

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENDEMİK *CENTAUREA FENZLII* REICHARDT BİTKİSİNİN MCF-7 MEME
KANSERİ HÜCRE DİZİLERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK,
NEKROTİK ETKİSİ

Ümit YIRTICI

HAZİRAN 2012

Biyoloji Anabilim Dalında Ümit YIRTICI tarafından hazırlanan ENDEMİK *CENTAUREA FENZLII* REICHARDT BİTKİSİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİLERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK, NEKROTİK ETKİSİ adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Doktora Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Doç. Dr. Bülent İÇGEN
Ortak Danışman

Prof. Dr. Aysun ERGENE
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Neşe KIRIMER
Üye (Danışman) : Prof. Dr. Aysun ERGENE
Üye : Prof. Dr. Engin ULUKAYA
Üye (Ortak Danışman) : Doç. Dr. Bülent İÇGEN
Üye : Doç. Dr. Sema TAN

15/06/2012

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

ENDEMİK *CENTAUREA FENZLII* REICHARDT BİTKİSİNİN MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRE DİZİLERİ ÜZERİNE SİTOTOKSİK, APOPTOTİK, NEKROTİK ETKİSİ

YIRTICI, Ümit

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Ortak Danışman: Doç. Dr. Bülent İÇGEN

Haziran 2012, 67 sayfa

169 tür ve 199 takson ile Compositae familyasının en büyük cinsi olan *Centaurea* L. Türkiye’de halk arasında birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birkaç biyoaktivite çalışmasında *Centaurea* türlerinin farklı kanser türlerinde sitotoksik aktivitesi tanımlanmıştır. Fakat endemik *Centaurea fenzlii* Reichardt bitkisi ile ilgili şimdiye kadar herhangi bir çalışma yapılamamıştır. Bu çalışmada bu bitkinin MCF-7 meme kanseri hücre dizilerine karşı sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkisi MTT, ATP ve ikili boyama testleri ile araştırılmıştır. Bitkinin toprak üstü kısımları çiçeklenme süresinde toplanmıştır ve bitki sırasıyla n-hekzan , diklorometan ve metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstreler MCF-7 meme kanseri hücrelerine artan dozlarda uygulanmıştır. Örneklerin sitotoksik etkileri ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Diklorometan ekstresinin sitotoksik etkisi diğer ekstrelerle oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Diklorometan ekstresinin etil asetat fraksiyonu MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik açıdan en etkili örnek olarak bulunmuştur. Diklorometan ekstresi ve diklorometan, etil asetat fraksiyonunun apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Centaurea fenzlii* Reichardt, sitotoksik, apoptoz, nekroz

ABSTRACT

THE CYTOTOXIC, APOPTOTIC AND NECROTIC EFFECTS OF ENDEMIC *CENTAUREA FENZLII* REICHARDT PLANTS ON MCF-7 BREAST CANCER CELL LINES

YIRTICI, Ümit

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent İÇGEN

June 2012, 67 pages

Being the largest genus of the Compositae family with over 169 species and 199 taxons., *Centaurea* L. has been used in folklor efor the treatment of wide range of diseases in Turkey. The antitumor activities of the *Centarea* species in different types of cancer have been identified through several bioactivity studies. However, in vitro anticancer activity of endemic *Centaurea fenzlii* Reichardt has never been evaluated and published yet. In this study, the cytotoxic, apoptotic and necrotic effects of this plant were tested in vitro aganist MCF-7 (human breast cancer) cells by using MTT, ATP assays and double staining. The aerial parts of the plants were collected during the flowering period and the extracts were obtained n- hexane, dichloromethane and methanole, respectively. The extracts were applied to MCF- 7 cell lines at increasing doses. The IC₅₀ values of samples were determined and their direct cytotoxic effects were measured. The cytotoxic effects of crude dichloromethane extract on MCF-7 cell lines was the highest compred to other extracts. Ethylacetate fraction of dichloromethane extract was found to be most effective on MCF-7 breast cancer cell lines. This fraction of dichloromethane and dichloromethane itself were also tested for their effect on apoptotic and necrotic.

Key Words: *Centaurea fenzlii* Reichardt, cytotoxic, apoptosis, necrosis

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında desteğini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Aysun ERGENE' ye, yine tezimin hazırlanmasında ve deneysel çalışmalarında değerli bilgilerini benimle paylaşan eş danışmanım ve hocam Doç. Dr. Bülent İÇGEN' e, hücre kültürü, sitotoksiste, apoptotik ve nekrotik deneysel süreçlerde bilgilerinden ve deneyimlerinden faydalandığım Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, değerli hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA' ya, bitki örneğinin öğütülmesi, ekstrelerin ve fraksiyonların hazırlanmasında yardımlarını esirmeyen Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli hocam Prof. Dr. Neşe KIRIMER' e ve Uzman Fatih GÖGER' e, tezime konu olan bitkinin seçiminde, toplanmasında ve şimdiye kadar ki akademik hayatımda bana hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, değerli abim, hocam Doç. Dr. Sezgin ÇELİK' e ve yine bitkilerin toplanmasında yardımlarını gördüğüm bilim uzmanı Abdulkadir AKKURT' a, bütün deneysel süreçlerde her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen bilim uzmanı Fadime YILMAZ' a ve Gamze SERİM' e son olarak bana birçok konuda olduğu gibi, tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Centaurea L.</i> Türlerinin Genel Özellikleri	3
1.2. Meme Kanseri	7
1.2.1. Meme Kanseri Etiyopatogenez	8
1.2.2. Meme Kanserinde Hücresel Değişim	8
1.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri	10
1.2.4. Meme Kanseri Sınıflandırılması	10
1.2.5. MCF-7 Hücre Hattının Özellikleri	10
1.3. Sitotoksosite	11
1.4. Apoptoz	13
1.4.1. Apoptoz Yolakları	13
1.4.2. Apoptoz Mekanizmasını Kontrol Eden Yolak ve Proteinler	15
1.4.2.1. p53	15
1.4.2.2. Nükleer Transkripsiyon Faktörü NF-KB	16
1.4.2.3. Yubikütin/Proteozom Sistemi	16
1.4.3. Apoptoz Yolak Modülatörlerini Hedefleyen Ajanlar	17
1.4.3.1. NF-kB İnhibitörü (IKB Kinaz İnhibitörü, PS-1,145)	17
1.5. Nekroz	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	20
2.1. Materyal	20
2.1.1. <i>Centaurea fenzlii</i> Reichardt	20
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	21
2.1.2.1. Cihazlar	21
2.1.2.2. Sarf Malzemeleri	22
2.2. Yöntem	22

