kompleksiyle aktive edilebilmektedir. Apoptozom mitokondriden sitokrom c salınmasıyla oluşturulur, bu işlem asıl olarak Bcl-2 ailesi üyeleriyle kontrol edilir ve Apaf1 ile bağlantılıdır. Kaspaz-9 daha sonra bu protein kompleksi ile aktive edilir. Bu kaskad bir kere başlatılırsa pozitif ileri besleme sağlanır ve hücre kaçınılmaz bir şekilde apoptoza gider. Efektör kaspazlar DNAazları aktive ederek hücre membranında değişikliklere, protein katlanmasında bozulmalara sebep olmaktadır. Bir kaspaz tarafından ICAD/DFF45 (ICAD, CAD baskılayıcı) in kesilmesi ve inaktivasyonu, kaspazın etkinleştirdiği deosiribonükleazın (CAD) nükleusa girerek DNA'yı parçalara ayırmasına ve sonuçta apoptotik hücrelerdeki karakteristik "DNA ladder" görünümüne sebep olmaktadır [79].

1.4. *Alchemilla L.* Cinsi

Alchemilla L. cinsi türleri Rosaceae familyasına aittir. Rosaceae familyası otsu ve odunsu bitkilerin bulunduğu dikotiledonların büyük ve önemli bir familyasıdır. Bu familyanın 122 cinse ait 3370 kadar türü vardır. Birçok türü süs bitkisi olarak park ve bahçelerde yetiştirilmektedir. *Alchemilla L.* Rosaceae familyası içinde Rosoideae alt familyasının *Sanguisorbaceae* tribusunda yer almaktadır[80]. 1000'den fazla tür ile temsil edilen *Alchemilla* cinsi genellikle holarktik bölgede yayılmakla beraber, bu bölgenin dışında Seylan, Doğu

Hindistan, Ümit Burnu ve Doğu Afrika Dağları'nda da bulunmaktadır[81]. *Alchemilla L.* 'nın Avrasya taksonları Rothmaler tarafından iki seksiyona ayrılmıştır. Bu seksiyonlar *Pentaphyllum* Rothm. ve *Brevicaulon* Rothm.'dur. Aynı araştırmacıya göre bunlara ait taksonların bir kısmı geniş yayılıslı, bir kısmı da endemiktir[82].

Türkiye florasındaki kayıtlara göre, Türkiye'de yayılıs gösteren *Alchemilla L.* türlerinin tamamı *Alchemilla L.* seksiyonuna aittir. Bu seksiyon 3 subseksiyon (*Chirophyllum* Rothmn., *Heliodrosium* Rothmn. ve *Calycanthum* Rothmn. ve 6 seriye (*Saxatiles* Bus., *Sericeae* Bus., *Pubescentes* Bus., *Vulgares* Bus., *Elatae* Rothmn. ve *Calycinae* Bus.) ayrılmıştır [83].

Türkiyedeki *Alchemilla L.* türlerinin çoğunluğu Kuzey Anadolu Bölgesi' nde yayılıs göstermektedir. Bunların Kırım, Kafkasya ve İran'daki türlerle yakın akraba olabilecekleri ileri sürülmektedir[83].

Alchemilla L. cinsi ülkemizde genellikle "aslan pençesi" ismiyle bilinmekte olup, çok sayıda endemik tür ile temsil edilen bir cinstir.

Alchemilla L. cinsi odunsu rizomu bulunan otsu bir bitkidir. Toprak üstünde kalan gövde ve yapraklar çürür, her yıl rizomdan yeni toprak üstü gövde ve yapraklar teşekkül eder. Yapraklar palmat veya palmat yaprak eksenine kadar yarık meydana getirmektedir. Bileşik kimöz tipindeki çiçek durumu üzerinde bulunan sarımsı-yesilimsi renkteki minik çiçekler genellikle dört, bazen de beş parçadan oluşan kaliks ve epikalikse sahip olmasına rağmen, korollaya sahip değildir. Erkek organlar dört adet olup, hipantiyum üzerinde disi organın üzerini örten diskin kenarında bulunur. Dişi organ (pistil) bir adet olup, tek bir aken meyva meydana getirir. Olgun meyva kısmen veya tamamen hipantiyumun içerisinde gömülüdür[84].

Alchemilla L. cinsi ilk olarak Linnaeus (1753) tarafından üç tür ile yayınlanmıştır. Bu türler *A. alpina*, *A. cornucopioides* ve *A. pentaphyllea*'dır, ancak *A. cornucopioides* 1816 yılında Lagendijk tarafından *Aphanes L.* Cinsine aktarılmıştır [85].

Alchemilla L. cinsi taksonomik hiyerarşi içerisinde *Rosoidae* Focke alt familyası ve *Sanguisorbeae* tribusu içerisine konulmuştur(41) ve özellikle Avrupa ve Asya'da geniş bir yayılışa sahiptir. Doğu Afrika'da, Kuzey Amerika'da ve Avustralya'da da dağılımının olduğu belirtilmiştir[86,88].

Avrupa'da 300'ün üzerinde türün tanımı yapılmış olmasına rağmen, Walter[89] 118 tanesini tür olarak kabul etmiştir. *Alchemilla L.* cinsi İran florasında 31[90], Irak florasında iki[91], Sovyet florasında 151[92] ve Kafkasya florasında 36[93] tür ile temsil edilmektedir. Türkiye Florasında 50[84] tür kayıtlı olarak gösterilmesine rağmen daha sonradan yayınlanan yeni türler ve yeni kayıtlarla tür sayısı 76 olmuştur[94,99]]. Türkiye'deki *Alchemilla L.* türlerinin çoğunluğu Kuzey Anadolu Bölgesinde yoğun bir şekilde yayılış göstermekle birlikte, ülkenin tamamına dağılmış durumdadır.

Alchemilla L. tohumları çok geç çimlenme özelliğine sahiptir. İskandinavya'da *A. glabra*, *A. glaucescens*, *A. pastoralis* ve *A. subcrenata* türlerine ait tohumlar toprağa ekildikten sonra ilk yıl herhangi bir gelişmenin olmadığı görülmüştür. Sonbaharda ekilen tohumların bir sonraki yılın sonbaharında ortaya çıktıkları ve bitkilerin ancak 3 yılda gelişmelerini tamamlayabildikleri gözlenmiştir[98]. Tohumlardan yetistirilen bitkilerin, tohumların ait olduğu ebeveynlere tıpatıp benzedikleri tespit edilmiştir [100].

Murbeck[101] ve Strasburger [102] *Alchemilla L.* cinsi içerisinde çok sayıda türün apomiktik olarak ürediğini belirtmişlerdir, ancak cinsin zorunlu apomiktik mi, yoksa fakültatif apomiktik mi olduğu hususunda farklı görüşler bulunmaktadır. Rubtsova[103], Koltunow[104] türlerin büyük bir çoğunluğunun zorunlu apomiktik olduklarını ifade etmelerine rağmen, Glazunova[105,107] ve Izmailow[108,112] *Alchemilla* türlerinin çoğunluğunun zorunlu olmayıp fakültatif apomiktik olabileceklerini belirtmişlerdir . *Alchemilla* cinsi türlerinin apomiktik olmaları onların poliploid olmalarından kaynaklanmaktadır. Kromozom sayıları türler arasında 64 ve 224 arasında değişebildiği gibi, aynı tür içerisinde bile fazla miktarda kromozom sayısında farklılık bulunmaktadır[113,120].

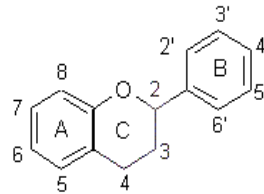
Baeva ve arkadaşları [121] RAPD markırlarla yapmış oldukları DNA çalışmasında DNA, bir türün popülasyonu içerisinde bulunan genetik farklılığın

bazen değişik türler arasındaki farklılıklardan daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir.

1.4.1.Flavonoidler

Flavonoidler, tüm karasal bitkilerde bulunan, çiçekli bitkilere renk veren, bitkinin büyüme, gelişme ve savunmasında rol alan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşiklerin meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, fıncıkta ve çayda bulunduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin sayısının 6500'den fazla olduğu bildirilmiştir. Batı toplumunda bir insanın bu bileşiklerden ortalama günlük alımı 200 mg'dan 1 gr'a kadar değişmektedir. Bu fitokimyasalların genel biyolojik aktivitelerini, antiinflamatuvar,antialerjik, antiplatelet ve antitümoral olarak belirtilebiliriz. Flavonoidlerin, koroner rahatsızlıklarda, kemik kaybında, yaş ile ilgili rahatsızlıklarda ve özellikle kanserin önlenmesinde koruyucu rol oynayabileceği bilinmektedir [122].

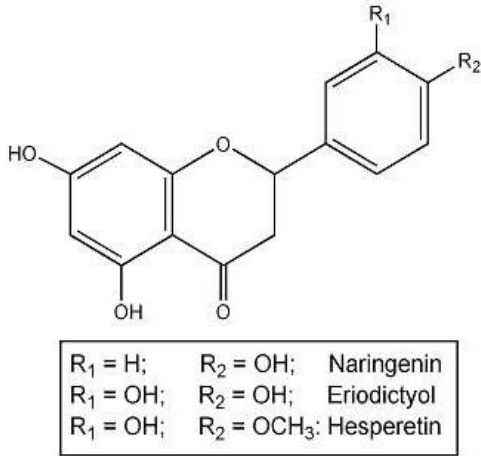
Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren difenilpropan (C6 – C3 - C6) yapısı teşkil etmektedir. Flavonoidlerin temel bileşiği flavon benzo-g-piron (kromon) halka sisteminin 2. konumunda bir fenil halkası içermektedir (Şekil 1.2) [123].



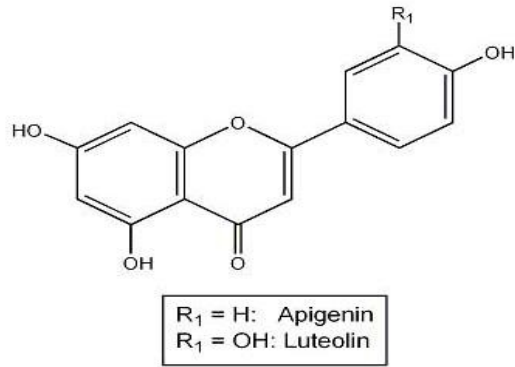
Şekil1.2. Flavon Bileşiği

Flavon halka sisteminde C halkası olarak nitelenen g - piron halkasının büyüklüğü, doymamışlık derecesi ve taşıdığı süstitüentlere göre flavonoidler farklılaşmaktadır.

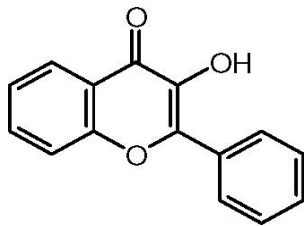
Flavonoidlerin ana yapısına farklı sayı ve farklı pozisyonlarda -OH grubu eklenmesiyle flavonoidlerin alt sınıfları oluşturulmaktadır. Flavonoidler heterosiklik halkalarındaki çeşitlilik nedeniyle Flavanone, Flavanol, Flavone, Flavonol, Anthosiyanidin ve İzoflavonoid alt gruplarına ayrılmaktadır (Şekil 1.3)[124].



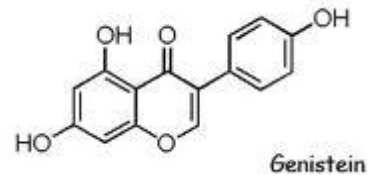
a. Flavanon



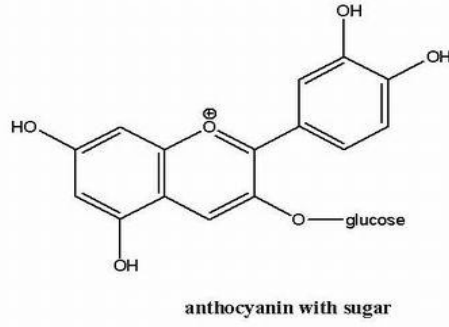
b. Flavon



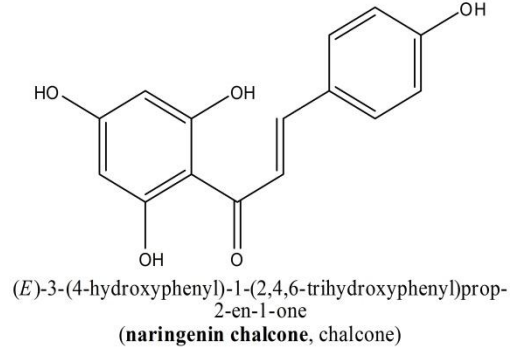
c. Flavonol



d. İzoflavonoid



e. Antosiyanin



f.Kalkon

Şekil1.3.a.Flavanon, **b.**Flavon, **c.**Flavonol, **d.**isoflavonoid, **e.**Antosiyanin, **f.**Kalkon

Doğal flavonoidler 3, 5, 7, 3', 4' ve 5' konumlarından hidroksillenmiş yapıya sahiptir. Glikozitlerde glikozidik bağın 3. veya 7. konumlarda olduğu görülmektedir. Karbonhidrat olarak ise L-ramnoz, D-glukoz, glukoramnoz, galaktoz veya arabinoz taşıdıkları belirlenmiştir [125].

Flavonoid ve izoflavonoidler etanol, metanol ve asetonitril gibi çözücülerde su veya organik çözücülere göre çok daha iyi çözünmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidler besinlerde glikozidik konjugatlar halinde bulunmaktadır. Bu glikozidik konjugatlar flavonoid ve izoflavonoidlerin aglycone formuna göre suda daha iyi çözünmektedir.Çünkü aglycone formunda, absorpsiyon öncesi memeli veya mikrobiyal glukozidazlarla şeker kısmının enzimatik olarak ayrılması gerekebilmektedir.

Flavonoid ve izoflavonoidlerin fenolik kısmı glukorinidleri oluşturmak için UDPglukuronosiltransferazlarla, sülfatları oluşturmak için de sülfotransferazlarla konjuge olabilmektedir. Bu glukuronid ve sülfat formları kanda, safrada ve ürinde aglyconlara göre daha kolay taşınmaktadır. Ayrıca, bu konjugatların toksisiteleri aglycone formlara göre daha düşüktür[124].

Flavonoidler hücre yaşamı için önemli birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Flavonoidler, hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve oksidatif stresi

inhibeetmekte, apoptozisi, detoksifikasyon enzimlerini ve immün sistemini indüklemektedirler. Bu biyolojik özelliklerin, kanserin tedavisinde ve önlenmesinde etkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar meyve ve sebze tüketimi ile kanser sıklığı arasında zıt bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, flavonoidlerin kanser riskinin azaltılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Hollandalı ve Finlandiyalı bilim insanlarının yaptıkları iki ayrı çalışmada flavonoidlerin kanser ve koroner arter hastalığında koruyucu etkisi olduğu ortaya konmuştur[126].

Çin ve Japonya gibi uzak doğu ülkelerinde, meme, prostat, kolon ve diğer birçok kanserin görülme sıklığı, Avrupa ve Amerika'ya göre daha düşüktür. Bunun nedeni olarak, bu bölgelerdeki beslenme alışkanlığı gösterilmektedir. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla, flavonoid ve izoflavonoid içeriği açısından zengin besinlerin tüketimiyle kanser oranlarındaki azalmanın ilişkili olduğu gösterilmiştir [127].

İn vivo ve in vitro çalışmalarda, flavonoidlerin ve birkaç izoflavonoidin kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır [128,130]. Hesperetin, naringein, baicalein, galangin, genistein ve quercetin insan meme kanseri hücre serisi MDA-MB-435'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, flavonoidler birlikte verildiğinde, daha düşük dozlarda bile hücre proliferasyonunda etkili bir inhibisyon gözlemlendiği belirtilmektedir[131].

İzoflavonoidlerden genistein ve daidzeinin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri vardır. Genisteinin, fare neonatal döneminde, DMBA(dimethylbenz(a)anthracene) ile oluşturulmak istenen meme kanserinin oluşmasını geciktirdiği bildirilmektedir. Bu etkinin, genisteinin östrojen reseptör antagonisti veya agonisti özelliklerinden bağımsız olduğu belirtilmiştir[132].Flavonoidlerin hücre biyolojik yaşamı üzerine olan tüm etkileri, birbirlerinden farklılık gösteren alternatif yollarla, doza ve zamana bağlı olarak değişebilmektedir. Dolayısıyla her hangi bir flavonoidin etkisini, flavonoid ve kanser hücresinin tipi belirlemektedir.

1.4.1.1. Flavonoidlerin Antikanserojen Özellikleri

Flavonoidler, G1/S ve G2/M kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurmaktadırlar. Kansere hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalarda bu gösterilmiştir [133,134]. Zhou vd'leri (1998) tarafından yapılan bir çalışmada genistein, genistin, daidzein, biochanin A'nın değişik konsantrasyonlarda (0 – 50 µg/mL) kemirgen ve insan mesane kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi indüklediği belirtilmektedir [135]. Lian vd'leri (1998) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre serisinde, genisteinin (30 µg/mL) p21 up regülasyonu üzerinden G2/M duraklamasını tetiklediği ve apoptozisi indüklediği bildirilmiştir [136]. Ayrıca, quercetin ve apigenin ile ilgili yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser hücrelerinde G1/S'te (quercetin, 30, 100 µg/ml) ve G2/M (apigenin, 0 – 80 µg/mL) kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulduğu, nükleer fragmentasyonun ve nükleer kromatin yoğunlaşmasının meydana geldiği, apoptozisin tetiklendiği bildirilmiştir. Flavonoidlerin bu etkilerinin p53 aktivasyonu ve/veya hücre döngüsü kinazlarının inhibisyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Apigenin (0 – 80 µg/mL), mutasyon açısından birbirinden farklılık gösteren SW480 (mutant Ras ve p53, truncated APC), HT-29 (mutant p53 ve truncated APC) ve Caco-2 (mutant p53 ve truncated APC) kolon kanseri hücrelerine uygulandığında, SW480 hücrelerinde proliferasyonun durdurulmasının ve G2/M noktasındaki blokajın diğer hücrelere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. SW480 hücre serisi kolon kanseri gelişiminde daha etkili olan mutasyonlara sahiptir. Bu durum, flavonoidlerin, belli bir tümörün gelişimine neden olabilecek mutasyonlara sahip hücrelerde daha etkili olabileceğini ortaya koymaktadır [124].

1.4.1.2. Flavonoidler ve Çoklu İlaç Direnci

Kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı geliştirdiği çoklu ilaç direnci (MDR, Multi Drug Resistance) kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir. MDR, tek bir sitotoksik ajana maruz kalan kanser

hücrelerinde, çapraz reaksiyon sonucu, birçok kemoterapötik ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasıdır[137]. MDR, ATP – bağlanma kaseti (ABC) protein ailesine ait membran proteinlerince düzenlenmektedir. Bu ailenin bilinen ve en çok çalışılan proteinleri,MDR1 genince kodlanan MDR1 (P-glikoprotein) ve MRP1 (multidrug resistance associated protein 1) genince kodlanan MRP1 proteinleridir. Bu proteinlerin dışında MRP2, MRP3 ve BCRP/MXR1 proteinleri de MDR oluşumunda rol alan proteinlerdir. MDR proteinleri, ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak kemoterapötik ilaçların hücre dışına taşınmasını sağlayan ATPaz'lardır[138].En önemli MDR proteinlerinden P-glikoprotein (P-gp) plazma membranında lokalizedir. Her bir MDR taşıyıcı proteini, yapısında hidrofobik iki transmembran domaini (TMD) ve iki nükleotit-bağlanma domaini (NBD) içermektedir. TMD, ilacın bağlanmasını ve atılımını sağlarken, NBD, ATP bağlanması ve hidrolizini sağlamaktadır. Proteinin N ve C terminal uçları sitozole bakmaktadır.P-gp aşırı eksprese eden hücreler, çeşitli ilaçlara (antrasiklinler, antibiyotikler, taxanlar, peptitler, hormonlar) karşı direnç göstermektedirler. Direnç gösterilen bu substratların çoğunun üç ortak özelliği vardır. Bu özellikler, hidrofobisite, büyük hacim ve nötral pH'ta pozitif yüklü nitrojen atomu taşımalarıdır. MDR proteinleri kanser hücrelerinde aşırı eksprese olmaktadır ve kanser hücrelerinde gelişen MDR aktivitesini ortadan kaldırmak için çeşitli MDR inhibitörleri geliştirilmektedir. Etkili bir kanser tedavisi için, MDR modülatörleri olarak da adlandırılan inhibitör moleküllerle kemoterapötik ilaçların birlikte verilmesi önerilmektedir[139]. MDR proteinlerinin temel rolü, hücreyi toksik ajanlara karşı korumaktır. Bu proteinler, gastro – intestinal doku, böbrek proksimal tübülü, hepatosit yüzeyi ve kan–beyin bariyeri gibi normal dokularda da eksprese olmaktadır. Bu bölgelerde bulunan MDR proteinleri, vücuda oral yolla alınan ilaçların kandan intestinal lümene salınışlarını düzenleyerek absorpsiyon sınırını belirlemektedir. MDR proteinleri, yapısal olarak ilişkili veya ilişkisiz birçok molekülün (vinca alkaloidleri, etoposidler,taxenler ve antrasiklinler gibi) hücre dışına atılımını gerçekleştirebilir. Ancak, P-gp aracılı direnç mekanizmasını inhibe edebilen moleküller de vardır. Bu moleküllere örnek olarak, verapamil, quinidin, dihidropiridin analogları, kalsiyum kanal blokerleri, kalmodulin antagonistleri, hidrofobik peptidler, protein kinaz inhibitörleri,antibiyotikler, siklosporin A,

flavonoidler ve diğ er polifenoller verilebilir. Ancak, çoğ u MDR modölatörleri de P-gp tarafından hücre dışına atılmaktadır. Bu durumun üstesinden gelebilmek için uygulanan modölatörlerin konsantrasyonunun artırılması, bir takım toksik yan etkilerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Örneğ in, verapamil kardiyotoksisiteye neden olurken, siklosporin A immün sistemin baskılanmasına yol açmaktadır. Hormon karakterli modölatörlerin de klinik açıdan risk oluşturabileceğ i belirtilmiştir. P-gp'e bağlanan ve taşınmayan hidrofobik antiöstrojenik modölatörlerin ovaryum kanser hücrelerinde agonist gibi davrandığı bu yüzden de endometrial kanserler için kullanılmasının şüpheli olduğ u belirtilmiştir [139]. Kanserde geliş en ilaç direncinin kırılmasında etkili olabileceğ i düşünölen en önemli modölatörlerden biri de flavonoidlerdir. Flavonoidlerin hücre iç i fizyolojik rolleri yanında, çoklu ilaç direnci proteinlerinden MRP (multi drug resistant protein), BCRP (breast cancer resistant protein) ve Pgp'nin ATPaz aktivitesini inhibe ettiğ i bilinmektedir. Flavonoid ve izoflavonoidlerin, MDR üzerindeki inhibitör etkileri tiplerine göre dört sınıfta toplanabilmektedir.

Bunlar:

- a) MDR1, MRP1 veya MRP2 genlerinin ekspresyonunun inhibe edilmesi,
- b) Flavonoidlerin taşıyıcı MDR proteinlerin NBD [140], TMD veya steroid bağlanma bölgelerine bağlanması [141], sayılır.
- c) Proteinlerin ATP-az aktivitelerinin inhibe edilmesi,
- d) MDR1'den bağımsız mekanizmalardır [140].

Flavonoidler, ayrıca plazma membran ATPaz, siklik AMP bağımlı protein kinaz ve protein kinaz C gibi birçok ATP bağlanma proteinlerini inhibe etmektedir [141].

Flavonoidlerin düzlemsel yapıları onların P-gp ile ilişkilerini belirlemektedir. Flavonoidler, P-gp'nin ATP bağlanma bölgesine ve hidrofobik steroid bağlanma bölgesine bağlanmaktadır. Flavonoidlerin, proteinlerin ATP bağlanma bölgesine bağlanırken nasıl bir oryantasyon yaptıkları tam olarak anlaşılamamıştır [142].

Flavonoidlerin hidrofobik özellikleri, onların inhibitör etkilerini belirleyen bir diğer önemli noktadır. Flavonoidlerin P-gp'nin NBD2 parçasına bağlanmasında ve proteinin direnç aktivitesinin inhibisyonunda hidrofobik özellik kritik bir parametredir. Hidrofobik etki, flavonoidlerin taşıdığı -OH gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlıdır. Polifenollerin hidrofobik kısımlarının P-gp'lerle etkileşiminde önemli olabileceği bildirilmiştir[8]. Ancak hidrofobik özellik tek başına P-gp ile olan ilişkiyi belirlemede yeterli değildir.

Flavonoidlerin MDR üzerindeki etkilerinin birbirlerinden farklı ve çok boyutlu olduğu anlaşılmaktadır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı, hidrofobisiteleri, düzlemsel yapıları ve P-gp üzerindeki bağlanma bölgelerinin farklılığı onların MDR üzerine olan etkilerinde temel rol oynayan özelliklerdir [5,8]. Flavonoidlerin biyoyararlığı sınırlıdır ve bu yüzden plazma konsantrasyonları çok düşüktür. MDR üzerinde flavonoidlerin sinerjistik etkilerinin değerlendirilmesi daha anlamlı olabilir [8].

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü(L929 fibroblast hücresi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kanser Araştırma Merkezi(MCF-7 kanser hücresi)

Laminar flow kabin(ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet,Labor İldam,Türkiye), soğutmalı santrifüj(ROTINA 380R Hettich,Almanya), inverted mikroskop(Leica DM6000B, İsveç), vorteks, elisa plate okuyucu(BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2) , karbondioksitli etüv(Binder CB150) ,hemositometri(İnvitrogen,Countess), gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri-xCELLigence RTCA (Roche,Almanya), hassas terazi (Mettler toledo MS204)

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM,Biological Industries,İsrail),fetal bovin serum(FBS,Biological industries,İsrail),penicillin-streptomycin (antibiyotik, Biological Industries,İsrail),tripsin-EDTA Solution C in PBS(Biological Industries,İsrail), WST-1 (Roche, Almanya),48 well plate (BD,USA),96 well plate(BD,USA),25 cm²lik hücre kültür flaskı(BD,USA), 0,2 µm filtre(Sartorius),15 ml santrifüj tüpü(Nunc,Almanya) , mikropipet(20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya),96 e-plate(RTCA Resistor plate 96,Roche,Almanya)disposable pipet (2ml,5ml,10ml), Etanol (Merck, Almanya),PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

2.2.Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar

2.2.1.Besiyeri Hazırlanması

%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12 (DMEM/F-12)

%10 Fetal bovin serum

%1 Penicillin-Streptomycin

2.2.2.Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlanır.

Hoechst ise 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Propidium Iodide 1mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlanır.

Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C'de saklanır.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre

Hoechst stoktan 500 mikrolitre

Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlanır.

2.3.Ekstraksiyon

Doğal bileşikler ile çalışılırken ekstraksiyon işlemine hedef bileşiğe göre bir metodun bulunması veya bir metodun modifiye edilmesi ve ya bir metod geliştirilmesi gerekmektedir. Bunun için bitkilerde bulunan doğal bileşiklerin formu iyi bilinmelidir. Bitkilerde bulunan doğal bileşiklerin çoğu bir şeker grubuna bağlı olarak bulunur. Çok nadiren aglikan şeklinde olduğu düşünülerek polar glikozit formlarının ayrımı saflaştırılması ve diğer apolar kısımların uzaklaştırılması ile seçici bir şekilde ekstraksiyon işlemine başlanır. Bazı durumlarda da yağlar vb. Apolar özelliğe sahip bileşiklere başlarken ekstraksiyon aşamasında polar bileşikler elmine etmek içinde aynı düşünce ile hareket etmek gerekir.

Toz haline getirilen bitki türlerinin örnekleri için ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyon işlemi için literatürde çok farklı metotlar kullanılmıştır. Bu metotların seçimi istenilen doğal bileşiğin doğasına göre yapılması gerekliliği üstüne bastırılarak belirtilmiştir. Eğerki bu bileşikler doğal bulunma şekline göre yani glikozit formunda ayrılması isteniyorsa ona göre bir düzenleme yapılmalıdır. Ito Yoichiro ve arkadaşlarının yapmış olduğu ekstraksiyon tekniği kullanılarak üzerinde yapılan modifikasyonlar sonucunda çalışılan laboratuvar şartlarında uygun yapılan iyileştirmeler sonucunda bir metot geliştirildi. Bu metota göre işleme % 50 etanol- dH₂O karışımı veya % 50 metanol- dH₂O karışımı ile hazırlanan çözücü bitki örneğinin ağırlığının hacim olarak yaklaşık 10 katı ekstraksiyon yapılacak kabın içine konuldu. Üzerine bitki örnekleri eklendi ve 150 rpm'de 50 °C 'da 4 saat süresince çalkalamalı inkübatörde maserasyon işlemine tabi tutuldu bu işlemi takiben 20 saat boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakıldı. 24 saat sonunda bu karışım alınarak su trombuna bağlanmış olan bir buhner hunisi vasıtasıyla mavi bant süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Bitki kalıntısı uzaklaştırıldı. Sulu süzüntü rotaevaporatörde 45-50 °C aralığında hidroalkol karışımından alkolü uçurulmak için yaklaşık 15-25 dakika aralığında ters basıncın yaptığı vakum etkisine bağlı olarak tutuldu. Alkolü uçurulmuş içerisinde su bulunan ekstraksiyon sıvısı içerisinde mevcut olan apolar bileşikler ve klorofilin uzaklaştırılabilmesi için bir ayırma hunisi vasıtasıyla petrol eteri (40 °C-60 °C) ile muamele edildi. Bu reaksiyon sonucunda ayırma hunisinde üstte kalan kısımda açık yeşilden örneğe göre koyu yeşile doğru değişen renklerdeki kısımlar su arasındaki yoğunluk farkından dolayı ayrılması ile alındı. Geriye kalan koyu sarı , kahverengi sulu ekstrakt içerisinde bulunan flavonoidleri almak için etil asetat ile yine ayırma hunisi vasıtası ile karıştırıldı.. Reaksiyon sırasında ayırma hunisi bir el üstte diğer el altta olmak suretiyle her iki el ile tutularak farklı yönlerde birbirleri ile ters yönde dairesel şekiller çizmesi ile yavaşça 3 ila 5 dakika arasında karıştırıldı. Bu karıştırmanın sonrasında yoğunluğu sudan daha hafif olan etil asetatlı kısım üstte sarı renk verecek şekilde ayrıldı. Bu ayırım yapıldıktan sonra alttaki sulu faz alınarak liyofilizatöre konulmak için -20 °C dondurucuya alındı. Etil asetatlı fraksiyon alındı rotaevaporatörde etil asetat kısmı uzaklaştırıldıktan sonra rota balonu içerisinde bulunan fraksiyon

tartılarak miktar tayini yapıldıktan sonra az miktarda etil asetat veya etanol içerisinde rota balonundan küçük flakonların içerisine alındı. Bu çözücülerinde uçması için 24-48 saat süresince güneş ışığından etkilenecek şekilde içerisindeki flavonoidlerin yapısının bozunmasını engellemek için karanlık bir ortamda bırakıldı. Sonra çözücülerin numune kabından buharlaşması ile uzaklaşmasını takiben numuneler buzdolabına + 4 °C alındı.

2.3.1. Ekstrakt Solüsyonları

Deneysel çalışmalarda *Alchemilla speciosa*, *Alchemilla barbatiflora*, *Alchemilla tiryalensis*, *Alchemilla orduensis* türlerine ait ekstraktlardan 1mg/ml solüsyonlar hazırlandı.

Deneysel çalışmalarda kullanılacak konsantrasyonlar:

200µg/ml / 100µg/ml / 50 µg/ml / 25µg/ml / 12,5 µg/ml / 6,25µg/ml / 3,125µg/ml

2.4. Hücre Kültürü

2.4.1. -80°C Derin Dondurucudan Alınan Hücrelerin Kültürünün Yapılması ve Tripsinizasyonu

Derin dondurucudan çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37°C 'de kısa sürede çözülür. Steril Laminar flow kabin içerisinde çözülen hücreler 15ml'lik falkon tüpe aktarılır ve üzerine 1ml %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren DMEM/F-12 medyumunu konur. Falkon 3500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet el yardımıyla hafifçe vurularak süspansiyon edilir. Falkona 3,5 ml (%10 FBS , %1 antibiyotik içeren) DMEM/F-12 medyumunu koyulur ve homojen hale getirildikten sonra 25cm²' lik flaska ekim yapılır. Flask 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatöre kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınır ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum dökülür ve 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol

edilir.Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktararak 3500rpm’De 2 dakika santrifüj edilir.Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspansiyon edilir.

2.4.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hemositometri ile yapılır.santrifüj sonrasında tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 ml (%10 FBS ve %1 antibiyotik içeren) DMEM/F-12 medyum eklenir. Pipet yardımıyla pellet ve DMEM/F-12 süspansiyon edilir ve süspansiyon edildikten sonra 10µl karışımdan alınıp ependorf tüpe koyulur. Üzerine 10µl tripan blue eklenip homojenize edilir. Karışımdan 10µl alınıp hemositometri lamına koyulur. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapılır. Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğindedir ve bu nedenle sayım yaparken koyu mavi gözüken hücreler ölü, açık renkteki parlak hücreler canlı olarak sayılır.

2.4.3. MCF-7 Kanseri ve L929 Fibroblast hücrelerinin *in vitro* kültürünün hazırlanması

Dondurulmuş halde -80°C derin dondurucuda bulunan kriyotüplerdeki MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücreleri derin dondurucudan alınarak çözülür. Falkon tüp içerisine çözülen MCF-7 ve fibroblast hücreleri koyulur ve üzerine 1 ml DMEM/F-12 medyum eklenip santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet 3,5 ml DMEM/F-12 medyum ile süspansiyon edilip 25cm²lik flaska aktarılır. Flask kapağı hafif gevşetilerek 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulur. Her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak, yüzey kaplaması tamamlandığında kültür tripsinize edilerek hücreler yeni bir flaska aktarılır.

2.4.4.Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Kanser ve L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Toksisitenin Belirlenmesi

Toksisite deneyi için 48 well plate kullanılır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 20×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılır.48 well plate'de her kuyucuğa 200µl hücre koyulur ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır.24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilir.Kuyucuklardaki medyum boşaltılır. İlk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 100er µl medyum koyulur. 1mg/ml'lik karışımlardan 6.25 ila 200 µg/ml konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.Kontrol grubuna sadece medyum koyulur.48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda well platelerdeki medyum boşaltılır. Fenol red'siz DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyumdan 200 µl kuyucuklara koyulur, üzerine 10 µl WST-1 çözeltisi ilave edilir. 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate kuyucuda 420-480 nm'de okunur. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez.

2.4.5.Bitki ekstraktlarının MCF-7 Kanser ve L929 Fibroblast Hücrelerinde İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılır. – 20 °C'de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA'yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst boyama: +4 °C'da saklanır (33342). Apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium Iodide: +4 °C'de saklanır. DNA'yı ve RNA'yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. İkili boyama için 48 well plate kullanılır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 20×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılır.48 well plate'de her kuyucuga 200µl hücre koyulur ve 24 saat süre ile

inkübasyona bırakılır.24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilir. Kuyucuklardaki medyum boşaltılır. İlk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 100er µl medyum koyulur.1mg/ml'lik karışımlardan 6.25 ila 200 µg/ml konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol grubuna sadece medyum koyulur.48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılır ve her kuyucuga 70 µl ikili çalışma solüsyonu(double staining çalışma solüsyonu)eklenir.48 well plate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılacaktır.