2.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması, Öğütülmesi ve Ekstraksiyonu	22
2.2.2. Diklorometan Ekstresinden Fraksiyonların Elde Edilmesi	23
2.2.3. Fraksiyonların İnce Tabaka Kromatografisi İle İncelemesi.....	24
2.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları, Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....	25
2.2.4.1. Hücrelerin Üretilmesi	25
2.2.4.2. MTT Testi	25
2.2.4.3. ATP Testi	26
2.2.5. Apoptozun Tespiti	26
2.2.5.1. İkili Boyama	26
3. SONUÇLAR	28
3.1. Ekstrelerin ve Fraksiyonların Verimi	28
3.2. Sitotoksosite Sonuçları	30
3.2.1. MTT Sonuçları	30
3.2.2. ATP Testi Sonuçları	39
3.3. Apoptoz Sonuçları	41
3.3.1. İkili Boyama Sonuçları	41
4. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Türkiye’de yetişen bazı <i>Centaurea</i> türlerinin halk arasında kullanım amaçları.....	5
2.1. Uygulanan örneklerin ilk kuyucuktaki konsantrasyonları	25
3.1 Ekstrelerin bitkideki yüzde verimleri.....	28
3.2 Diklorometan ekstresinden elde edilen fraksiyonların ekstredeki yüzde verimleri	28
3.3 Ekstrelerin MCF-7 hücre dizisi üzerine konsantrasyon-ortalama yüzde inhisiyon değerleri	30
3.4 Diklorometan fraksiyonlarının MCF-7 hücre dizisi üzerine konsantrasyon- ortalama yüzde inhibisyon değerleri.....	31
3.5 MCF-7 hücre dizisi üzerine diklorometan, etilasetat fraksiyonu ve diklorometan ekstresinin konsantrasyon-ortalama yüzde inhisiyon değerleri	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları.....	14
2.1. <i>Centaurea fenzlii</i> Reichardt.....	21
2.2. Soxhlet apereyinde ekstrelerin elde edilmesi.....	23
2.3. Fraksiyonların flash kromatografi de elde edilmesi.....	24
3.1. Diklorometan ekstresi fraksiyonlarının İTK görüntüsü.....	29
3.2. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC ₅₀ değeri.....	32
3.3. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC ₉₀ değeri.....	33
3.4. MCF-7 hücre dizisi için kaba ekstraktların MTT inverted mikroskop görüntüleri.....	34
3.5. MCF-7 hücre dizisi için kaba ekstraktların MTT inverted mikroskop görüntüleri.....	35
3.6. MCF-7 hücre dizisi için diklorometan fraksiyonları, MTT inverted mikroskop görüntüleri.....	36
3.7. MCF-7 hücre dizisi için diklorometan fraksiyonları, MTT inverted mikroskop görüntüleri.....	37
3.8. MCF-7 hücre dizisi için fraksiyonların MTT inverted mikroskop görüntüleri.....	38
3.9. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC ₅₀ değeri.....	40
3.10. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC ₉₀ değeri.....	41
3.11. Kontrol grubunda aynı alanda, Hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.....	42
3.12. Diklorometan ekstresinin IC ₅₀ dozunun aynı alanda, Hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.....	43
3.13. Diklorometan ekstresinin IC ₉₀ dozunun aynı alanda, Hoechst (a)	

ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü	44
3.14. Diklorometan, etil asetat fraksiyonun IC ₅₀ dozunun aynı alanda, Hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü	45
3.15. Diklorometan, etil asetat fraksiyonun IC ₉₀ dozunun aynı alanda, Hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü	46

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde 750.000-1.000.000 arasında bitki türünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Bunların 500.000 kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir [1]. Bu bitkiler dünya nüfusunun çoğunluğu için en seçkin ilaç kaynaklarıdır. Büyük farmasötik firmalar, yeni lider yapılar için bir kaynak olarak bitkilere ilgi göstermektedir. Sentetik bileşiklerin yan etkilerinin daha fazla olması, var olan ilaçlara karşı kazanılmış dirençler, bitki türevli ilaçların maliyetinin düşük ve elde edilmesinin daha kolay olması gibi nedenler bu ilgede önemli paya sahiptir. Özellikle halk arasında çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi amacı ile uzun yıllardan beri kullanılan bitkiler, yeni ilaç keşfi için başlıca kaynakları oluşturur. Yapılan bir araştırmada 122 bitki kökenli ilacın % 80'inin geleneksel olarak kullanılan bitkilerden elde edildiği tespit edilmiştir [2,3].

Tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, Türkiye'de de yüzyıllardır birçok bitki türü tedavi amacıyla halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemiz bitki çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir. Toplam bitki türü sayısı 9000'den fazladır. Bu sayı alttür ve varyetelerle 10.000'i geçmektedir. Türkiye 3000 endemik türe sahip olup, endemizm oranı yaklaşık %32 kadardır. Ülkemiz birçok bitki türünün gen merkezi durumundadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin çoğu ülkemizde doğal olarak yetişmekte ve bazılarının tarımı yapılmaktadır. Yaklaşık 500 bitki türü tıbbi amaçla kullanılmaktadır [1-5]. Son yıllardaki çalışmalar, bitkilerden elde edilen ekstraktların biyolojik aktiviteleri üzerinde yoğunlaşmıştır [6,7]. Bir araştırmadan elde edilen bulgulara göre, dünyada var olan 250.000 karasal bitki türünün sadece %2'sinin biyoaktiviteleri incelenmiştir [8-10]. Bitkilerden elde edilen ve biyoaktif pek çok bileşik genellikle alkaloid, fenilpropanoid, terpenoid, lignan, glikozit, lipid gibi yapılardan oluşur [11-18].