2.4.6. xCELLigence RTCA ile Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Kanseri ve Fibroblast Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonun Belirlenmesi

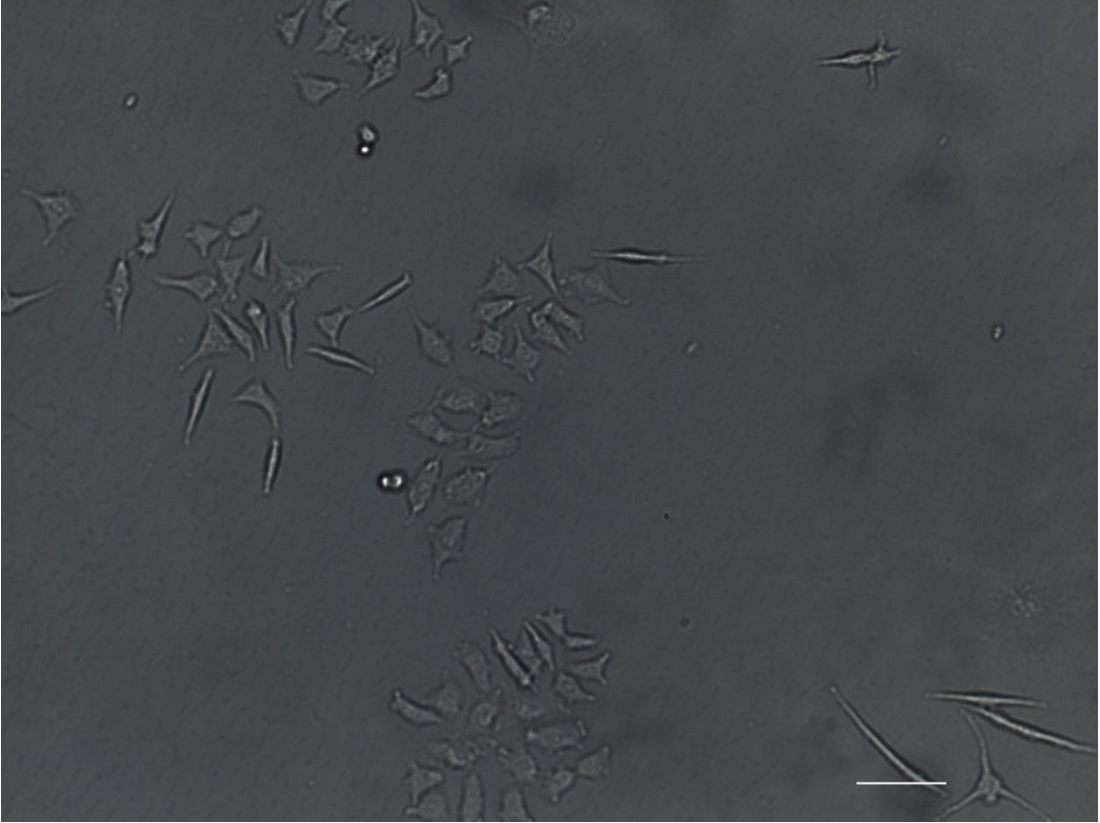
Flasktaki hücrelerin yeterli sayıya ulaştığı mikroskopik incelemeyle belirlendikten sonra içerisindeki medyum dökülür.0,5 ml tripsin-EDTA eklenir flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 3500 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 ml DMEM/F-12 medyum eklenerek süspanse edilerek hücre sayımı yapılır.96 e-plate'in her well'inde 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılır. E-plate'in her well'ine 100'er µl medyum koyulur. E-plate etüvde bulunan xCELLigence 'e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa ulaşması için 10 dakika beklenir.1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra e-plate çıkarılır. Tüm kuyucuklara 100'er µl hücre eklenir. Tekrar e-plate etüve yerleştirilip 10 dakika beklenir. 10 dakika sonunda okuma başlatılır. Hücrelerin plate'e tutunması ve çoğalması için 24 saat bekletilir. 24 saat sonunda hücreler growth fazına geçtiğinde

ekstraktlar uygulanır.E-plate etüvden çıkarılır. Wellerdeki medyumlar boşaltılır. İlk kuyucuklar hariç kalan tüm kuyucuklara 100'er µl medyum koyulur. 1mg/ml'lik karışımlardan 6.25 ila 200 µg/ml konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Plate'teki son 4 kuyucuk kontrol grubu olarak belirlenir. Sadece medyum eklenir . e-plate etüve yerleştirilip 48 saat inkübe edilir.

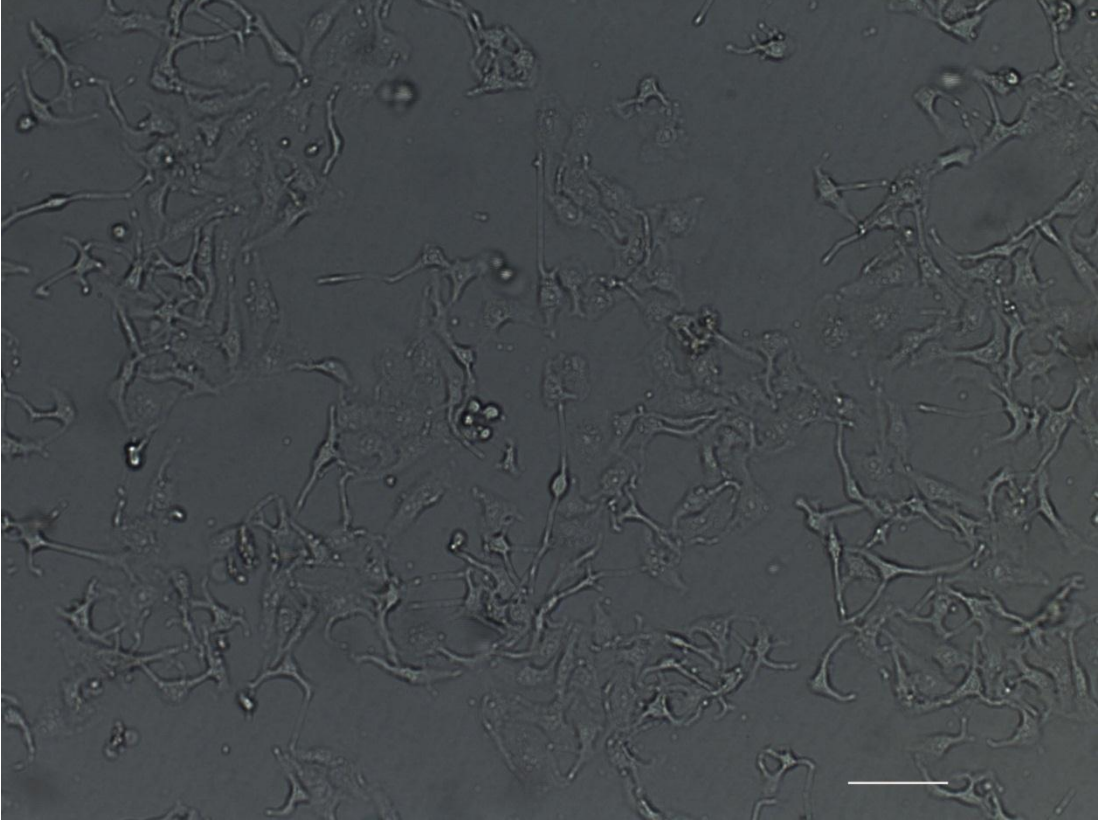
3.ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1.MCF-7 Kanser ve L929 Fibroblast Hücresinin İn vitro kültürünün hazırlanması

Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre -80°C derin dondurucudan çıkarılıp çözülen hücrelerin, in vitro kültürü yapıldıktan sonra 3 gün içerisinde hücreler istenen sayıya ulaşmıştır. MCF-7 Kanser ve L929 fibroblast hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 3.1. ve şekil 3.2. de gösterilmiştir.



Şekil.3.1. L929 Fibroblast hücresi(Bar=65 μm -100X büyütmede LeicaDM6000 Inverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)



Şekil.3.2. MCF-7 Kanser hücresi (Bar=65µm-100X büyütmede LeicaDM6000 Inverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)

3.2.WST1 ile Toksisitenin Belirlenmesi

3.2.1.L929 Fibroblast Hücrelerindeki Toksisitenin Belirlenmesi

Elde edilen verilere göre *Alchemilla* türlerinin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitesi Çizelge 3.1 ,3.2. ,3.3 ,3.4 'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. *Alchemilla barbatiflora*'nın L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol (0 µg/ml)	0.326±	100
6.25 µg/ml	0.306±0,009	93.8
12.5 µg/ml	0.298±0,018	91.4
25 µg/ml	0.292±0,03	89.5
50 µg/ml	0.254±0,03	77.9
100 µg/ml	0.226±0,05	69.3
200 µg/ml	0.201±0,016	61.3

Çizelge 3.1.'deki WST-1 sonuçlarına göre 200 µg/ml konsantrasyonda canlılık oranı düşük olmakla birlikte %61.3 oranındadır. 100µg/ml dozdaki canlılık 200 µg/ml konsantrasyondaki canlılıktan %13 daha fazladır. 50µg/ml'de canlılık 100 µg/ml konsantrasyondan %11 fazladır. 25µg/ml, 12.5µg/ml ve 6.25µg/ml konsantrasyonlarındaki canlılık yüksek konsantrasyonlara göre artış göstermiştir. Ayrıca 6.25 µg/ml konsantrasyonda canlılık oranı kontrol grubuna yakın bir değerdedir.

Çizelge 3.2. *Alchemilla tiryalensis*'nin L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol	0.326±	100
6.25 µg/ml	0.289±	88.6
12.5 µg/ml	0.282±0,01	86.5
25 µg/ml	0.280±0,02	85.8
50 µg/ml	0.276±0,07	84.6
100 µg/ml	0.264±0,067	80.9
200 µg/ml	0.253±0,004	77.6

Çizelge 3.2.'deki WST-1 sonuçlarına göre 200 µg/ml -100 µg/ml konsantrasyonlarda canlılık birbirine yakındır.25µg/ml konsantrasyondaki canlılık oranı 50µg/ml 'e göre %1.1 artış göstermektedir. 6.25 µg/ml konsantrasyondaki absorbans değeri *Alchemilla barbatiflora*'ya göre %6.4 oranında düşüktür.

Çizelge 3.3. *Alchemilla orduensis*'nin L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol	0.326±	100
6.25 µg/ml	0.292±0,017	89.5
12.5 µg/ml	0.282±0,02	86.5
25 µg/ml	0.279±0,02	85.5
50 µg/ml	0.276±0,03	84.6
100 µg/ml	0.266±0,015	82.8
200 µg/ml	0.254±	77.9

Çizelge 3.3.'deki WST-1 sonuçlarına göre 200µg/ml konsantrasyondaki canlılık oranı kontrol grubuna göre %32.1 daha düşüktür. 200µg/ml 'den düşük konsantrasyonlarda canlılık oranları %2.3 oranında artış göstermektedir.

Çizelge 3.4. *Alchemilla speciosa* 'nın L929 fibroblast hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol	0.326±	100
6.25 µg/ml	0.291±	89.2
12.5 µg/ml	0.280±0,02	85.8
25 µg/ml	0.266±0,021	82.8
50 µg/ml	0.264±0,03	80.98
100 µg/ml	0.260±	79.7
200 µg/ml	0.256±	78.5

Çizelge 3.4.'deki WST-1 sonuçlarına göre 100µg/ml konsantrasyondaki canlılık 200 µg/ml konsantrasyona göre %1.5 artış göstermiştir. 6.25µg/ml konsantrasyondaki canlılık 200µg/ml 'e göre %14 artış göstermiştir. Ekstraktların fibroblast hücrelerindeki toksisitesine bakıldığında düşük konsantrasyonda canlılığın en yüksek olduğu tür *Alchemilla barbatiflora*'dır.

3.2.2.MCF7 Hücrelerindeki toksisitenin belirlenmesi

Elde edilen verilere göre *Alchemilla* türlerinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi Çizelge 3.5.,3.6.,3.7. ve 3.8.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. *Alchemilla barbatiflora* 'nın MCF-7 kanser hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
---------------	-------	------------

Kontrol	3.369±	100
6.25 µg/ml	3.118±0,06	92.5
12.5 µg/ml	3.072±0,031	91.1
25 µg/ml	3.041±0,011	90.23
50 µg/ml	2.98±0,05	88.4
100 µg/ml	2.93±0,02	86.9
200µg/ml	2.35±0,019	69.7

Çizelge 3.5.'deki WST-1 sonuçlarına göre 200µg/ml konsantrasyonda görülen toksik etki 100 µg/ml 'de %24 oranında azalmıştır.100µg/ml'den daha düşük konsantrasyonlardaki canlılık oranları yaklaşık olarak %2.4 oranında artmıştır.

Çizelge 3.6. *Alchemilla tiryalensis*'nin MCF-7 kanser hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol	3.369±	100
6.25µg/ml	3.34±	97.95
12.5 µg/ml	3.19±0,027	94.6
25 µg/ml	3.072±0,015	91.1
50 µg/ml	2.98±0,04	88.4
100 µg/ml	2.8±0,069	83.11
200 µg/ml	2.32±0,08	68.8

Çizelge 3.6.'daki WST-1 sonuçlarına göre 200 µg/ml konsantrasyonda canlılık düşük olmasına rağmen, düşük konsantrasyonlarda canlılığın belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Özellikle 12.5 µg/ml ve 6.25µg/ml konsantrasyonlarındaki canlılık kontrol grubuna yakın değerlerdedir.

Çizelge 3.7. *Alchemilla orduensis*'in MCF-7 kanser hücreleri üzerine etkisi

Konsantrasyon	WST-1	% canlılık
Kontrol	3.369±	100
6.25 µg/ml	3.34±0,04	97.95
12.5 µg/ml	3.2±0,03	94.9
25 µg/ml	3.118±0,04	92.5
50 µg/ml	3.072±0,027	91.1
100 µg/ml	2.98±0,004	88.4
200 µg/ml	2.60±0,007	77.1

Çizelge 3.7.'deki WST-1 sonuçlarına göre düşük konsantrasyonlarda canlılık oranı 200µg/ml dozdaki canlılığa göre oldukça fazladır. Özellikle 6.25 µg/ml ve 12.5µg/ml konsantrasyondaki canlılık değerleri gözle görülür şekilde yüksektir.

Çizelge 3.8. *Alchemilla speciosa*'nın MCF-7 kanser hücreleri üzerine etkisi

<i>A.speciosa</i> konst.	WST-1	% canlılık
Kontrol	3.369±	100
6.25 µg/ml	3.34±0,016	97.95
12.5 µg/ml	3.118±0,021	92.5
25 µg/ml	2.93±0,04	86.9
50 µg/ml	2.7±0,07	80.1
100 µg/ml	2.54±0,06	75.3
200 µg/ml	2.35±0,06	69.7

Çizelge 3.8.de gösterilen WST-1 sonuçlarına göre 200µg/ml de 69.7 olan canlılık oranı 100µg/ml' de %8.6 artmıştır.Düşük konsantrasyonlarda canlılık oranındaki artış yaklaşık olarak %7 ile %8 oranında bulunmuştur. Özellikle 6.25 µg/ml konsantrasyonda absorbans değeri fazla buna bağlı olarakta canlılık fazladır.

3.3.İkili Boyama İle Belirlenen Apoptotik ve Nekrotik İndeks Sonuçları

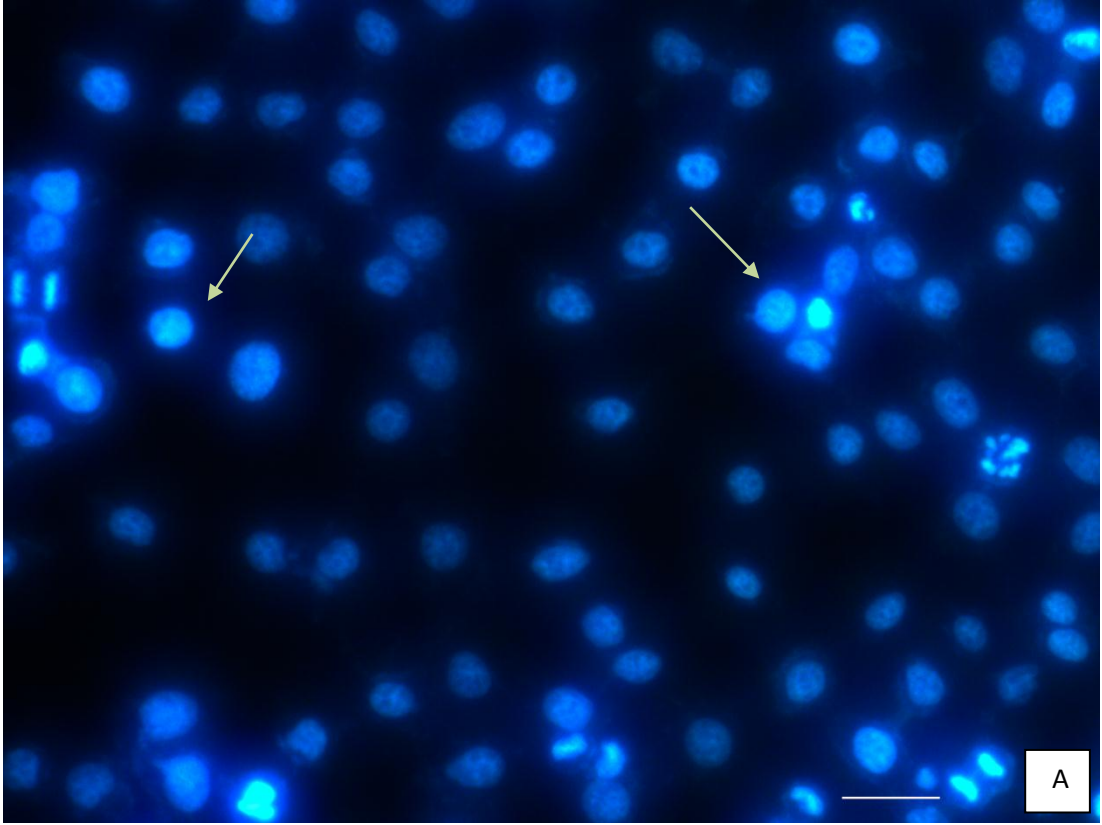
3.3.1.Apoptotik İndeks Sonuçları

MCF7 ve L929 fibroblast hücrelerinde apoptozun belirlenmesi için ikili boyama metodu kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) flouresan boyası DNA'ya bağlanarak mavi flouresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renge boyanmasını sağlar. Apoptotik hücre çekirdekleri, parçalanmış, daha parlak ve çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilirler.

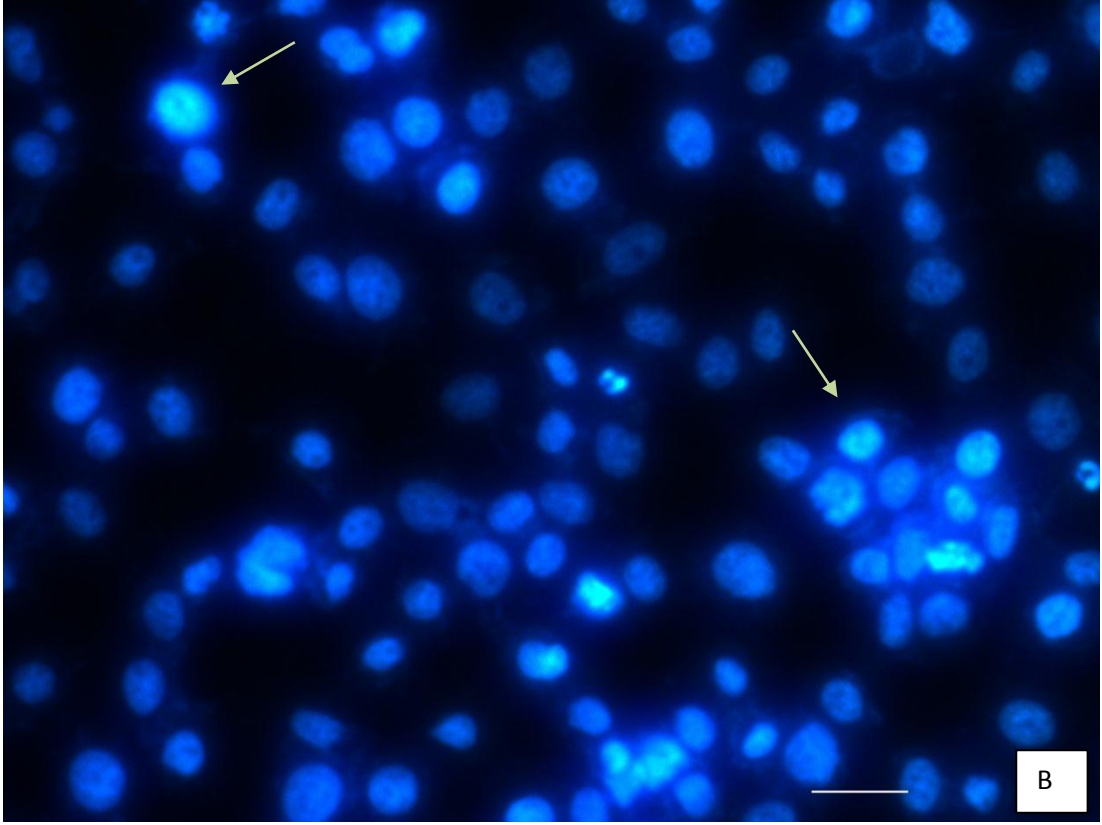
Çizelge 3.9.L929 Fibroblast hücresine ait apoptotik indeks sonuçları

Ekst.Konst.	<i>A.barbatiflora</i>	<i>A.orduensis</i>	<i>A.tiryalensis</i>	<i>A.speciosa</i>
Kontrol (medyum)	1±			
6.25µg/ml	2.5±0.707	1.5±0.707	1.5±0.707	1.5±0.707
12.5µg/ml	2.5±0.707	3.5±0.707	3.5±0.707	5±1.414
25µg/ml	3.5±0.707	5±	4.5±0.707	5±1.414
50µg/ml	7.5±0.707	8±	6.5±0.707	6.5±0.707
100µg/ml	15±	10.5±0.707	9±	9.5±0.707
200µg/ml	15.5±0.707	12±	11±	10.5±0.707

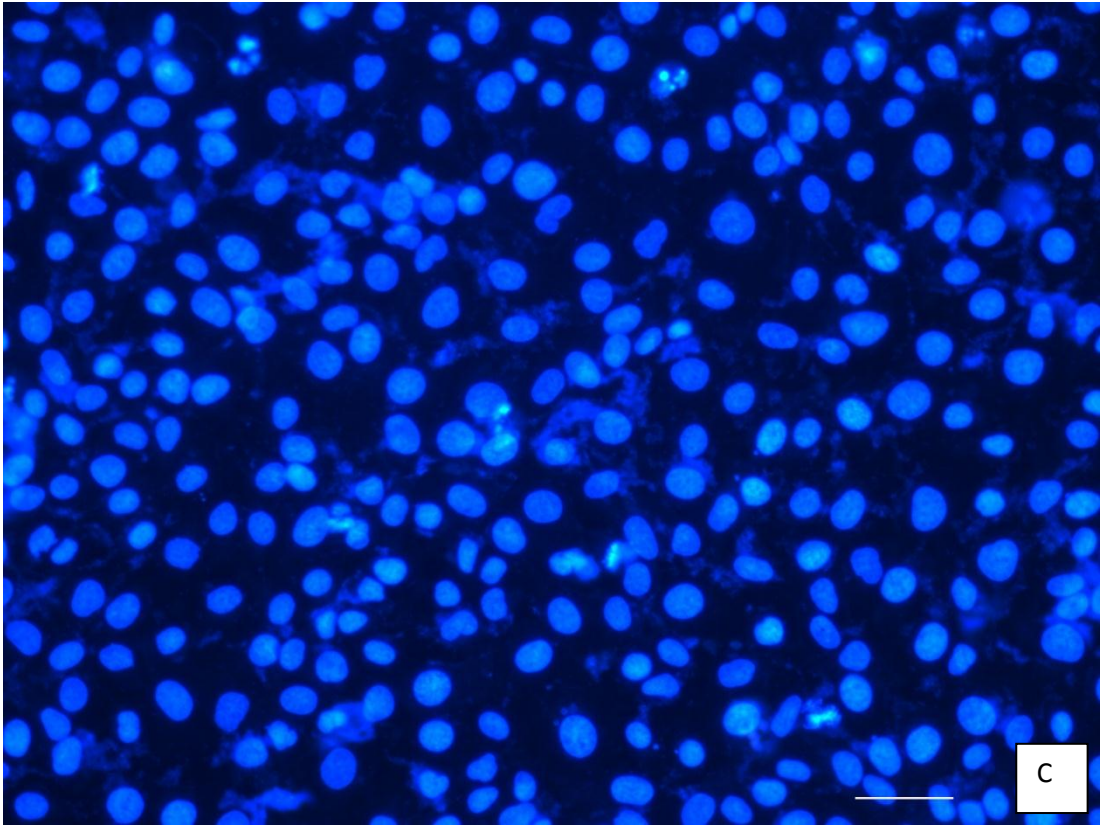
Çizelge 3.9.'da belirtilen sonuçlara göre L929 fibroblast hücrelerine uygulanan *Alchemilla barbatiflora* türünün 200µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlardaki apoptotik indeksi diğer türlere göre daha yüksektir.50µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda apoptotik indeks dört *Alchemilla* türünde de birbirine yakın değerler vermiştir.



Şekil 3.3.A. 200µg/ml *A.barbatiflora*'nın uygulandığı L929 fibroblast hücresi



Şekil3.3.B. 100µg/ml *A.barbatiflora*'nın uygulandığı L929 fibroblast hücresi



Şekil 3.3. İkili boyama ile boyanmış apoptotik L929 fibroblast hücreleri (Bar=65µM- 200Xbüyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

A)200µg/ml *A.barbatiflora*'nın uygulandığı L929 fibroblast hücresi

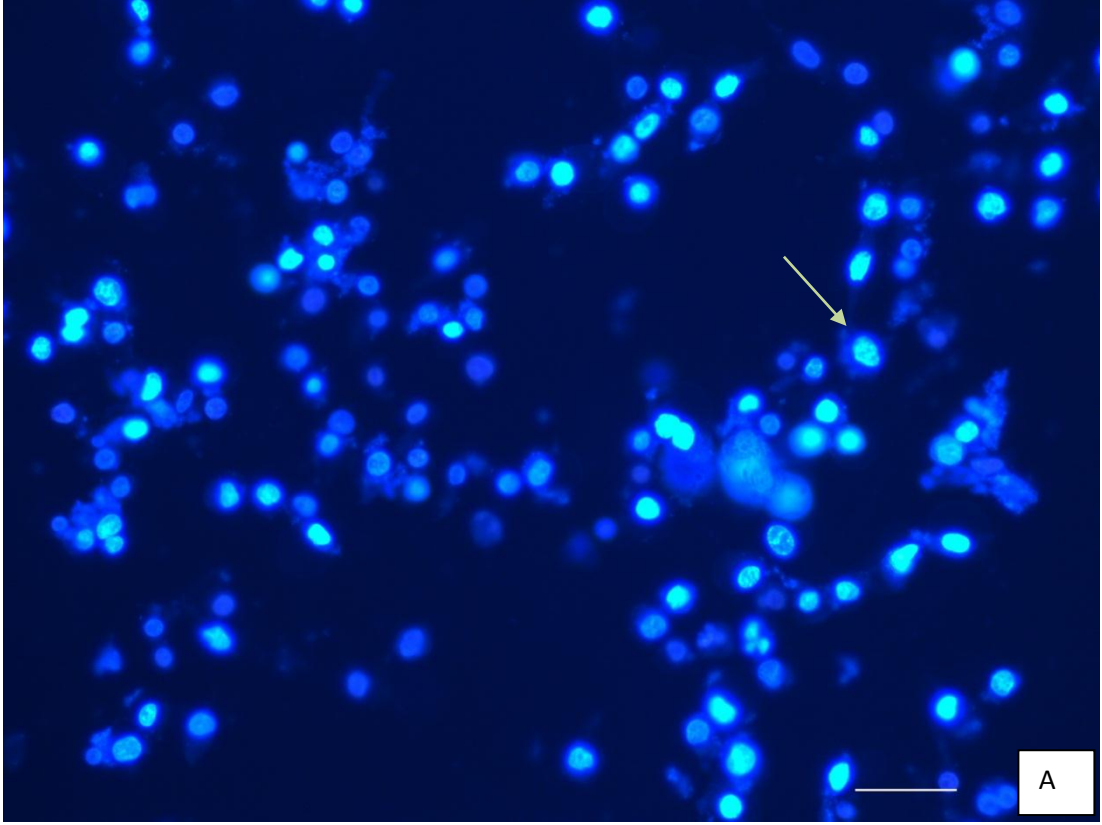
B)100µg/ml *A.barbatiflora*'nın uygulandığı L929 fibroblast hücresi

C)Kontrol grubu-Sadece medyum içeren L929 fibroblast hücresi

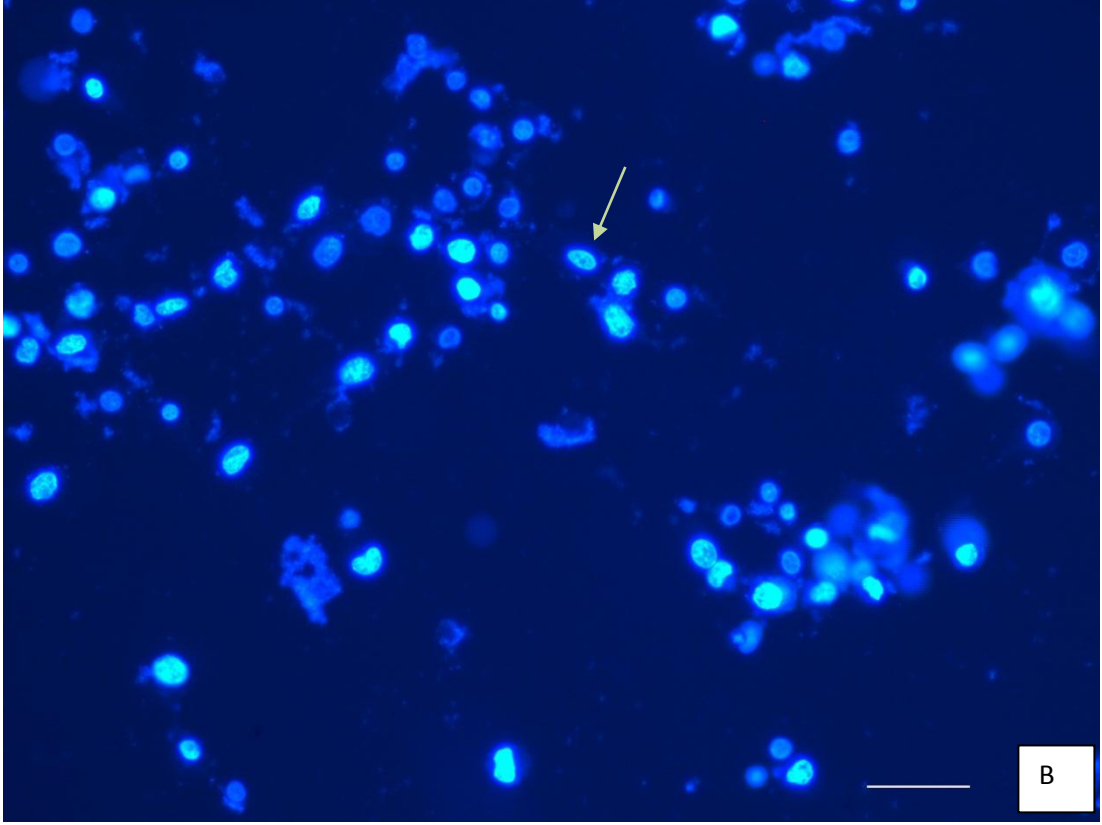
Çizelge 3.10.MCF-7 kanser hücrelerine ait apoptotik indeks sonuçları

Ekst.konst.	<i>A.barbatiflora</i>	<i>A.orduensis</i>	<i>A.tiryalensis</i>	<i>A.speciosa</i>
Kontrol (medyum)	1±			
6.25µg/ml	7±	4±1.414	9.5±0.707	3.5±0.707
12.5µg/ml	9.5±0.707	5±	10±	4.5±0.707
25µg/ml	10±	5.5±0.707	12±	6±1.414
50µg/ml	13±1.414	7±	14±0.707	6±1.414
100µg/ml	16.5±2.121	10±	21±	7±
200µg/ml	22±	13.5±0.707	26±1.414	10±

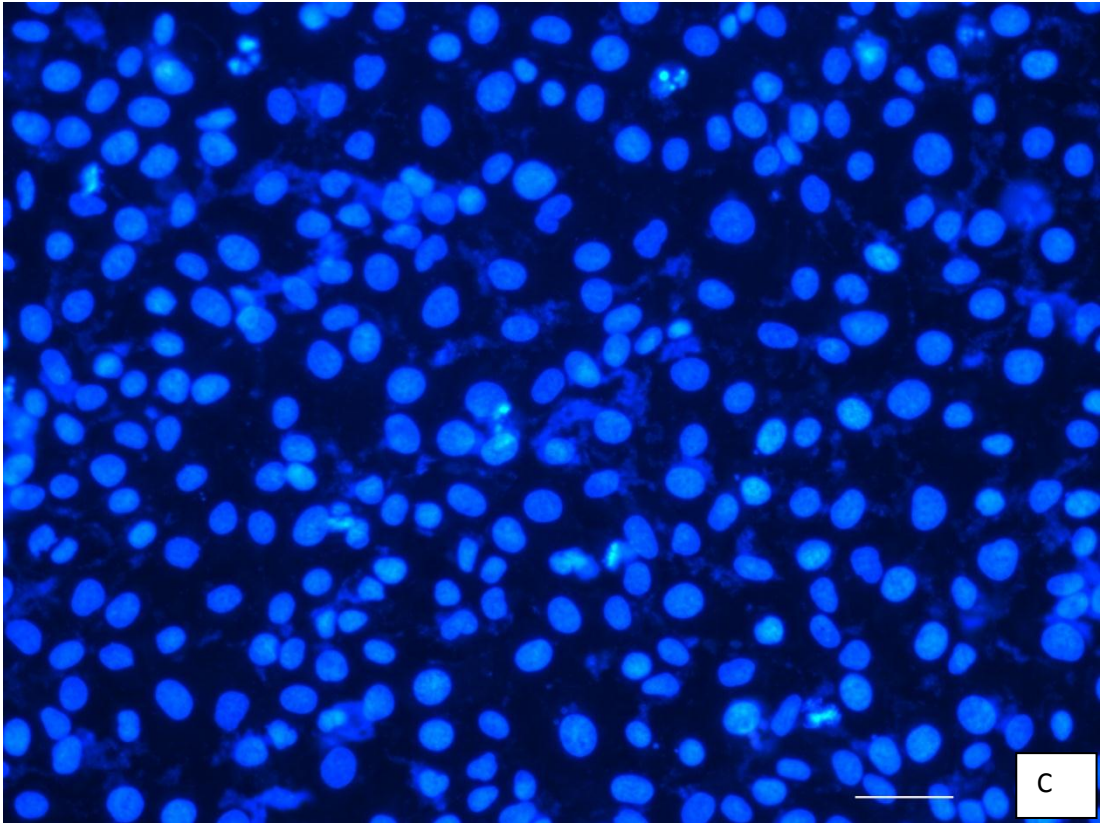
Çizelge 3.10.'da verilen sonuçlara göre MCF-7 kanser hücreleri üzerinde en fazla apoptotik etkiye sahip olan tür *Alchemilla tiryalensis*'tir.200µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlarda diğer türlerden daha apoptotik olduğu görülmüştür. *Alchemilla barbatiflora* türünün de *Alchemilla tiryalensis*'ten sonra apoptotik indeksinin fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil3.4.A. 200 µg/ml *Alchemilla tiryalensis*'in uygulandığı MCF7 hücreleri



Şekil3.4.B. 100 µg/ml *Alchemilla barbatiflora*'nın uygulandığı MCF7 hücreleri



Şekil 3.4. İkili boyama ile boyanmış apoptotik MCF7 hücreleri(Bar=65µm-200X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

A)200 µg/ml *Alchemilla tiryalensis*'in uygulandığı MCF7 hücreleri

B)100 µg/ml *Alchemilla barbatiflora*'nın uygulandığı MCF7 hücreleri

C)Kontrol grubu-sadece medyum içere MCF7 hücresi

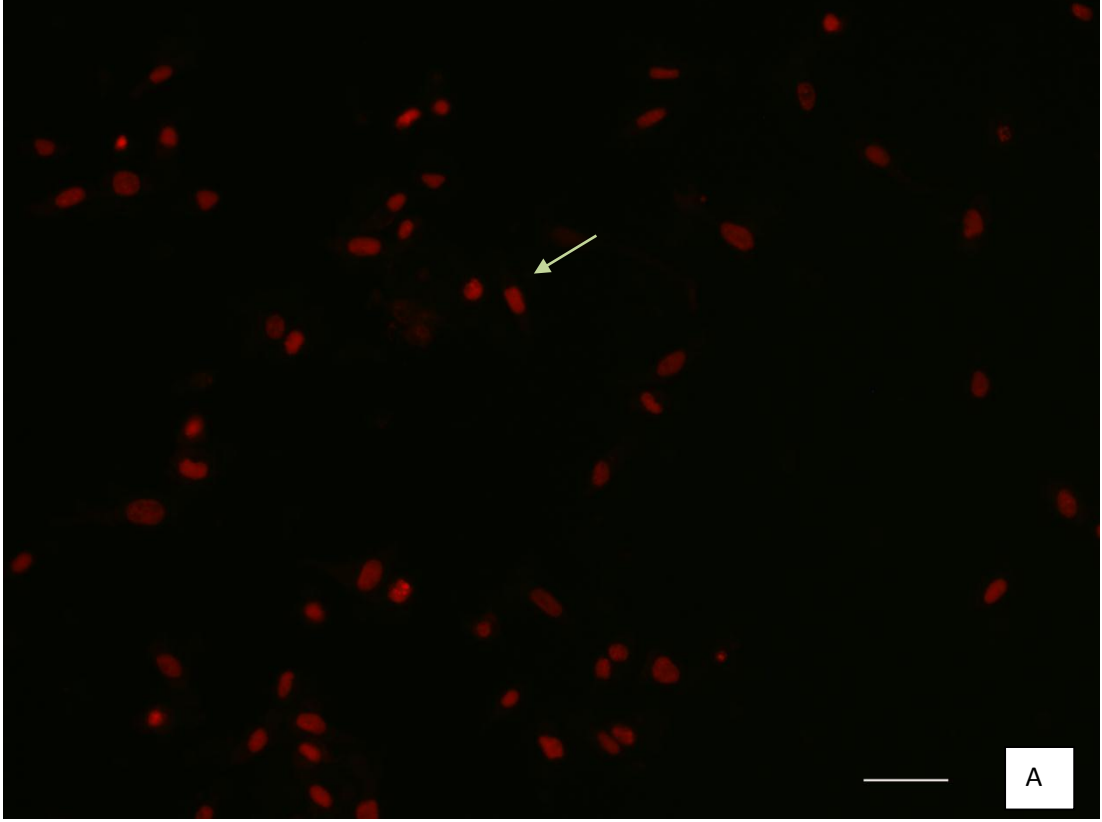
3.3.2.Nekrotik İndeks Sonuçları

MCF-7 kanser ve L929 fibroblast hücrelerinde nekrozun belirlenmesi için,apoptozda olduğu gibi ikili boyama metodu kullanılmıştır.İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid floresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı floresan ve yeşil floresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup hücrelerin nekroza uğradığını göstermektedir.