Son yıllarda bitki kaynaklı bileşiklerin antitümöral aktivitelerinin incelendiği çalışmalara ilgi hızla artmaktadır. 1970-2000 yılları arasında yapılan çalışmalar sonucunda 72 bitki cinsinin klinik olarak veya laboratuvar düzeyinde antitümöral

özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir [19]. Antitümör özelliğe sahip bitki metabolitleri öncelikle sitotoksiktir [20]. Bazı bitki metabolitleri de daha az sitotoksik etki gösterir. Örneğin flavanoitler siklin-bağımlı kinazların aktivitesini düzenleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe edebilirler, aynı zamanda yüksek konsantrasyonda sitotoksik ve östrojen-benzeri bir aktivite de gösterebilirler. Birçok fitokimyasalın kanser hücrelerinde hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğuna dair yapılan klinik araştırmalar da halen devam etmektedir [10]. Tümör hücreleri üzerinde en etkin sitotoksik aktivite gösteren bileşikler alkaloitler [21], fenilpropanoitler [22] ve terpenoitlerdir [23].

Bitki kaynaklı bileşiklerden bazıları, kanser hücrelerinde apoptoza neden olarak antitümöral aktivite gösterir. Agarwal ve arkadaşlarının [24] *Pinus pinaster*, *P. maritime* ile prostat kanseri hücrelerinde yaptığı bir çalışmada, hücre bölünmesinin baskılandığı ve apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, *Curcuma longa*'dan izole edilen bir bileşik olan Curcumin'in CD138+ hücrelerinde, transkripsiyon faktörü NF-kB'yi baskılayarak apoptoza neden olduğu bulunmuştur [25]. İzoflavon yapısında bir bileşik olan Genistein'in kullanıldığı başka bir çalışmada da, bu bileşiğin prostat kanseri hücrelerinde ve SCID farelerde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [26].

Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute (NCI)) tarafından 35.000 farklı bitkiden yaklaşık 110.000 bileşiğin antikanser aktivitesinin incelendiği 22 yıllık bir süreçte yapılan çalışmalar sırasında bitkisel antikanserojen bir bileşik olan taksol (paclitaxel) keşfedilmiştir [27]. Bu bileşik, sitotoksik diterpen alkaloid yapısında olup *Taxus brevifolia*'dan izole edilmiştir. Antitümöral aktivitesi lösemi hücreleri üzerinde test edilmiştir, aynı zamanda taksolün meme ve yumurtalık kanserlerinde daha etkin olduğu kanıtlanmıştır [28,29].

1.1. *Centaurea* L. Türlerinin Genel Özellikleri

Compositae familyasının Türkiye'deki en büyük cinsi *Centaurea* L.'dir. Bu cins Türkiye Florası Ek I ve II (hariç olan bölümler *Aetheopappus*, *Amblyopogon*, *Centaurea*, *Hyalinella*, *Odontolophoideae*, *Psephelloideae*, *Psephellus*, *Sosnovskya* and *Xanthopsis*) adlı eserde 151 tür, 6 eksik ve 6 şüpheli türle temsil edilmektedir. Daha sonra Türkiye'den 16 yeni tür ve 2 yeni kayıt keşfedilmiştir. Türkiye florasında (EK 1) yeni tür olarak tanımlanmıştır. Nihayet *Centaurea* toplam sayısı 169 türe ve 199 taksona yükselmiştir. Son olarak endemik takson sayısı 129 ve endemizm oranı %65'e yükselmiştir [30]. Endemizm oranının bu kadar yüksek olması bu cinsin gen merkezinin Türkiye olduğu görüşünü sağlamlaştırmaktadır.

Çin'de *C. uniflora* ateş düşürücü olarak, zehirlenmelere karşı ve antiaterosklerotik olarak kullanılırken [31]. İspanya'nın bazı bölgelerinde *C. aspera*, *C. melitensis* gibi pek çok *Centaurea* türü halk arasında hipoglisemik ajan olarak, ayrıca sindirimi kolaylaştırıcı ve diüretik amaçlarla kullanılmaktadır [32]. İspanya'nın Barros bölgesinde *C. ornata* antiromatizmal olarak, bu bitkinin toprak üstü kısımları Portekiz'de hipoglisemik ajan olarak, toprak altı kısımlarından hazırlanan ekstraler ise antispazmodik amaçla kullanılmaktadır [33,34]. *C. pallescens* Mısır'da sindirimi kolaylaştırıcı ve diüretik olarak kullanılmaktadır [35]. Diğer bir *Centaurea* türü olan *C. sinaica* sitostatik, diüretik, antipiretik, fitotoksik, antineoplastik olarak bilinmektedir [36,37].

C. malacitana, *C. melitensis*, *C. aspera* subsp. *aspera*, *C. aspera* subsp. *scorpiurifolia*, *C. aspera* subsp. *stenophylla* türlerinden izole edilen 9 seskiterpen laktonun sitotoksik etkileri P-388 (fare lösemi hücre dizisi), A-549 (insan akciğer kanseri hücre dizisi) ve HT-29 (insan kolon kanseri hücre dizisi) gibi kanser hücrelerine karşı incelenmiş ve 3 seskiterpen laktonun (hücrelerin yüzde 50 nin ölmesine veya üreminin durmasına neden olan konsantrasyon (IC₅₀) değerleri) 10 ile 0.2 µg/ml arasında değişen bir sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [38]. Aynı araştırmacıların 1997 yılında yaptıkları bir başka çalışmada, *C. malacitana* toprak üstü kısımlarından izole ettikleri iki bileşiğin sitotoksik etkileri lösemi, kolon kanseri gibi hücre dizilerinde incelenmiştir. Araştırma sonucu elde edilen bir bileşiğin

oldukça yüksek ($IC_{50} \leq 5 \mu\text{g/ml}$) bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür [39]. *C. behen* türünün toprak üstü kısımlarından izole edilen örneklerde yapılan bir çalışmada yüksek sitotoksik aktivite tespit edilmiştir [40]. Lonergan ve arkadaşları [41] *C. sonchifolia* toprak üstü kısımlarından izole ettikleri onopordopikrin'in, insan deri kanseri hücreleri kullanarak in vitro sitotoksik etkisini incelemiştir. Elde edilen etkin doz 50 (ED_{50}) sonuçları ($0.85\mu\text{g/ml}$) onopordopikrin'in de diğer seskiterpen laktonlar gibi yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. *C. zuccariniana*, *C. achaia*, *C. deusta* ve *C. thessala* subsp. *drakiensis*'den izole edilen bileşiklerle DLD1 (kolon), MCF7 (meme), H460 (kolon) hücre dizileri üzerinde yapılan bir araştırmada *C. zuccariniana*'dan elde edilen bir bileşiğin de sitotoksik aktivitesi olduğu bildirilmiştir [42]. *C. schischkinii* ve *C. montana* türlerinden izole edilen iki yeni alkaloid schischkinnin ve montamine insan kolon kanseri hücrelerine karşı anlamlı bir sitotoksik aktivite göstermiştir [43-45].