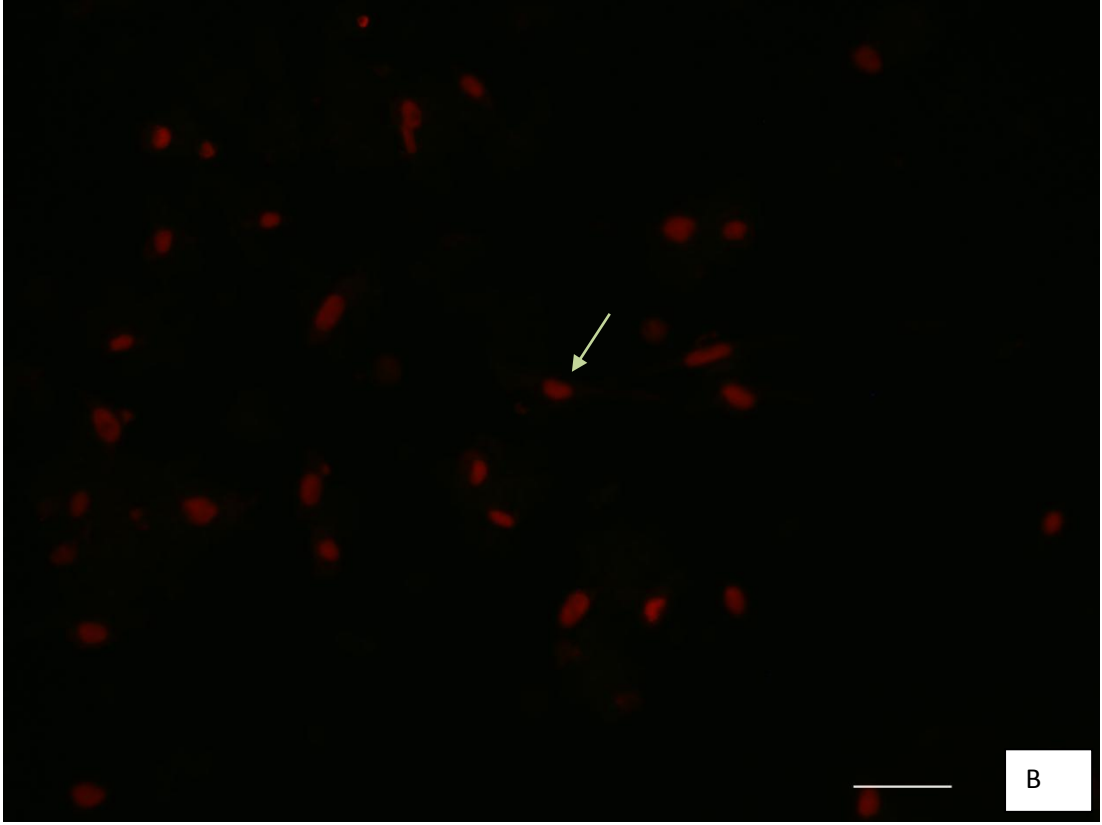
Çizelge 3.11.L929 Fibroblast Hücrelerine ait nekrotik indeks sonuçları

Ekst.konst.	<i>A.barbatiflora</i>	<i>A.orduensis</i>	<i>A.tiryalensis</i>	<i>A.speciosa</i>
Kontrol (medyum)	1±			
6.25µg/ml	5±1.414	9±	10±	11.5±0.707
12.5µg/ml	7.5±0.707	12.5±0.707	12±	13±
25µg/ml	11±1.414	14±	13.5±0.707	14.5±0.707
50µg/ml	20±	16±1.414	14.5±0.707	18±1.414
100µg/ml	28.5±0.707	18±	18.5±0.707	19.5±0.707
200µg/ml	35±	22.5±0.707	20±	20±

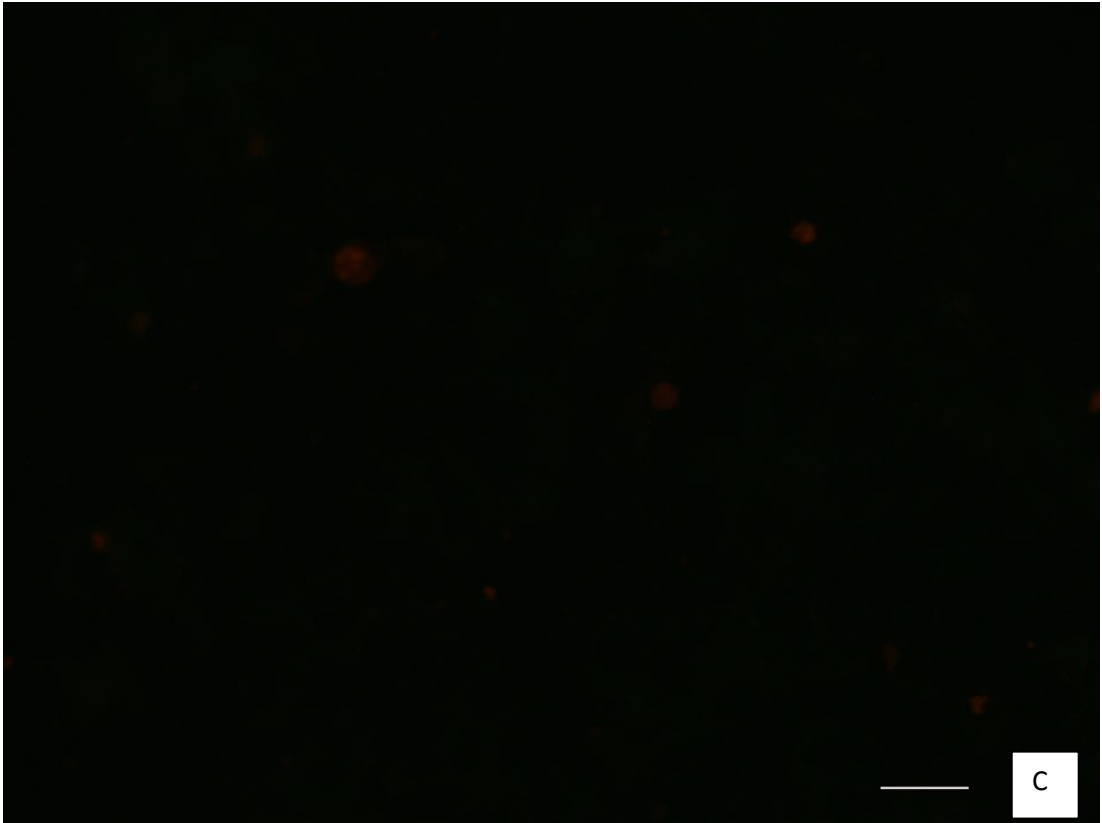
Çizelge 3.11.de verilen sonuçlara göre L929 fibroblast hücreleri üzerinde en fazla nekrotik etkiye sahip tür *Alchemilla barbatiflora*'dır.200µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonlarda diğer türlerden daha fazla nekrotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nekrotik indekste belirtilen değerlerin WST-1 sonuçlarıyla paralellik gösterdiği görülmüştür.



Şekil3.5.A. 200µg/ml *Alchemilla barbatiflora* uygulanan L929 fibroblast hücreleri



Şekil 3.5.B. 100 µg/ml *Alchemilla orduensis* uygulanan L929 fibroblast hücreleri



Şekil 3.5. İkili Boyama ile boyanmış nekrotik L929 fibroblast hücreleri

(Bar=65µm-200X büyütmeye Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

A)200µg/ml *Alchemilla barbatiflora* uygulanan L929 fibroblast hücreleri

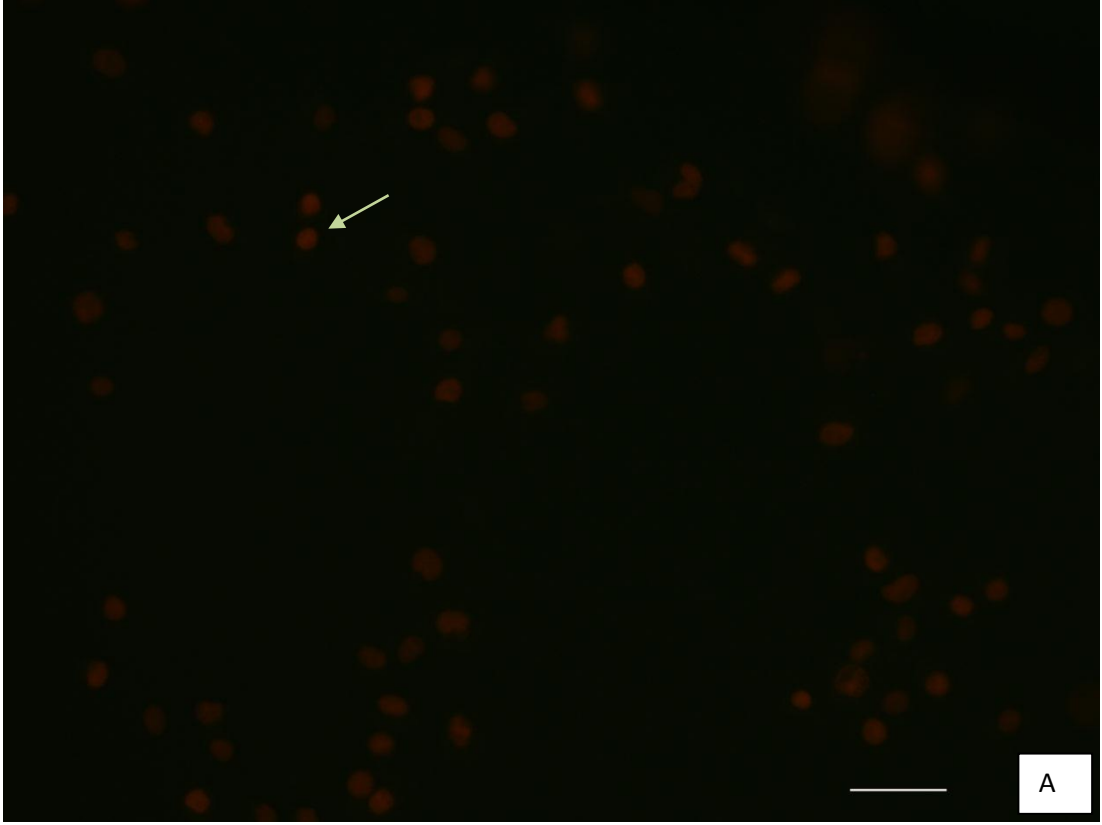
B)100 µg/ml *Alchemilla orduensis* uygulanan L929 fibroblast hücreleri

C)Kontrol grubu-Sadece medyum içeren L929 fibroblast hücresi

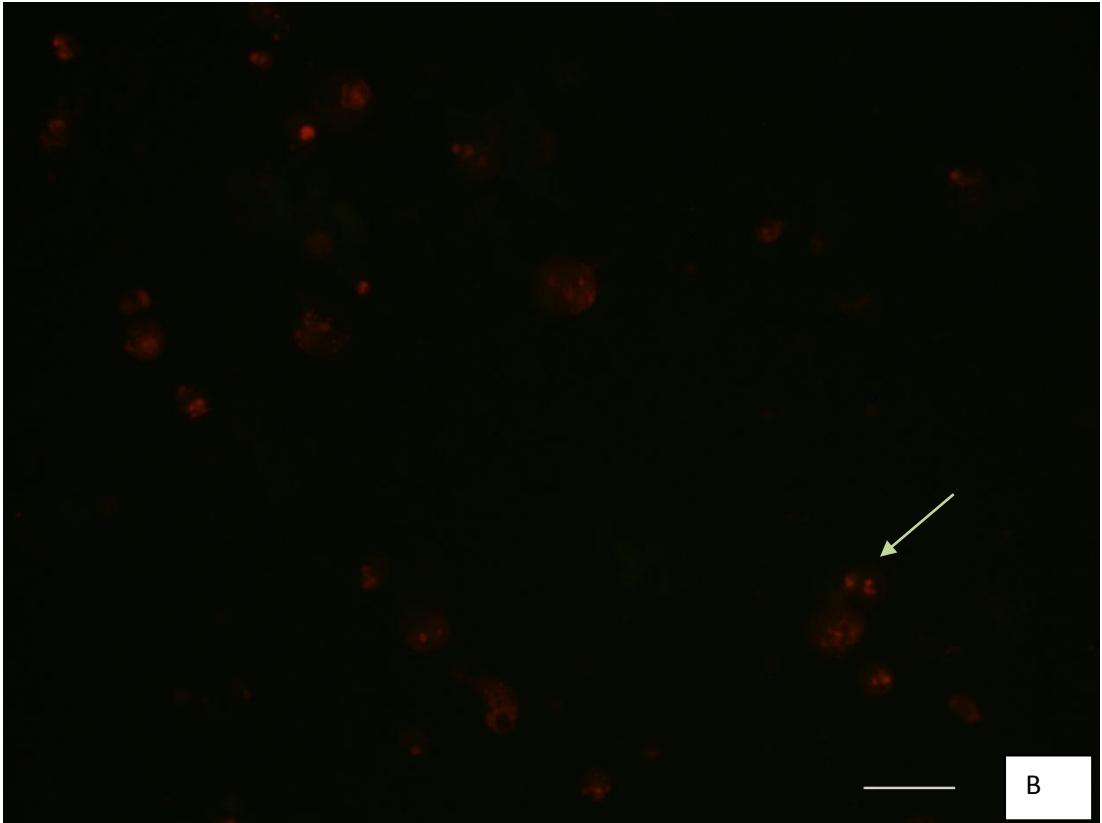
Çizelge 3.12.MCF7 hücrelerine ait nekrotik indeks sonuçları

Ekst.konst	<i>A.barbatiflora</i>	<i>A.orduensis</i>	<i>A.tiryalensis</i>	<i>A.speciosa</i>
Kontrol (medyum)	1±			
6.25µg/ml	5.5±0.707	2±0.707	2±	2±
12.5µg/ml	7±	3±	4±	7±1.414
25µg/ml	8.5±0.707	5±	7±	14±1.414
50µg/ml	10±	7.5±0.707	11±1.414	18.5±0.707
100µg/ml	14±1.414	10±	16.5±0.707	24±
200µg/ml	25±	20±	27±	30±

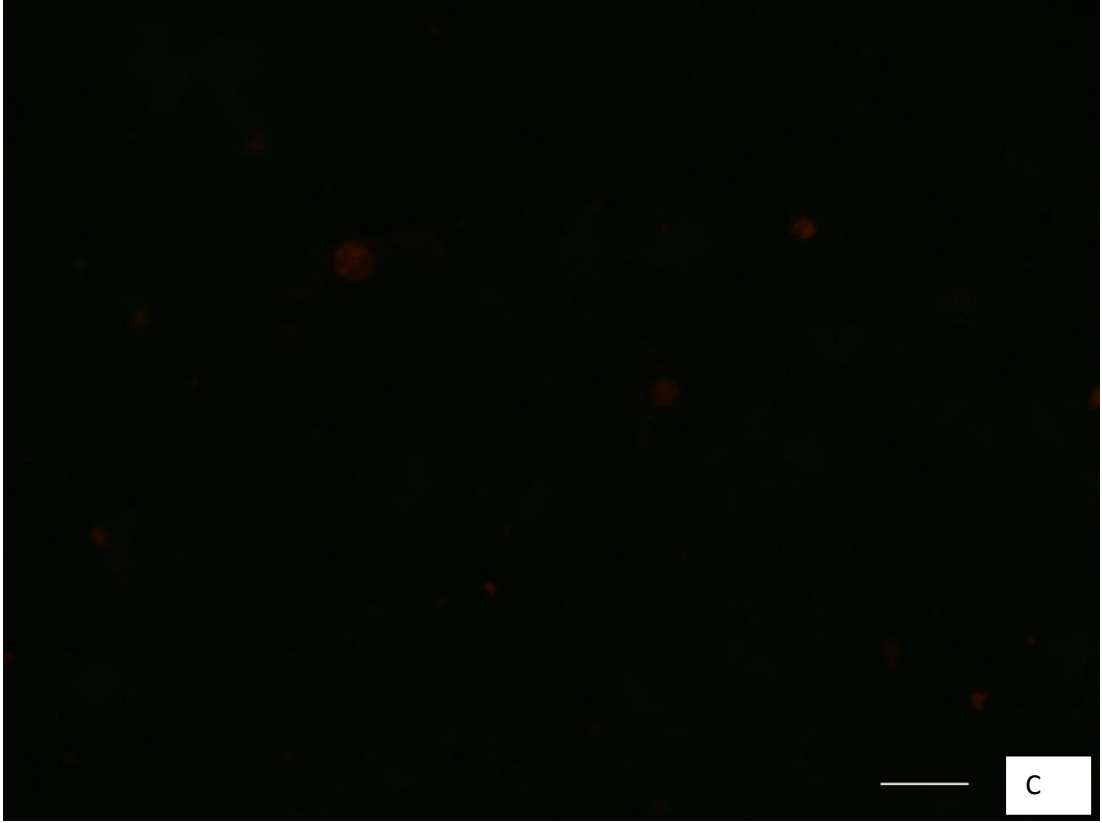
Çizelge 3.12.de verilen sonuçlara göre 200µg/ml konsantrasyonda MCF-7 kanser hücreleri üzerinde en fazla nekrotik etkiye sahip olan tür *Alchemilla speciosa* 'dır.100µg/ml ila 50µg/ml konsantrasyonlarda da *A.speciosa* 'nın nekrotik indeksi diğer türlere oranlar daha yüksektir.



Şekil3.6.A. 200µg/ml *Alchemilla speciosa*'nın uygulandığı MCF-7 kanser hücreleri



Şekil3.6.B. 100 µg/ml *Alchemilla tiryalensis*'in uygulandığı MCF-7 kanser hücreleri



Şekil 3.6. İkili boyama ile boyanmış nekrotik MCF-7 kanser hücreleri
(Bar=65µm-200X büyütmede Leica DM6000 Mikroskop ile görüntülenmiştir)

A)200µg/ml *Alchemilla speciosa*'nın uygulandığı MCF-7 kanser hücreleri

B)100 µg/ml *Alchemilla tiryalensis*'in uygulandığı MCF-7 kanser hücreleri

C)Kontrol grubu-sadece medyum içeren MCF-7 kanser hücresi

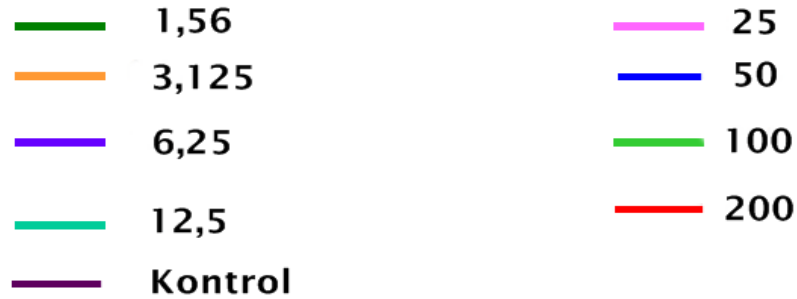
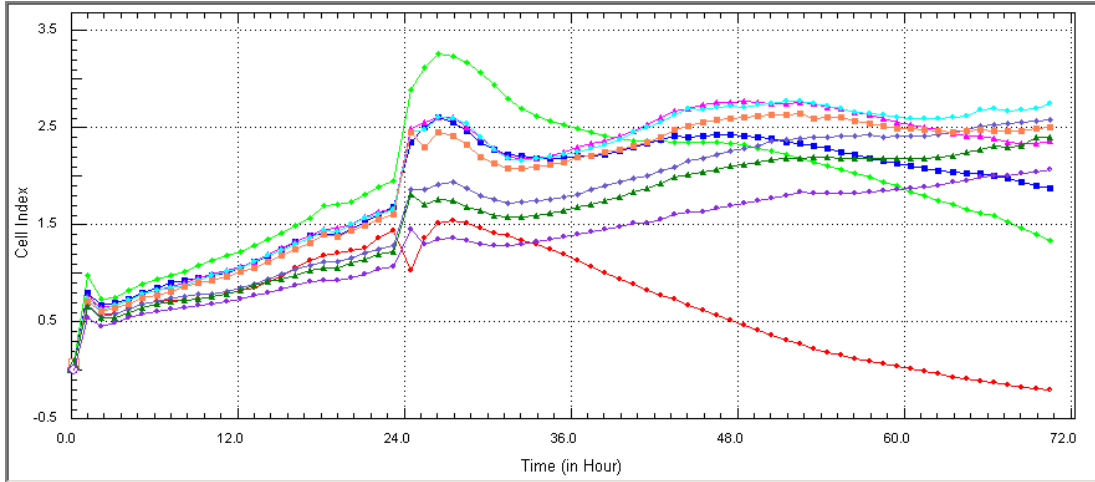
3.4.xCELLigence RTCA ile Hücre Proliferasyonunun belirlenmesi

3.4.1.Bitki Ekstraktlarının L929 Fibroblast Hücreleri Üzerindeki

Proliferasyonun Belirlenmesi

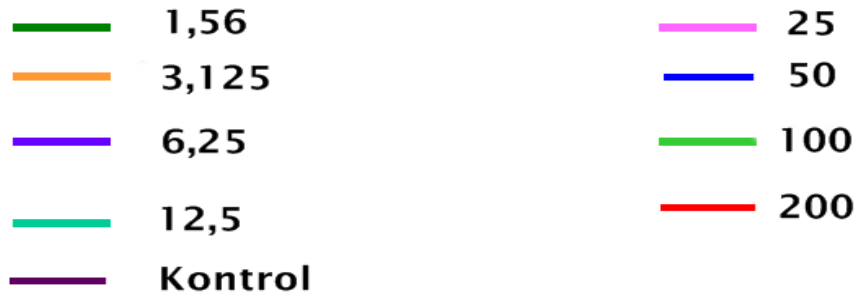
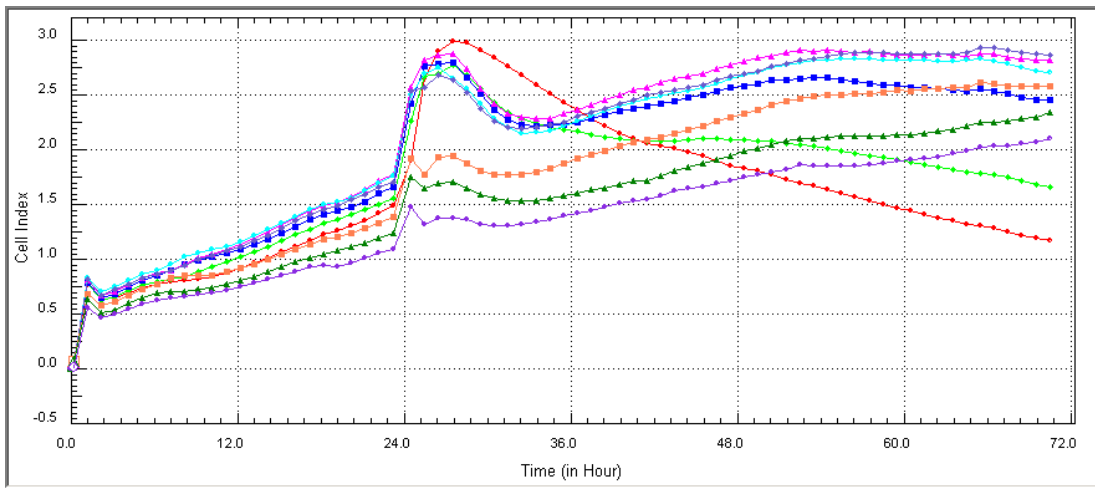
Elde edilen verilere göre L929 fibroblast hücrelerinin proliferasyon grafikleri Şekil 3.7.,3.8.,3.9. ve 3.10'da verilmiştir.

Grafige göre(Şekil 3.7.) hücreler eklendikten sonra ilk 24 saat hücreler sürekli olarak çoğalmaya devam etmiştir.200µg/ml konsanstrasyonda hücreler 26.saatten sonra ölmeye başlamış ve 72 saat sonunda proliferasyon tamamen durmuştur. 100µg/ml konsantrasyonda 28.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş, 28.saat sonunda proliferasyon düşmeye başlamıştır.72 saat sonunda proliferasyon tamam durmuştur.50µg/ml konsantrasyonda 54.saate kadar hücre sayısı artmaya devam etmiş,54.saat sonunda proliferasyon düşmeye başlamıştır.25µg/ml ve 12.5µg/ml konsantrasyonlarda 56.saate kadar hücre sayısı artmış,56.saatten sonra hücre sayısındaki düşüş olmuştur.Fakat 72 saat sonunda proliferasyon durmamıştır.6.25µg/ml, 3.125µg/ml,1.56µg/ml konsantrasyonlardaki proliferasyon değerleri 72.saate kadar aynı şekilde artmıştır.



Şekil 3.7. *Alchemilla barbatiflora* 'nın L929 fibroblast hücrelerindeki proliferasyonu

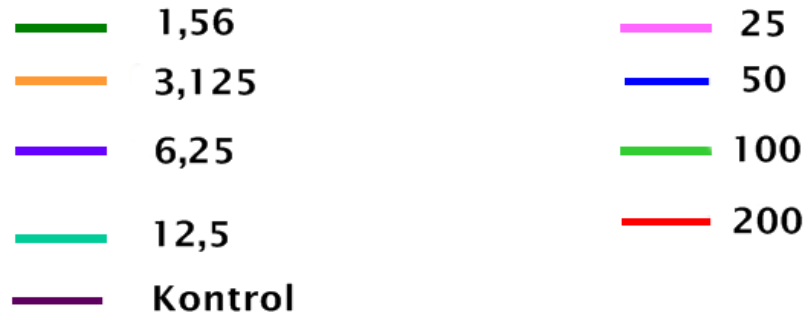
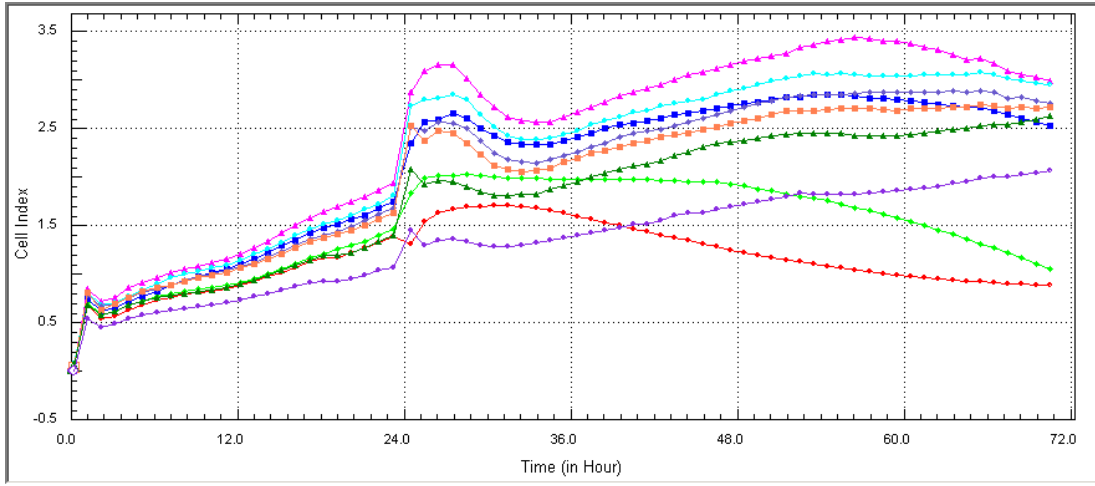
Grafige göre (Şekil 3.8.) 200µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonda 28.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş,28.saatten sonra proliferasyon düşmeye başlamıştır.50µg/ml dozda 28.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş, 30.saate kadar hücre sayısında düşüş olmuştur.32 -54.saatler arasında hücre sayısında artış gözlenmiştir. 54.saatten sonra proliferasyon azalmaya başlamıştır.25µg/ml, 12.5 µg/ml,6.25µg/ml, 3.125µg/ml ve 1.56µg/ml konsantrasyonlarda 30.saatte hücre sayısındaki düşüşten sonra proliferasyon artmaya devam etmiştir.



Şekil 3.8. *Alchemilla tiryalensis*'nin L929 fibroblast hücrelerindeki proliferasyonu

Grafige göre (Şekil 3.9.) 200µg/ml konsantrasyonda 30.saate kadar hücreler çoğalmış 30.saatten sonra hücre sayısı düşmeye başlamıştır.72.saat sonunda

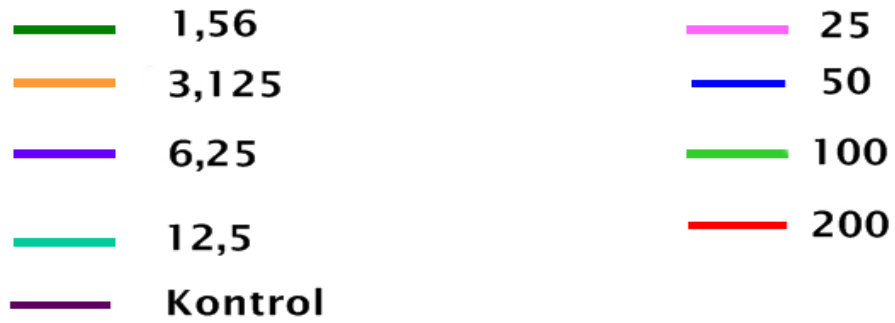
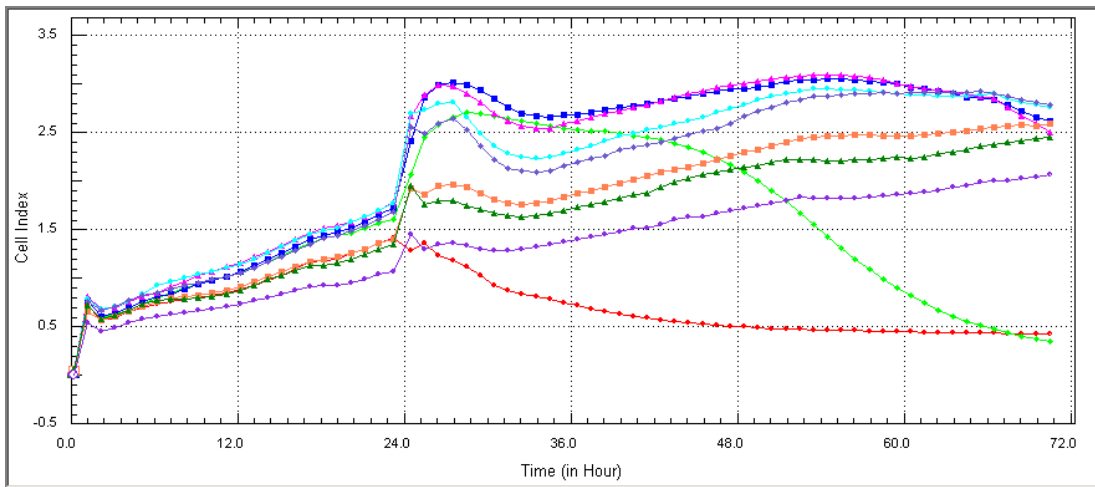
proliferasyon tamamiyle durmuştur.100µg/ml dozda hücre sayısı özellikle 48.saatten sonra azalmaya başlamış, fakat 72.saatte henüz proliferasyon tamamen durmamıştır. 50µg/ml konsantrasyonda 27.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş 28. İla 30.saatler arasında hücre sayısında azalma gözlenmiştir.30. İla 54.saatler arasında tekrar hücreler çoğalmaya başlamıştır.55.saatten itibaren 72 saate kadar proliferasyon düşmeye devam etmiştir.25µg/ml, 12.5µg/ml,6.25µg/ml,3.125µg/ml ve 1.56µg/ml konsantrasyonlarda 28.saate kadar hücre sayısında artış görülmüştür.28 İla 32.saatler arasında hücre sayısı azalmış ve tekrar artmaya devam etmiştir.56.saatten sonra proliferasyon azalmaya başlamıştır.



Şekil 3.9. *Alchemilla orduensis*'in L929 fibroblast hücrelerindeki proliferasyonu

Grafige göre (Şekil 3.10.) 200µg/ml ile 100µg/ml konsantrasyonlarda hücre sayısı 28.saatten itibaren azalmaya başlamış ve 72.saat sonunda

proliferasyon tamamen durmuştur.50µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda 26.saate kadar hücre sayısı artmış 26.-34.saatler arasında bir düşüş gözlenmiştir.34.-54.saatler arasında tekrardan hücre proliferasyonu artmıştır.54. ila 72.saatler arasında proliferasyon düşmüştür.12.5 µg/ml,6.25µg/ml,3.125µg/ml ve 1.56µg/ml konsantrasyonlarda 26.saatten 32.saate kadar hücre sayısı azalmıştır. 32.saatten 54.saate kadar 12.5µg/ml ve 6.25µ/ml dozdaki hücreler çoğalmaya devam etmiştir.54.saatten sonra proliferasyon azalmıştır. 3.125 ila 1.56µg/ml dozdaki hücreler ise 32.saatten 72.saate kadar çoğalmaya devam etmiştir.



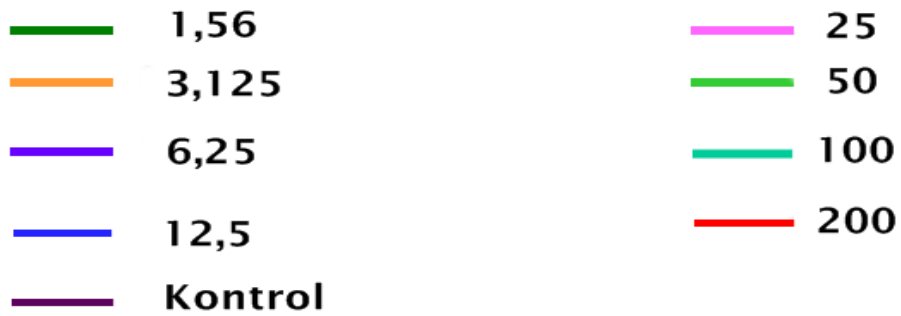
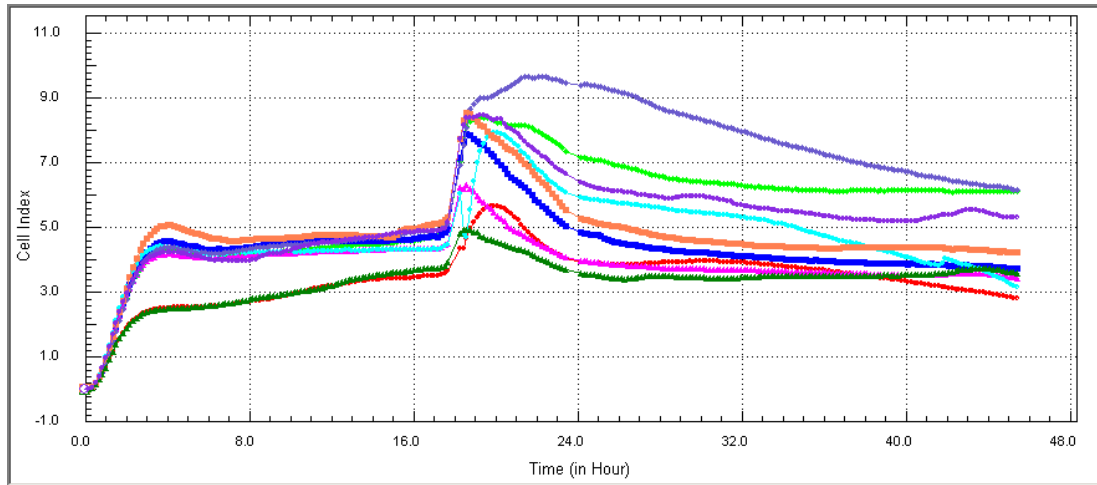
Şekil 3.10. *Alchemilla speciosa*'nın L929 fibroblast hücrelerindeki

proliferasyonu

3.4.2.Bitki Ekstraktlarının MCF7 Hücreleri Üzerindeki Proliferasyonunun Belirlenmesi

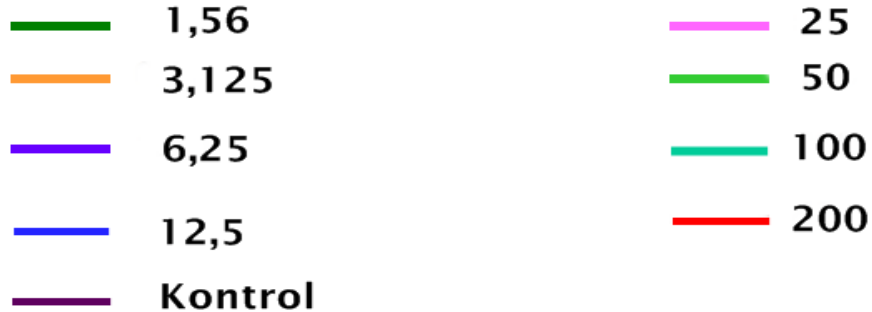
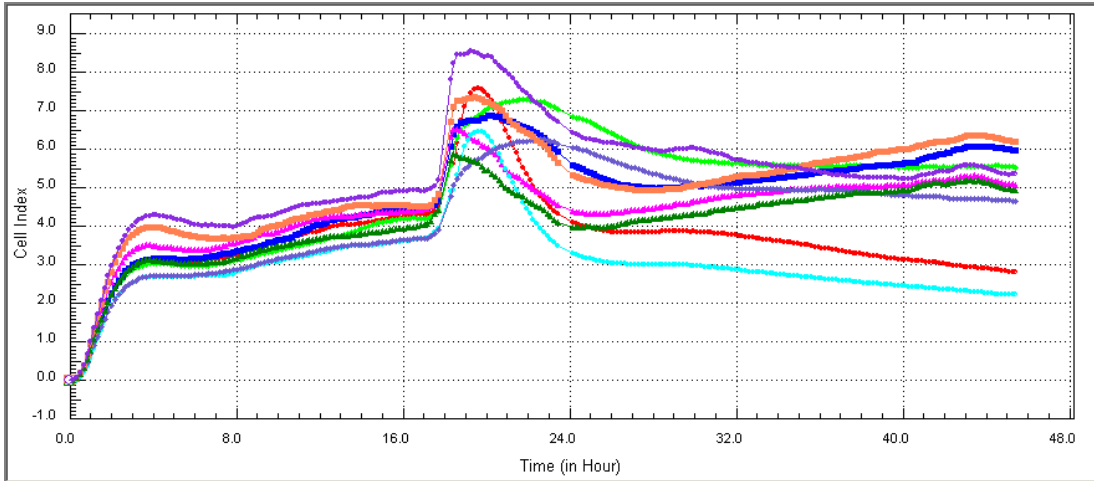
Elde edilen verilere göre Alchemilla barbatiflora,A.tiryalensis,A.orduensis, A.speciosa'nın MCF7 hücreleri üzerindeki proliferasyon grafikleri Şekil 3.11., 3.12., 3.13. ve 3.14. 'te gösterilmiştir.