Bitki peygamber çiçeği, zerdali diken, çoban kaldıran, Timur diken gibi Türkçe isimlerle bilinmektedir. *Centaurea* cinsinin birçok türü diyabet, diyare, romatizma, hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır [36,46-49].

Batı ve Güneybatı Anadolu'da yaygın olan *C. cyanus* türünün kurutulmuş çiçekleri halk arasında % 5'lik infüzyonları halinde ishal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Doğu Anadolu'da yetişen *C. behen* Ak behmen ve Zerdali diken olarak bilinmekte ve çiçekleri mideyi ve adet getirici olarak kullanılmaktadır. Kuzeybatı Anadolu'da yetişen ve çoban kaldıran, Timur diken olarak bilinen *C. calcitrapa*'nın % 2-6'lik infüzyonları dahilen ateş düşürücü olarak, çayır peygamberi ismiyle bilinen ve Kuzeydoğu Anadolu'da yaygın olarak yetişen *C. jacea* ateş düşürücü, adet getirici, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır [1].

Isparta Eğirdir yöresinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin saptanmasına yönelik yapılan bir araştırmada, *C. iberica*'nın mide ağrılarına ve böcek ve yılan sokmalarına karşı kullanıldığı saptanmıştır [50]. *Centaurea* türleri halk tababetinde tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antidiyareik,

antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşık, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır [39,40,48,51,52]. *C. chilensis* bitkisinin sulu ekstresi halk arasında antipiretik ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır [53-55]. Çizelge 1' de Türkiye'de yetişen bazı *Centaurea* türlerinin halk arasında kullanım amaçları verilmiştir.

Çizelge 1.1. Türkiye'de yetişen bazı *Centaurea* türlerinin halk arasında kullanım amaçları

Tür	Yöresel İsim	Kullanılışı	Uygulama Şekli	Kaynaklar
<i>C. balsamita</i>	Kılıç otu (Kars)	Çıban patlatıcı	-	[1,56]
<i>C. virgata</i>	Şaladır (Van)	Mide ağrısına karşı Yara iyi edici	Dahilen dekoksyonu Haricen, külleri tereyağı ile karıştırılarak merhem halinde	[57,58]
<i>C. diffusa</i>	Zerdali diken			[59]
<i>C. pulchella</i>	Boğa diken (Niğde) Gümüş süpürge (Aksaray)	Çıban patlatıcı	Haricen, toz halde	[60,61]
<i>C. jacea</i>	Çayır, peygamber diken, peygamber çiçeği	Ateş düşürücü, adet söktürücü, kabız ve iştah açıcı	-	[1,59]
<i>C. lycopifolia</i>	Kumacı otu (Kahramanmaraş)	Öksürük kesici Kan dindirici	Dahilen, taze halde dövülerek çıkan özsuyu alınır ve şekerle karıştırılıp içilir Haricen, toz halde	[62] [62]
<i>C. drabifolia</i>	Basur otu (Afyon)	Hemoroid tedavisinde	Dahilen infüzyon, çay veya sigara şeklinde	[63]
<i>C. macrocephala</i>	Sarıbaş			[59]
<i>C. glastifolia</i>	Kotankıran	İştah açıcı	-	[59]
<i>C. pterocaula</i>	Çoruşbozan (Erzurum)	Yara iyi edici	Haricen, toz halde	[56]
<i>C. behen</i>	Ak behmen, zerdali diken	Midevi, adet söktürücü	-	[1,59]

Çizelge 1.1. (devam)

<i>C. solstitialis</i> <i>subsp. solstitialis</i>	Güllü diken, zerdali diken, sıtmaotu, çakırdikeni (Afyon)	Çocuklarda dudaklardaki uçuklara karşı	Haricen, kavrulup toz edilerek	[63,64]
	Çakırdikeni, oğlak diken, sarı diken, eşek diken (Bartın)	Sıtma tedavisi	Dahilen hap gibi yutulmuş veya sigara gibi içilerek	[65,66]
	Çakırdikeni (Çankırı)	Peptik ülser semptomlarında	Taze iken hap şeklinde	[62,67]
	Oğlak diken, sarı diken (Konya)	Soğuk algınlığı ve sıtma tedavisi	Dekoksasyon veya infüzyonu 2-3 kez içilir	
<i>C. iberica</i>	Çakırdikeni (Erzincan) Çakırdikeni (İsparta) Alabaş (Kastamonu) Deligöz diken Çobankaldıran, Timurdikeni (Kastamonu)	Ateş düşürücü Yara iyi edici Mide ağrısına karşı Yılan ve akrep sokmasına karşı	Dahilen, %2-6 lık infüzyon Haricen toz halde Dahilen, infüzyon Ezilerek sürme	[56,59,68-70]
<i>C. calcitrapa</i>	Çobankaldıran, Timur diken	Ateş düşürücü	Dahilen % 2-6 lık infüzyon	[59]
<i>C. urvillei subsp. armata</i>	Kötürüm (Sivas)			[59]
<i>C. urvillei subsp. stepposa</i>	Çoban diken (Konya)			[59]
<i>C. pichleri</i>	Peygamber çiçeği (Eskişehir)			[59]
<i>C. depressa</i>	Acımık (İsparta)			[59]
<i>C. cyanus</i>	Peygamber çiçeği, gökbaş (Muğla)	İshal kesici, kuvvet verici, iştah açıcı, göğüs yumuşatıcı Saç kepeklenmesine karşı	Dahilen % 5 lık infüzyon Haricen, infüzyonu ile baş yıkanır	[1,59,69]
<i>C. tchihatcheffi</i>	Yanar döner, gelin düğmesi, kırmızı peygamber çiçeği, türbe çiçeği (Ankara)			[70]

Türkiye’de yetişen endemik *Centaurea* cinsine ait olan *C. bornmuelleri* ve *C. hubermorathii* türleri yapılan çalışmalarda da anti-kolon kanseri aktivitesi tespit edilmiştir [71].

C. gigantea ile yapılan bir çalışmada da izole edilen bileşiklerin CaCo-2 kolon kanseri hücrelerine karşı anti-tümoral aktivite gösterdiği bildirilmiştir [72,73].

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri en sık terminal duktuler lobüler ünit olarak adlandırılan lobül ile terminal kanalın birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir. Meme kanserlerinin %95' i adenokanser iken %5' lik kısmını skuamöz hücreli kanser, filloides tümörleri, sarkom ve lenfomalar oluşturur. Başlangıçta meme kanalları içinde sınırlı olan kanser hücreleri sonradan kendi bazal membranlarından ilerleyip bağ dokusu içine yayılarak kan damarları ve lenfatikler aracılığıyla metastaz yapma yeteneğine sahip olurlar. Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında %18 oranla ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri yaş arttıkça daha sık görülür. 25 yaş altında çok nadir görülürken, 90 yaşında bayanlardan 8' de 1' i meme kanserine yakalanmaktadır [74]. Meme kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi yaşanan coğrafi bölgeye, etnik kökene ve sosyoekonomik duruma göre değişiklik göstermektedir. Meme kanserine ABD' de yüzbinde 80-90 oranında rastlanırken Japonya' da bu sayı yüzbinde 12-18 civarındadır [75]. 2010 yılında ABD'de yaklaşık 207.090 ye ni tanı alan kadın hasta olacağı ve 39.840 kadının da bu hastalığa bağlı öleceği tahmin edilmektedir [76,77].

Türkiye' de meme kanseri insidansı ve risk faktörlerinin belirlemeye yönelik çalışmaların sayısı çok azdır. T.C. Sağlık Bakanlığı' nın 1999 yıl verilerine göre, meme kanseri ülkemizde % 24.1 oranı ile kadınlarda görülen kanserler arasında ilk sırada yer alırken, %13.7'lik oranla kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır [78]. Uluslararası Kanser Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre de, kadınlarda kanserden ölüm sebepleri arasında meme kanseri (%16.7) ilk sırada gelmektedir [79].

1.2.1. Meme Kanseri Etiyopatogenez

Meme kanseri gelişiminde mevcut etiyolojik faktörler genetik faktörler, hormonal etkiler ve çevresel faktörler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. Meme kanserine riski arttıran *BRCA-1*, *BRCA-2*, *p53*, *Cowden*, *AR* ve *AT* geni otozomal geçişli ailesel vakalarının birçoğundan sorumludur. Ailesel meme kanseri vakalarında bu tümör supresor genler ve DNA tamir genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenirken *c-erb-b2* onkogeninin ekspresyonunda artış tanımlanmıştır [77,80]. Meme kanseri oluşumundaki hormonal etkiler östrojene uzun süre maruz kalınması ile açıklanmaktadır. Tümör oluşumunun otokrin metabolizmasında önemli olan ve meme kanser hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri (EGF, FGF, PDGF)'nin oluşumu östrojene bağlıdır [80]. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde farklılık göstermekle birlikte, Japonya dışında gelişmiş ülkelerde insidansı oldukça yüksek görülmektedir. ABD ve diğer batı ülkelerinde meme kanseri insidansı gelişmekte olan ülkelere oranla 4-7 kat daha fazladır. Japonya' dan Hawaii' ye göç eden göçmenlerle yapılan çalışmalarda, göçmenlerdeki meme kanseri insidansının bir veya iki jenerasyon sonra göç ettikleri bölgenin meme kanseri insidansına yaklaştığının gösterilmesi, meme kanserinin çevresel faktörlerle ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Önemli bir çevresel faktör olan radyasyon ile meme kanseri ilişkisi de 2. Dünya savaşı sonrasındaki çalışmalarda gösterilmiştir. Hiroşimada atom bombası sonrası radyasyona maruz kalan kadınlarda meme kanseri insidansında 2- 4 kat artış olduğu tespit edilmiştir [74,77,80].

1.2.2. Meme Kanseri Hücresel Değişim

Meme kanserinin karsinogenez süreci, sırasıyla benin proliferatif meme lezyonları, karsinoma *in situ*, erken dönem meme kanseri (evre 1-2), lokal ileri evre meme kanseri (evre3) ve invaziv kanser evrelerinden oluşmaktadır. Meme karsinogenezinde hücrelerde meydana gelen ilk morfolojik değişiklik epitel hücre proliferasyonunda artış yani proliferatif lezyonlardır. Bu erken değişiklik hücrelerin büyüme engelleyici sinyallerden ve apoptozdan kaçma mekanizması ile olmaktadır. Bu erken dönemde hücrelerdeki hormon reseptör ekspresyonlarında ve hormon