Grafige göre (Şekil 3.11.) 200µg/ml ve 100µg/ml konsantrasyonlarda 18.- 20. saatler arasında hücreler çoğalmıştır.20.saatten sonra hücre sayısında düşüş gözlenmiş ve 48.saatte proliferasyon durmuştur.50µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda 20.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş,20.saatten sonra proliferasyonda sürekli bir düşüş gözlenmiştir. 12.5µg/ml,6.25µg/ml, 3.125µg/ml ve 1.56 µ/ml konsantrasyonlarda 20.saatten sonra proliferasyon azalmıştır.



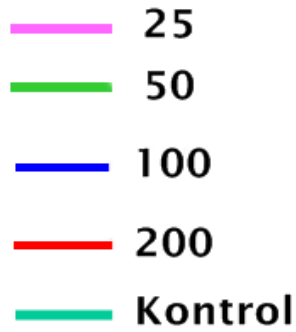
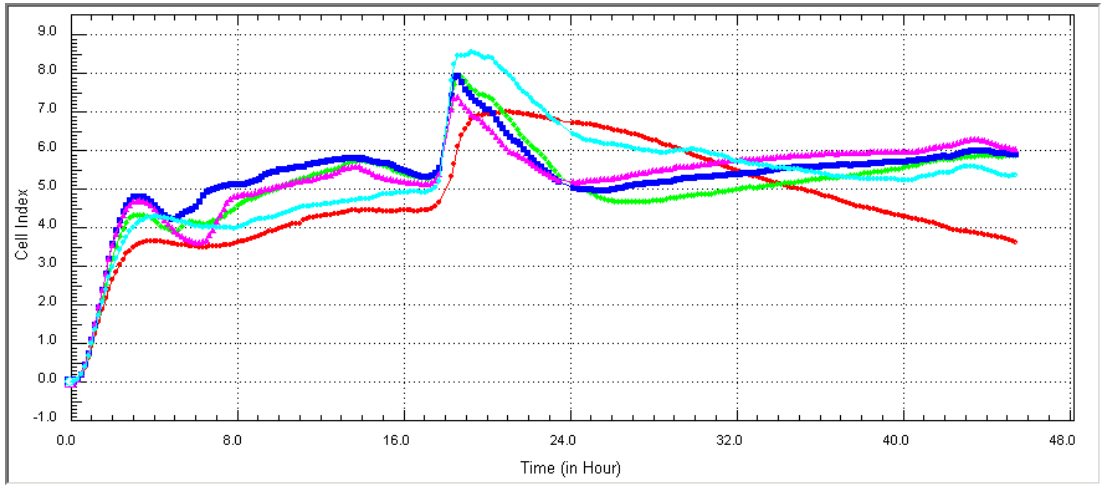
Şekil 3.11. *Alchemilla barbatiflora*'nın MCF-7 kanser hücrelerindeki proliferasyonu

Grafige göre (Şekil 3.12.) 200µg/ml konsantrasyonda 20.saate kadar hücre sayısı artmış,20.saatten sonra proliferasyonda düşüş gözlenmiştir.100µg/ml dozda 22.saat kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş,22.saatten sonra proliferasyon azalmaya başlamıştır.100 µg/ml konsantrasyonda 32.saat sonunda proliferasyon tamamiyle durmuştur.50µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda 20.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiştir.25.saate kadar hücre sayısı azalmıştır.25.saat sonunda proliferasyon tekrar artmaya başlamıştır.46.saat sonunda proliferasyon düşmeye başlamıştır.12.5µg/ml,6.25µg/ml,3.125µg/ml ve 1.56 µg/ml konsantrasyonlarda 25.saatte hücre sayısındaki artışın ardından,43.saatte proliferasyon düşmeye başlamıştır.



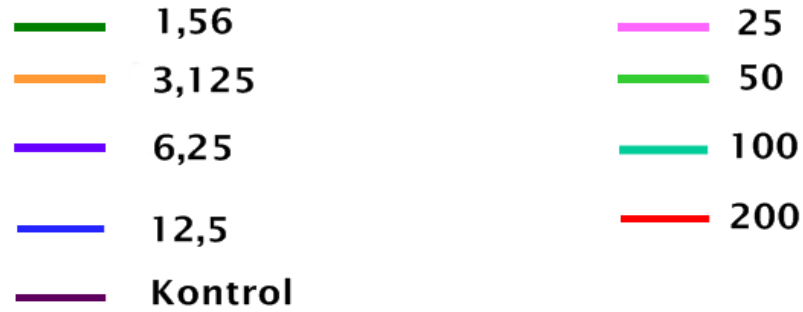
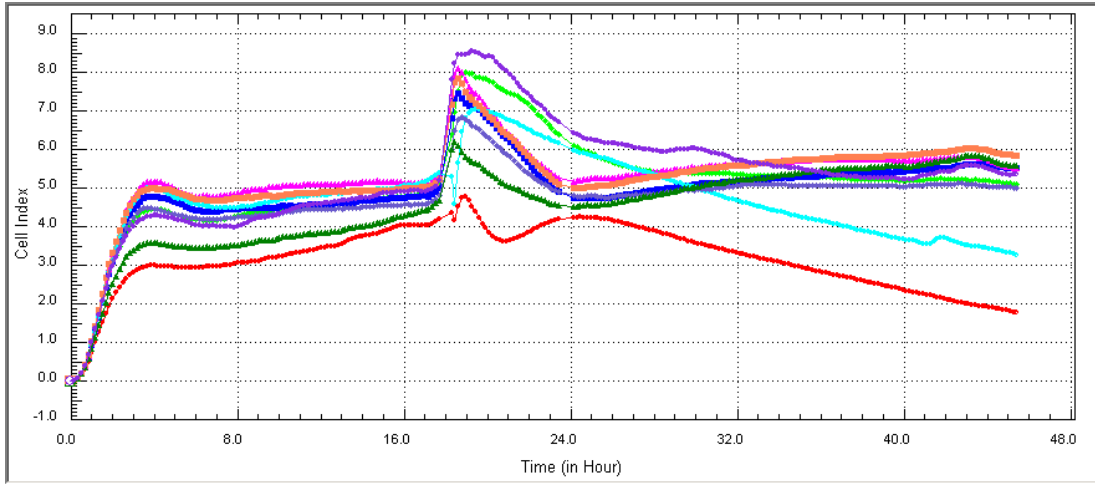
Şekil 3.12. *Alchemilla tiryalensis*'nin MCF-7 kanser hücrelerindeki proliferasyonu

Grafige göre (Şekil 3.13.)200µg/ml konsantrasyonda 20.saate kadar hücreler çoğalmaya devam etmiş,20.saatten sonra proliferasyon azalmıştır.100µg/ml,50 µg/ml ve 25 µg/ml dozda 20-25.saatler arasında hücre sayısı azalmış,25.saat sonunda tekrar artmaya başlamıştır.



Şekil.3.13. *Alchemilla orduensis*'nin MCF-7 kanser Hücrelerindeki Proliferasyonu

Grafige göre (Şekil 3.14.)200µg/ml konsantrasyonda 19 ila 21.saatler arasında hücre sayısı azalmıştır.21 ila 24.saatler arasında hücreler çoğalmaya başlamıştır.24.saatten sonra proliferasyon düşmeye başlamıştır.100µg/ml dozda 18.saatten sonra proliferasyon azalmaya başlamıştır ve 48.saat sonunda tamamen durmuştur.50µg/ml ve 25 µg/ml konsantrasyonlarda 18.saatten sonra proliferasyonda düşüş gözlenmiştir.24.saat sonunda hücrelerde hafif bir artış görülmüştür.48.saat sonunda proliferasyon tamamiyle durmuştur. 12.5µg/ml, 6.25µg/ml ,3.125µg/ml ve 1.56 µ/ml konsantrasyonlarda 18 ila 24.saatler arasında hücre sayısında düşüş gözlenmiştir.24.saatten sonra hücre sayısında az miktarda artış görülmüştür.



Şekil.3.14. *Alchemilla speciosa*'ın MCF7 hücrelerindeki proliferasyonu

4.TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada; bazı *Alchemilla* türlerinden elde edilen bitki ekstraktlarının mcf-7 kanser ve L929 fibroblast(normal) hücre hatlarındaki sitotoksik etkisi ile birlikte , apoptotik –nekrotik etkisi ve proliferasyon sonuçları incelenmiştir.

WST-1 metodu ile *Alchemilla barbatiflora*,*Alchemilla tiryalensis*, *Alchemilla orduensis* ve *Alchemilla speciosa* türlerinin L929 fibroblast ve MCF-7 hücrelerindeki toksisitesi araştırılmıştır.Elde edilen sonuçlara göre 200 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda L929 fibroblast hücreleri üzerinde en fazla toksik etkiye sahip olan tür *Alchemilla barbatiflora* olarak belirlenmiştir. *Alchemilla barbatiflora*'nın toksisitesi, *A.tiryalensis*,*A.orduensis*, *A.speciosa* türlerinin L929 fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitesinden yaklaşık olarak %5 daha fazladır. Aynı zamanda *A.barbatiflora*'nın en düşük doz olan 6.25 µg/ml'deki canlılık diğer ekstraktlara göre %5.6 daha yüksektir.

MCF-7 hücreleri üzerindeki toksisite incelendiğinde yüksek konsantrasyonda en toksik olan tür *Alchemilla tiryalensis*'tir. Dört türe ait ekstraktın MCF-7 hücrelerinde en düşük doz olan 6.25µg/ml 'de ortalama canlılık oranı %96.5 'tir. Bu sonuçlar L929 fibroblast hücrelerindeki toksisite ile karşılaştırıldığında 6.25 µg/ml konsantrasyonda L929 fibroblast hücrelerindeki canlılığın ortalama %90.8 olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre *A.barbatiflora*, *A.tiryalensis*, *A.orduensis*, *A.speciosa* türlerine ait ekstraktların MCF-7 hücrelerine oranla L929 fibroblast hücrelerinde daha toksik olduğu görülmüştür.

İkili boyama ile elde edilen apoptotik indeks sonuçlarına göre L929 fibroblast hücrelerinde en yüksek konsantrasyon olan 200µg/ml 'de en çok apoptoz görülen tür *Alchemilla barbatiflora*'dır. *A.tiryalensis*, *A.orduensis*, *A.speciosa* türlerinin 200 µg/ml dozdaki apoptoz oranları yaklaşık olarak aynıdır.25 µg/ml ila 6.25 µg/ml konsantrasyonlarda apoptoz oranı dört tür içinde düşüktür.

MCF-7 hücrelerindeki apoptotik indeks sonuçları incelendiğinde 200 µg/ml konsantrasyonda apoptozun en fazla görüldüğü tür *Alchemilla tiryalensis*'tir ve apoptotik indeksi %25±1'dir. *Alchemilla barbatiflora* 'da 200 µg/ml dozda %22±1 apoptotik indeks görülür. *Alchemilla orduensis* ve *Alchemilla speciosa* türlerinin 200µg/ml konsantrasyondaki apoptotik indeksleri ise *A.barbatiflora* ve *A.tiryalensis* türlerine göre düşüktür.

MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin apoptotik indekleri karşılaştırıldığında 200 µg/ml dozda *Alchemilla barbatiflora* MCF-7 hücrelerinde %22±1 iken,L929 fibroblast hücrelerinde %15±1 apoptoz oranı gözlenmiştir. *Alchemilla barbatiflora*'nın düşük konsantrasyonlarda MCF-7 hücreleri üzerinde apoptotik etkisi L929 'a oranla daha fazladır. 50µg/ml dozda L929 fibroblast hücrelerinde %7±1 apoptotik hücre var iken, MCF-7 hücrelerinde bu oran %12 ±1 'dir.

Alchemilla orduensis'in apoptotik indeksi incelendiğinde L929 fibroblast ve MCF-7 hücrelerinde apoptotik indeksin yakın değerlerde olduğu görülmektedir(Çizelge 3.9.,3.10.).

Alchemilla tiryalensis'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisine bakıldığında 200µg/ml konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinde %25±1 apoptoz görülürken L929 fibroblast hücrelerinde %11 ±1 'dir.100µg/ml dozda MCF-7 hücrelerinde apoptoz %20 ±1 iken L929 fibroblast hücrelerinde %9±1 'dir. (Çizelge 3.9.,3.10).Sonuç olarak MCF-7 hücrelerinde apoptozun fazla olmasının nedeninin *A.tiryalensis* 'te bulunan flavonoidlerin antikanserojen özelliklerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Alchemilla speciosa'ın MCF-7 ve L929 fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi incelendiğinde 200 µg/ml konsantrasyonda iki hücrede %10±1 oranında sahip olduğu görülmektedir.Daha düşük konsantrasyonlardaki indeksler incelendiğinde sonuçlar ±2 yaklaşık değerlerde olduğu görülmektedir(Çizelge 3.9.,3.10.).

İkili boyama metodu ile elde edilen nekrotik indeks sonuçlarına göre L929 fibroblast hücrelerinde 200 µg/ml dozda nekroz en fazla *Alchemilla barbatiflora* da görülmüştür. *A.orduensis*,*A.tiryalensis*, *A.speciosa* türlerinin

L929 fibroblast hücreleri üzerindeki nekrotik etkisi oranları yakın değerlerdedir(Çizelge 3.11.). *Alchemilla barbatiflora*'nın 25 µg/ml ila 6.25 µg/ml konsantrasyonlardaki nekrotik indeksi *A.orduensis*,*A.tiryalensis*,*A.speciosa* türlerinden düşüktür.L929 fibroblast hücresi için en toksik türün *Alchemilla barbatiflora* olduğunu söylenebilir.

MCF-7 hücrelerinin nekrotik indeks çizelgesi incelendiğinde,MCF-7 hücreleri üzerinde en fazla nekrotik etkiye sahip olan tür *Alchemilla speciosa* 'dır.200µg/ml dozda %30 ±1 nekrotik hücre vardır.200 µg/ml dozda *Alchemilla tiryalensis* %27±1 ,*Alchemilla barbatiflora* %25 ±1, *Alchemilla orduensis* %20±1 nekrotik hücre görülmüştür. *A.tiryalensis*, *A.barbatiflora*, *A.orduensis* türlerinin 50µg/ml ila 6.25 µg/ml dozdaki nekrotik etkileri yaklaşık olarak aynıdır.

L929 fibroblast ve MCF-7 hücrelerinin nekrotik indeksleri karşılaştırıldığında *Alchemilla barbatiflora*'nın L929 fibroblast üzerinde nekrotik indeksin fazla olduğu 200µg/ml dozda MCF-7 hücrelerinde aynı nekrotik etkinin görülmediği Çizelge 3.11. ve Çizelge 3.12. de gösterilmiştir. Aynı şekilde *Alchemilla speciosa*'nın MCF-7 hücresi üzerinde nekrotik indeksinin fazla olduğu 200 µg/ml dozda L929 fibroblast hücrelerinde aynı etkiyi göstermediği görülmüştür.

MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin proliferasyon sonuçları incelendiğinde; *Alchemilla barbatiflora* uygulanan MCF-7 hücrelerinde 200µg/ml dozda 20.saatten sonra proliferasyonun düşmeye başladığı ve 48.saatte tamamiyle durduğu görülmüştür.L929 fibroblast hücrelerinde ise 26.saatten sonra hücrelerin ölmeye başladığı ve 72.saatten proliferasyonu tamamiyle durdurduğu gözlenmiştir.100 µg/ml dozda ise MCF-7 hücrelerinin 20.saatten sonra ölmeye başladığı ve 48.saatte proliferasyonun tamamiyle durduğu görülmüştür.L929 fibroblast hücrelerinde ise 100µg /ml dozda L929 fibroblast hücrelerinin 28.saate kadar çoğaldığı,28.saatten sonra ise proliferasyonun azaldığı görülmüştür.(Şekil 3.7.,3.11.)

Alchemilla tiryalensis uygulanan MCF-7 hücrelerinde 200 µg/ml dozda 20.saatten sonra hücre sayısının azalmaya başladığı,32.saatten sonra ise

hızlı bir şekilde proliferasyonun düştüğü gözlenmiştir.100µg/ml konsantrasyonda 32.saatte proliferasyonun tamamen durduğu görülmüştür.(Şekil 3.12.)L929 fibroblast hücrelerinde ise 200 µg/ml ila 100µg/ml konsantrasyonlarda 28.saatten sonra hücre sayısında düşüş görülmüştür.(Şekil 3.8.)

Alchemilla orduensis uygulanan MCF-7 hücrelerinde 200µg/ml konsantrasyonda 20.saatten sonra hücre sayısından düşüş görülmüştür.100 µg/ml ila 50 µg/ml dozlarda 20 ila 25.saatler arasında proliferasyon azalmış,25.saatten sonra tekrar çoğalmaya devam etmiştir.(Şekil 3.13.) L929 fibroblast hücrelerinde ise 200µg/ml dozda 28.saatten sonra hücre sayısı düşmeye başlamıştır.100µg/ml de ise 48.saatten sonra proliferasyon azalmıştır(Şekil 3.9.).

Alchemilla speciosa uygulanan MCF-7 hücrelerinde 200µg/ml dozda 24.saatten sonra proliferasyon düşmüştür.100µg/ml'de ise 18.saatte hücre sayısı azalmış 48.saatte proliferasyon tamamiyle durmuştur(Şekil 3.14.).L929 fibroblast hücrelerinde 200 µg/ml ila 100µg/ml konsantrasyonlarda 28.saatten sonra proliferasyon düşmeye başlamış 72.saat sonunda tamamen durmuştur.L929 fibroblast hücrelerinde en düşük konsantrasyonlar olan 3.125 µg/ml ila 1.56 µg/ml de 32-72.saatler arasında hücreler çoğalmaya devam etmiştir(Şekil 3.10.).