reseptör pozitifliği ile ilişkili hücre proliferasyon kontrollerinde anormallikler gözlenmiştir. Genetik değişkenlik, proliferatif lezyonlarda çok nadir gözlenmekle birlikte, atipik hiperplazilerde daha siktir. Karsinoma *in situ*' da ise yaygın olarak görülür. Nüklear genişleme, düzensizlik, hiperkromazi ile tanımlanan anöploidi sadece ileri evre duktal karsinoma *in situ* ve bazı invaziv karsinomlarda gözlenir. Duktal karsinoma *in situ* lezyonlarındaki hücrelerin geniş gruplar oluşturarak duktal sistemi tamamen doldurması hücrelerin sınırsız bölünme potansiyeli nedeniyledir. Karsinomaların morfolojik ve biyolojik özellikleri *in situ* döneminde kazanılmaktadır. Vakaların çoğunda *in situ* lezyonlar, takip eden karsinomlarla benzer özellikler taşımaktadır [74,77]. Normal memenin yapısı ve fonksiyonu için meme epitel hücreleri, miyoepitelial hücreler ve stroma hücreleri arasındaki kompleks ilişkiler önemlidir. Puberte ve gebelikte yeni kanal ve lobül sistemlerin oluşması; bazal membranın kaldırılması, hücre proliferasyonunda artış, büyüme inhibisyonundan kaçış, anjiyogenez ve stroma invazyonu ile gerçekleşmektedir. Karsinogenez sürecinde de anormal epitelial ve stromal hücreler aynı değişiklikleri gerçekleştirmektedir. Epitel hücrelerine paralel olarak miyoepitelial ve stroma hücrelerinde görülen mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler, epitel hücreleri ve stromal hücreler arasındaki normal ilişkilerin ve doku yapısının bozulmasına neden olur. Mutasyonların ortaya çıkması ve normal fonksiyonların kaybı yaş ilerledikçe artmaktadır. Bu da ileri yaştaki bayanlarda meme kanseri riskindeki artışın sebebidir [74]. Karsinogenezin son aşaması, bazal membranlarla kanallarda ve lobüllerde sınırlanmış karsinoma *in situ* lezyonlarının invazif karsinomaya dönüş basamağıdır. İnvazyon için gerekli özel gen ekspresyonlarının tanımlanmasının zorluğu nedeniyle bu basamak en az aydınlatılan basamaktır. Son yıllarda malign hücrelerin invazyon yeteneği kazanmasına ek olarak, miyoepitelial ve stroma hücrelerinin fonksiyon kaybının da dokunun bazal membran yapısının bozulmasının ve böylece invaziv karsinomaların oluşmasının temel nedenlerinden biri olabileceğine yönelik görüşler bulunmaktadır [74,77,81].

1.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinde majör risk faktörleri; kadın cinsiyet, ileri yaş, aile hikayesi, önceki hikayede meme kanseri öyküsü, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonu taşıyıcılığı gibi genetik yatkınlık, göğüs bölgesine radyasyon öyküsü ve atipik hiperplazi sonuçlu biyopsi raporudur. Minör risk faktörleri ise, erken menarş, geç menopoz, obezite, alkol alımı, ilk doğumunu geç yaşta yapma, atipik hiperplazi dışında benin meme hastalıkları öyküsü ve östrojenlere uzun süre maruz kalınmasıdır [77,81].

1.2.4. Meme Kanseri Sınıflandırılması

Meme kanserlerinin sınıflandırılması klinik veya histopatolojik olarak yapılmaktadır. Kanser hücrelerinin lokalizasyonu ve yaygınlığına göre meme kanser tipleri isimlendirilmektedir. Genel olarak hücreler süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobüler, medullada ise medüller meme kanseri ismini alır. İn situ kanserlerde, kanser hücreleri kaynaklandıkları yerle sınırlı kalırken, invazif meme kanserlerinde yayılma eğilimi gösterirler. İnvazif duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipidir [74,77,82].

1.2.5. MCF-7 Hücre Hattının Özellikleri

MCF-7 hücreleri, 64 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomlu bir kadın olgunun plevral efüzyonundan 1970 yılında izole edilmiştir [83]. Bu tarihten itibaren, östrojen reseptörü pozitif (ER+) MCF-7 hücre hattıyla yaklaşık 12.000 çalışma yapılmıştır. Morfolojisi epitelyal olup, insülin benzeri büyüme (çoğalma) faktörü bağlanma proteinleri sentezler. Ayrıca WNT7B onkogeninin ekspresyonu mevcuttur. HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış, hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde bozukluklar görülmektedir [84-86]. DNA' da hatalı eşleşen bazlar, DNA tamir proteinleri tarafından onarılırlar ve ayrıca genomun bütünlüğünün korunmasında görev alırlar. Hatalı eşleşmiş bazların onarımında görev alan MLH1

ve MSH2 tamir proteinleri MCF-7 hücrelerinde mutasyona uğradığı için, hücreler antikanser ajanlara karşı direnç geliştirir. Sonuç olarak, DNA tamir genlerindeki mutasyonlar ve/veya tamir proteinlerinin az veya aşırı ifadesi, direnç gelişiminde önemli bir faktördür [86,87]. Meme kanseri ve diğer birçok insan kanserinin oluşumunda, hücre döngüsü kontrol noktalarından siklin D1' de oluşan mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur [86,88]. MCF-7 hücre hattında kaspaz -6, -7 ve -9 ekspresyonunun yanı sıra Bcl-2 ekspresyonu da oldukça iyidir. Diğer yandan *p53* ve *p21* genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir [85,86]. MCF-7 hücrelerinin çoğalma mekanizmalarında; aşırı artmış östrojen ekspresyonu ve östrojene bağlı proliferasyon, EGF' den bağımsız çoğalma, artmış *Her-2/Neu/c-ErbB-2* ekspresyonu artmış [86,89], N-ras [86,90] ve Rb proteininin hızlı fosforilasyonu rol oynamaktadır [86,91].

1.3. Sitotoksisite

Hücre kültürlerinde gerek deney kurarken, gerekse çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların sitotoksik etkilerini belirlemek için hücreye ait bir takım canlılık parametrelerinin ölçülmesi gerekir. Bunlar içerisinde öncelikle hücrelerin yaşadığını ifade eden canlılık testlerinin yapılması gerekir. Canlılık hücre zarının bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini test ederek belirlenir. Canlılık gösteren hücreler membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerdir. Örneğin tripan mavisi membran bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini belirlemede sıklıkla kullanılır. Canlı hücreler boyayı dışarı atarken, bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini kaybeden hücreler boyayı içeri alır. Bu yöntemle hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı, dolayısıyla toplam hücre sayısı belirlenebilir [92].

Kolorimetrik olan ve metabolizma redüktaz aktivitesi ile hücre canlılığının değerlendirilmesinin yapıldığı yöntemler arasında en yaygın kullanılanları tetrazolium ve resazurin azalmasının değerlendirilmesidir. Tetrazolium tuzları ancak metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilirler [93].

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT) ölçümü in vitro koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir [94]. Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Çalışmada hedef Krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrilerin matriksinde bulunan süksinat dehidrogenaz' dır. Bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, süksinat dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşur. Organik çözücülerde kolayca çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı yoldan hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir [93,95].

Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir. Apoptozisin erken dönemlerinde hücrelerin metabolik etkinliklerinde bir değişiklik olmadığı ve kimyasal tarafından arttırılmış olabilecek efektör hücrelerdeki metabolik etkinliğin, hedef hücrelerdeki sitotoksik etkiyi maskeleyebileceği dezavantajları bulunmakla birlikte, MTT yöntemi günümüzde birçok literatürde referans gösterilmektedir [96].

Sitotoksiteyi tespit etmekte kullanılan diğer bir yöntem ise ATP konsantrasyonunu ölçmeye yarayan testlerdir. ATP ölü hücrelerde bozulurken, zarar görmüş hücrelerde hızla azalır. Bu yüzden hücrelerdeki ATP miktarı kültürdeki canlı hücre miktarı ile orantılı olarak değişir. Bu testler ile hücredeki ATP miktarı lusiferin – lusiferaz reaksiyonu sonucu oluşan biyoluminesans ile ölçülür [97]. Fakat hücrede ATP konsantrasyonu, yaşlanma ve açlığa bağlı olarak üremenin durması, mitokondrial solunumun inhibe edilmesi gibi ölümcül olmayan durumlardan dolayı da azalabilir. Bu nedenle ATP konsantrasyonunun ölçülmesi her zaman doğrudan hücre canlılığı ile ilişkili olmayabilir [98,99]. Buna rağmen ATP miktarını ölçmeye yarayan yöntemler, çok hassastır (kuyucuk başına 100 hücreden 100,000 hücreye kadar) ve tekrarlanabilir olmaları nedeniyle hücre çoğalmasını ve canlılığını değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerdir [97].

1.4. Apoptoz

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi, organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür [100,101].

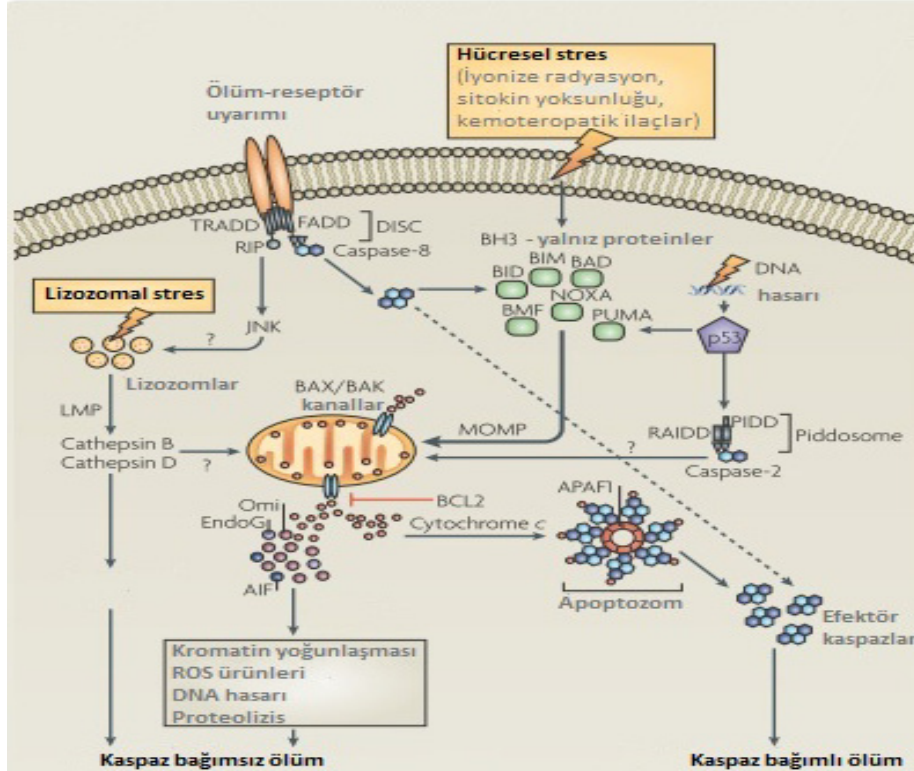
Hücre ölümünde iki temel mekanizma vardır; nekroz ve apoptoz. Dış etkilerden zarar gören hücreler nekroza, dış veya iç uyarı ile programlı intihara teşebbüse dürtülen hücreler ise apoptoza yönelirler [102].

Apoptoz, kromozom kondensasyonu, nükleozomal DNA degradasyonu ve fragmentasyonu ile ortaya çıkan bir programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu işlem çeşitli tetikleyicilerle aktif hale getirilen ve peşi sıra gelen sinyal modüllerinde yerleştirilen belirli bir sayıda kompleks protein tarafından kontrol edilmektedir [102]. Apoptozun bu morfolojik yapısı, kaspaz (cysteine aspartyl protease (caspase)) protein ailesi üyelerinin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. Hücreden arta kalanlar, fagositler veya komşu hücrelerin lizozomları ile uzaklaştırılır [103]. Programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi, hücre ölümünü uyaran ve hücre sağ kalımını sağlayan birçok farklı sinyal ileti yolağının birlikte aktivitesiyle gerçekleştirilir.

1.4.1. Apoptoz Yolakları

Apoptoz iki ana yolak ile gerçekleşir (Şekil 1.1). Birincisi ekstrinsik veya sitoplazmik yolak, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olan Fas ölüm reseptörü yoluyla tetiklenir. İkinci yolak intrinsik veya mitokondriyal yolak, uyarılınca mitokondriden sitokrom (cytochrome)-c salınımı ve ölüm sinyalinin aktif hale getirilmesi ile tetiklenir. Her iki yolak da bir noktada birleşerek hücre ölümüyle

sonuçlanan, düzenleyici ve yapısal molekülleri bölen kaspazlar olarak bilinen proteazlar serisinin aktivasyonunu içeren son ortak bir yolda birleşir [102,104].