Sunulan bu çalışma ile *A. barbatiflora*,*A. tiryalensis*,*A. orduensis* ve *A. speciosa* türlerinin yüksek konsantrasyonlarda L929 fibroblast hücreleri üzerinde toksisitesinin MCF-7 hücrelerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ekstraktların toksik olduğu dozlarda nekrotik indeksin fazla olduğu görülmüştür. Sonuçların güvenilirliği açısından yapılan xCELLigence RTCA daki datalar WST-1 ikili boyama sonuçlarını desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Konishi, M., Tabata, Y., Kariya, M., Suzuki, A., Mandai, M., Nanbu, K., Takakura, K., Fujii, S., In vivo anti-tümör effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J. Control Release* 92(3): 301–313, 2003.
- [2] Wei D., Mei Y & Liu J. (2003). Quantification of doxorubicin and validation of reversal effect of tea polyphenols on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Biotechnology Letters*. 25:291-294
- [3] Boumendjel A., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Perrotton T., Di Pietro A. (2005) Anticancer Multidrug Resistance Mediated by MRP1: Recent Advances in the Discovery of Reversal Agents. *Medicinal Research Reviews*. Vol 25(4):453-472
- [4] Duraj J., Zazrivcova K., Bodo J., Sulikova M., Sedlak J. (2005). Flavonoid quercetin, but not apigenin or luteolin, induced apoptosis in human myeloid leukemia cells and their resistant variants. *Neoplasma*. 52:4;273-279
- [5] Wang W., Higuchi C.M. and Zhang R. (1997). Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. *Nutr Cancer*. 29:29-34
- [6] Wong I.L.K., Chan K.F., Burkett A.B., Zhao Y., Chai Y., Sun H., Chan T.H. and Chow I.M.C. (2007) Flavonoid Dimers as Bivalent Modulators for Pentamidine and Sodium Stigolucanate Resistance in Leishmania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol: 51(3):930-940
- [7] Nissler L., Gebhardt R., Berger S. (2004) Flavonoid binding to a multi-drug resistance transporter protein: an STD-NMR study. *Anal Bioanal Chem*, 379:1045-1049
- [8] Kitagawa S. (2006). Inhibitory Effects of Polyphenols on P-Glycoprotein-Mediated Transport. *Biol. Pharm. Bull.* 29(1):1-6
- [9] Critchfield J.W., Welsh C.J., Phang J.M. and Yeh G.C. (1994) Modulation of adriamycin in accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells

- Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 48:1437-1445
- [10] Scambia G., Ranelletti F.O., Panici P.B., De Vincenzo R., Bonanno G., Ferrandina G. et al. (1994) Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug resistant MCF-7: P-Glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34:459-464
- [11] Chieli E., Romiti N., Cervelli F. And Tongiani R. (1995). Effects of flavonols on P-glycoprotein activity in cultured rat hepatocytes. *Life Sci.* 57:1741-1751
- [12] Castro A.F. and Altenberg G.A. (1997). Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 53:89-93
- [13] Van Zanden J.J., Wortelboer H.M., Bijlsma S., Punt A., Usta M., Bladeren P.J., Rietjens I.M., Cnubben N.H., Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem. Pharmacol.* 69: 699 – 708, 2005.
- [14] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık. 8. Basım. Ankara, 2009.
- [15] Jones, A., Harris, A.L., New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumour growth and target for therapy. *Cancer J. Sci. Am.* 4(4): 209–217, 1998.
- [16] Engelson, I.B., Stefansson, I.M., Beroukhim, R., Sellers, W.R., Meyerson, M., Akslen, L.A., Salvesen, H.B., HER-2/neu expression is associated with high tumour cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. *Int J Oncol.* 32 (2): 307-316, 2008.
- [17] Massagué, J., G1 cell-cycle control and cancer. *Nature.* 432, 298-306, 2004.
- [18] Valenzuela, M.T., Mateos, S., Ruiz de Almodovar, J.M., McMillan, T.J., Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after gamma-irradiation. *Radiother. Oncol.* 54(3): 261 – 271, 2000.

- [19] <http://www.medinfo.hacettepe.edu.tr/ders/TR/D3/2/5152.doc> (Eriřim tarihi: 06.11.2009)
- [20] Kktrk, N., Kırışoğlu, C.E., ztrk, C., Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum* 5(3): 127-138, 2003.
- [21] Roth, JA., Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 12(2): 3-15, 1995.
- [22] McCormick F., Signalling Networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 12:53 – 56, 1999.
- [23] Ekmekçi, A., Konaç, E., nen İ.H., Gen polimorfizm ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 21(3): 282-295, 2008.
- [24] Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57 – 70,2000.
- [25] Blume-Jensen, P., Hunter, T., Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411, 355 – 364, 2001.
- [26] Dođan, A. L., Gç, D., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 35: 34 – 42, 2004.
- [27] Jain, R.K., Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1): 149 – 168, 2001.
- [28] B. Aslan, Teragnoz amaçlı fonksiyonel özelliklere sahip polimerik nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2009.
- [29] Tagliaferri, P., Caraglia, M., Budillon, A., Marra, M., Vitale, G., Viscomi, C., Masciari, S., Tassone, P., Abbruzzese, A., Venuta, S., *Cancer Immunology Immunotherapy* 54 (1): 1–10, 2005.
- [30] Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M., Anichini, A., *Cancer Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved Where Are We Going* *J.N.C.I.J. Natl. Cancer Inst.* 94(11): 805–818, 2002.
- [31] Arslan, ., Vural, H., Kömürcü, G., zet, A., *Kemoterapi Alan Kanser*

Hastalarına Verilen Eđitimin Kemoterapi Semptomlarına Etkisi.

C.Ü.Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 10(1): 15-28, 2006.

- [32] Kayaalp, O., Tıbbi Farmakoloji, Cilt: 1, s.372, 378-380, 384-400, Feryal Matbaacılık, Ankara, 2000
- [33] M. Uluđ, quercetin ve quercetin/polietilenimin kompleksinin HeLa ve fibroblast hüccresine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2010.
- [34] D.Gürel, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi uygulanan hastaların yaşam kalitesi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. Hemşirelik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [35] S.Arslan, Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 2000.
- [36] Berberođlu, U., Aydın A., Onat, H., Gastrointestinal komplikasyonlar. s.759-776, Logos Yayıncılık, Onkoloji el kitabı, İstanbul, 2006.
- [37] Yavuzşen, T., Kömürcü, G., Kanser hastalarında halsizlik semptomunun değerlendirilmesi ve birlikte görülen klinik problemler. Gülhane Tıp Dergisi 50(2): 141-146, 2008.
- [38] Ünsar, S., Fındık, Ü., Kurt, S., Özcan, H., Kanserli Hastalarda Evde Bakım ve Semptom Kontrolü. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi 2(5): 89-106, 2007.
- [39] Ertem, G., Kanser hastalarında beslenme ve hemşirelik yaklaşımı. Dirim Tıp Gazetesi 83: 56-63, 2008.
- [40] McPherson K, Steel C, Dixon JM. Breast cancer -Epidemiology, risk factors, and genetics. British Medical Journal 2000; 321: 624–628.
- [41] Uzun Ö, Eti Aslan F, Selimen D, Koç M. Quality of life in women with breast cancer in Turkey. Journal of Nursing Scholarship 2004;36(3):207–2
- [42] Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in Izmir in 1993–1994: first

- results from Izmir cancer registry. *Eur J Cancer* 2001; 37:83–92.
- [43] Berkey C.S., Frazier A.L., Gardner J.D. and Colditz G.A Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer* , 1999;85: 2400-9.
- [44] Apter D., Reinila M. and Vihko R. Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. 1989; 44: 783-7.
- [45] Bernstein L., Henderson B.E., Hanisch R., Sullivan-Halley J. and Ross R.K. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst.*1994;86:1403-8.
- [46] Kelsey J.L., Gammon M.D. and John E.M. Reproductive factors and breast cancer *Epidemiology Rev*, 1993; 15: 36-47.
- [47] Henderson B.E., Ross R.K., Judd H.L., Krailo M.D. and Pike M.C Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*;1985: 56, 1206-8.
- [48] Chie W.C., Hsieh C., Newcomb P.A., Longnecker M.P., Mittendorf R.,Greenberg E.R., Clapp R.W., Burke K.P., Titus-Ernstoff L., Trentham-Dietz A. and MacMahon B. Age at any full-term pregnancy and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*; 2000:151, 715-22.
- [49] Pathak D.R., Osuch J.R. and He J. Breast carcinoma etiology:current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer*;2000: 88, 1230-8.
- [50] Russo J., Hu Y.F., Yang X. and Russo I.H. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 2000: 27 17-37
- [51] Unger M.A. and Weber B.L Recent advances in breast cancer biology.*Curr Opin Oncol*;2000: 12, 521-5.
- [52] Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P.,Bishop D.T., Weber B., Lenoir G., Chang-Claude J., Sobol H., Teare M.D.,Struewing J., Arason A.,Scherneck S., Peto J., Rebbeck T.R., Tonin

- P., Neuhausen S., Barkardottir R., Eyfjord J., Lynch H., Ponder B.A., Gayther S.A., Zelada-Hedman M. et al. Genetic heterogeneity and Penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*; 1998: 62, 676-89
- [53] John E.M. and Kelsey J.L. (1993) Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev*;1993:15, 157-62.
- [54] McCormick B. Radiation and local control in early invasive breast cancer. *The breast Journal*;1999: 5, 330-4.
- [55] Weiderpass E., Pukkala E., Kauppinen T., Mutanen P., Paakkulainen H., Vasama- Neuvonen K., Boffetta P. and Partanen T. Breast cancer and occupational exposures in women in Finland. *Am J Ind Med*: 1999; 36, 48-53
- [56] Sugimura, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*; 2000: 21,387-95
- [57] Hunter D.J. and Willett W.C. Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev*; 1993: 15, 110-32
- [58] Kuper H., Ye W., Weiderpass E., Ekblom A., Trichopoulos D., Nyren O. and Adami H.O. Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox. *Br J Cancer*; 2000: 83, 949-51.
- [59] Palmer J.R. and Rosenberg L. Cigarette smoking and the risk of breast cancer. *Epidemiol Rev*;1993:15, 145-56.
- [60] Ambrosone, C.B. and Shields P.G. Smoking as a risk factor for breast cancer In Bowcock, A.M. (ed.) *Breast cancer: molecular genetics, Pathogenesis, and Therapeutics*. Human Pres Inc., Totowa New Jersey, pp. 1999; 519,36
- [61] Hu YF, Russo IH, Russo J. Prevention of human breast cancer. *J Women's Cancer*. In press 2000
- [62] Easton D., Ford D. and Peto J. Inherited susceptibility to breast cancer.

- Cancer Sur; 1993: 83, 95-113.
- [63] Oesterreich S. and Fuqua S.A. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*; 1999: 6, 405-19.
- [64] Cui J. and Hopper J.L. Why are the majority of hereditary cases of early-onset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2000:9, 805-12
- [65] Kainu T., Juo S.H., Desper R., Schaffer A.A., Gillanders E., Rozenblum E., Freas- Lutz D., Weaver D., Stephan D., Bailey-Wilson J., Kallioniemi O.P., Tirkkonen M., Syrjakoski K., Kuukasjarvi T., Koivisto P., Karhu R., Holli K., Arason A., Johannesdottir G., Bergthorsson J.T., Johannsdottir H., Egilsson V., Barkardottir R.B., Johannsson O., Haraldsson K., Sandberg T., Holmberg E., Gronberg H., Olsson H., Borg A., Vehmanen P., Eerola H., Heikkila P., Pyrhonen S. and Nevanlinna H. Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2000: 97, 9603-8
- [66] Rebbeck, T.R Inherited genetic predisposition in breast cancer.A population-based perspective. *Cancer*; 1999: 83, 2493-501
- [67] Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941-53
- [68] Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001;2:33-42
- [69] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:121-39
- [70] Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, et al. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997;72:608-13
- [71] Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:257-69

- [72] Gandhi A, Holland PA, Knox WF, Potten CS, Bundred NJ. Evidence of significant apoptosis in poorly differentiated ductal carcinoma in situ of the breast. *Br J Cancer* 1998;78:788-94.
- [73] Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjanen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer* 1994;14:2068-73
- [74] Allan DJ, Howell A, Roberts SA, Williams GT, Watson RJ, Coyne JD, et Al. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal Epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *J Pathol* 1992;167:25-32
- [75] Mommers EC, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijer CJ, Baak JP. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1999;58:163-9.
- [76] Rudin CM and Thompson C.B.: Apoptosis ana disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev. Med*; 1997: 48, 267-281
- [77] Ashkenazi, A. And Dixit, V.M. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*; 1998: 281, 1305-1308.
- [78] Gren, D.R. and Reed , J.C., Mitochondria and apoptosis. *Science*; 1998. 281:1309- 1312
- [79] Widlak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim.Pol.*; 2000; 47(4), 1037–1044
- [80] V. H. Heywood, *Flowering plants of the World*, Oxford University Pres., Oxford,London, Melbourne, 1978.
- [81] R. Izmailow, *Acta. Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 23, 117-130(1981).
- [82] I. Hughes, *The Pharmageddon Herbal*, New Zealand, 2005.
- [83] S. Fröhner, *Flora Iberica. Plantas Vasculares de la Peninsula Iberica e Isles Baleares*, Consejo superior de investigaciones científicas, Madrid,

1995.

- [84] B. Pawlowski ve S.M. Walters, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 1972.
- [85] W. Rothmaler, Feddes Repert., 42, 146-173(1937).
- [86] W. Rothmaler, Feddes Repert., 50, 245-255(1941).
- [87] S.M. Walters ve B. Pawlowski, Flora Europaea, Cambridge Univ. Pres. Cambridge, 1968.
- [88] S. Fröhner, Flora Iranica, Akad Druck-u Verlangsat, Graz, 1969.
- [89] C.C. Townsend ve E. Guest, Flora of Iraq, Ministry of Agriculture, Republic of Iraq, Baghdad, 1966.
- [90] S. W. Juzepczuk, Flora of the SSSR, Izd. Akad. Nauk. SSSR., Moskva-Leningrad, 1971.
- [91] A. A. Grossheim, Flora Kavkaza, Izdatelctvo, Akademi Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, 1952.
- [92] P. H. Davis, R. R. Mill ve K. Tan, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 1988.
- [93] H. Kalheber, Sendtnera, 2, 389-430(1994).
- [94] S. Hayırlıoğlu ve O. Beyazođlu, Turk J. Bot., 21, 309-312. 1997.
- [95] Y. Menemen ve E. Hamzaoglu, Annal. Botan. Fennici, 39, 231–234(2002).
- [96] Y. Menemen ve E., Hamzaoglu Nord. J. Bot., 22 (3), 325-328(2002).
- [97] S. Hayırlıoğlu ve H. Kalheber, Sendtnera, 59-76(2002).
- [98] A. Lundh-Almestrand, Bot. Not., 3,587-607(1958).
- [99] S. Murbeck, Parthenogenetische Embryobildung in der Gattung *Alchemilla*, Lunds Univ. Arsskr., Lund, 1901.

- [100] E. Strasburger, *Jahr. F. Wiss. Bot.*, 41, 88-164(1905).
- [101] Z. M. Rubtsova, *Evolyutsionnoe znachenie apomiksisa (Evolutionary significance of apomixis)*. Nauka, Leningrad, 1989
- [102] A.M., Koltunov, *The Plant Cell* 5, 1425-1437(1994).
- [103] K.P., Glazunova, *Otd. Biol.*, 82, 129-139(1977).
- [104] K.P., Glazunova, *Biol. Nauki*, 7,9-83(1983).
- [105] K.P. Glazunova, *Otd. Biol.*, 92, 96-109(1987).
- [106] R. Izmailow, *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 23, 117-130(1981).
- [107] R. Izmailow, *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 24, 127-141(1982).
- [108] R. Izmailow, *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 28, 39-63(1986).
- [109] R. Izmailow, *Pol. Bot. Stud.*, 8,61-67(1994).
- [110] R. Izmailow, *Acta Biol. Cracov., Ser. Bot.*, 36, 61-67(1994).
- [111] G. Turesson, *Bot. Not.*, 110, 413-422(1957).
- [112] A. Löve ve D. Löve, *Op. Bot.*, 5,1-581(1961).
- [113] S. Hayırlıoğlu-Ayaz ve O. Beyazođlu, *Wildenowia*, 27, 191-194(1997).
- [114] S. Hayırlıoğlu-Ayaz ve O. Beyazođlu, *Caryologica*, 50,77-84(1997).
- [115] S. Hayırlıoğlu-Ayaz ve Beyazođlu, O., *Turkish Journal of Botany*, 21:385-389(1997).
- [116] S. Hayırlıoğlu-Ayaz ve O. Beyazođlu, *Nordic Journal of Botany*, 21(4), 419-425(2001).
- [117] M. E. Bradshaw, *Watsonia*, 5, 304-326(1963).
- [118] K.A. Wegener, *Biol. Zentralbl.*, 86, 771-792(1967).
- [119] V. Baeva, V. K. Bobrova, A. V. Troitskii ve A. S. Antonov, *Farmatsiya*,1997.

- [120] W. Rothmaler, Feddes Repert., 38, 33-43(1935).
- [121] W. Rothmaler, Svensk Bot. Tidskr., 38, 102-112(1944).
- [122] B.Kaya, *Alchemilla l.(Rosaceae)* türlerinde flavonoid bileşiklerinin tayin edilmesi ve bu bileşiklerin taksonomik olarak kullanılması.Doktora Tezi.KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ,KASIM 2009
- [123] R. Buser, Bot. Ges., 4, 41-80(1894).
- [124] S.Fröhner, Illustrierte Flora von itteleuropa, Aufl. Blackwell Wiss.–Verl., Berlin-Wien, 1995.
- [125] G. Turesson, Bot. Not., 413-427(1943).
- [126] G. Turesson, Bot. Not., 109,400-404(1956).
- [127] A. Löve, Feddes Repert. 63,136-148(1960).
- [128] A. Plocek, Preslia, 53,5-53(1982).
- [129] B. Sener ve G. Toker, Mar. Üniv.Ecz. Der., 2(2)169-183(1986).
- [130] E. Grotewold, Annu. Rev. Plant Biol., 57, 761–78(2006).
- [131] B. Winkel-Shirley, Curr. Opin. Plant Biol., 5, 218–223(2002).
- [132] L. Lepiniec, Annu. Rev. Plant Biol., 57, 405–430(2006).
- [133] R. A. Dixon, New Phytol., 165, 9–28 (2005).
- [134] B. S. J. Winkel-Shirley, The Science of Flavonoids, Springer, New York, 2006.
- [135] J. M. Routaboul , I. Kerhoas Debeaujon , L. Pourcel , M. Caboche , J. Einhorn , L. Lepiniec, Planta, 224(1), 96–107(2006).
- [136] K.E. Schwinn ve K.M. Davies, Plant Pigmentsand their Manipulation, Wiley-Blackwell, USA, 2004.
- [137] M. A. Marles, H. Ray ve M. Y. Gruber, Phytochem. 64, 367–383(2003).

- [138] D. Treutter, *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–150(2006).
- [139] C. Santos-Buelga ve A. J. Scalbert, *Sci. Food Agric.*, 80, 1094–1117(2000).
- [140] R.J. Williams, J.P. Spencer ve C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, 36,838–849(2004).
- [141] L.P. Taylor ve E. Grotewold, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8,317-323(2005).
- [142] J. B. Harborne, C.A. Williams, *Phytochem.* 55,481-504(2000).