Şekil 1.1. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları [104]

Ekstrinsik yolağın aktivasyonunu çeşitli yolak ve proteinler düzenler. Transkripsiyonal olarak inaktif bir gen olan *FasL* genini ayarlayan aktive edici protein 1 ve NF- κ B gibi transkripsiyon faktörleri ekstrinsik yolağın düzenleyicileridir. Apoptozun temel düzenleyicileri olan Bcl-2 ailesi Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi proapoptotik üyeleri ve Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi antiapoptotik üyeleri içermektedir [105]. Bcl-2'nin ekspresyonunun azalması antikanser ilaçlara karşı apoptotik tepkiyi yükseltirken, Bcl-2'nin ekspresyonunun artması radyasyon terapisine ve kemoterapötik ilaçlara karşı dirence sebep olur. Ayrıca, yüksek Bcl-2 ekspresyonu hücre döngüsü G0 fazında hücrelerin yığılmasına sebep olur ve kemorezistansa katkı sağlar [106].

Proapoptotik Bcl-2 üyeleri apoptoz destekleyici olarak davranırken, antiapoptotik üyeleri sitokrom-c nin salınımını engelleyerek apoptoz önleyicisi olarak davranırlar. “Eugenol” ün mast hücrelerinde “Ser15 phospho-p53” ün mitokondri içerisine translokasyonunu ve orada Bcl-2 ve Bcl-XL ile etkileşerek apoptozu indükledikleri saptanmıştır [106]. Bcl-2‘ nin intrinsik yolakta gereğinden fazla ifadesi ekstrinsik kontrollü apoptozu engeller; ters olarak ta, TNF- α NF-kB‘ nin ekspresyonunu yükseltir ve Bcl-2 ailesi proteinlerin antiapoptotik üyelerini uyarır [102].

1.4.2. Apoptoz Mekanizmasını Kontrol Eden Yolak ve Proteinler

Apoptoz mekanizmasını bir çok yolak ve protein kontrol etmektedir. p53, NF-kB, fosfatidilinozitol (phosphatidylinositol) 3 kinaz (PI3K)/Akt yolağı, ve yubikütin (ubiquitin) / proteozom yolağı bunlara örnektir.

1.4.2.1. p53

p53 çeşitli stres sinyalleri tarafından aktif hale getirilen bir tümör süpresor proteindir. p53, mitokondri bütünlüğü ve geçirgenliğinin temel düzenleyicisi olan bir kaç Bcl-2 ailesi proteini (sadece Bax ve BH3 proteinlerini) ayarlayarak mitokondriyal yolak yoluyla apoptozu neden olmaktadır. Ölüm uyarısının varlığında, sadece BH-3 birimini içeren proteinler proapoptotik proteinlere el koyan ve onların aktivasyonunu engelleyen anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini önleyerek Bax ve Bak‘ı aktif hale getirir. Aktif hale getirildiklerinde, Bax/Bak mitokondrinin dış zarına sokulur ve mitokondri içerisinden apoptojenik proteinlerin serbest bırakılmasına yol açan kanalları oluşturur. Kanserlerin çoğunda görülen p53 kaybı genomik düzensizliğe, hücre döngüsü düzensizliğine ve apoptozun engellenmesine yol açmaktadır. P53‘ün apoptozu destekleme mekanizması tam olarak bilinmemektedir [102]. p53 ekspresyonu hatalı olan kanser hücreleri kemoterapiye cevap vermemektedir [107].

1.4.2.2. Nükleer Transkripsiyon Faktörü NF-KB

NF-KB apoptoz, viral replikasyon, tümörigenez, inflamasyon, ve bir sürü otoimmün hastalıkta gerekli bir sürü genin ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. NF-kB büyüme faktörleri, sitokinler, limfokinler, radyasyon, farmakolojik ajanlar, ve stresi içeren çeşitli uyarılar tarafından aktif hale getirilir. NF-kB inaktif formunda, IKB ailesi inhibitör proteinlerine bağlı olarak, sitoplazmada bulunur. NF-kB aktivasyonuna sebep olan çeşitli uyarı IKB' nin fosforilasyonuna ve de degradasyonuna sebep olur. Bu da NF-kB alt birimleri üzerine nükleer lokalizasyon sinyalleri iletilmesi ve sonra molekülün nükleusa translokasyonu ile sonlanır. NF-kB nükleusta çeşitli genlerin transkripsiyonunu başlatır [102]. NF-kB muhtemelen doku orijininin ziyade ölüm uyarısının durumu ile belirlenen anti ve proapoptotik fonksiyonların her ikisini de gösterir. Uygun fizyolojik durumlarda, NF-kB' nin aktivasyonu bir sürü kompleks proteinin aktivasyonu yoluyla apoptotik uyarıya dirence neden olur. Bununla beraber, belirli uyarılara tepki olarak NF-kB aktivasyonu apoptozun indüklenmesine yol açabilir. Bu kaspaz-1 gibi kaspazlar, interferon-düzenleyicili faktör-1, c-myc, ve p53 gibi bazı proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile açıklanabilir [102].

1.4.2.3. Yubikütün/Proteozom Sistemi

Bu sistem geniş bir proteinaz kompleksinden oluşmakta olup, hücre büyümesi ve apoptozu düzenlemeden sorumludur. Protein degradasyonu oldukça koordineli bir işlem olup yubikütün moleküllerine bağlanarak proteinin tanınmasını ve 26S proteozomu ile sindirilmesini içerir. Çoğu hücre döngüsü düzenleyicileri p53, siklinler ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri gibi transkripsiyon faktörleri ve NF-kB yubikütün/proteozom sistemi ile düzenlenir. Çoğu Bcl-2 ailesi üyesi yubikütün/proteozomun substratıdır. Proteozom inhibitörleri ile apoptozun indüklenmesi p53, p27, proapoptotik Bad veya Bax gibi proteinlerin başlangıçta birikmesine yada sitokrom-c salınımına ve intrinsik apoptoz yolağı aktivasyonuna sebep olan stres kinaz aktivasyonuna yol açar [102]. Farklı tümörlerde apoptozu kontrol eden farklı sinyal yolaklarının iyi anlaşılması, söz konusu tümöre özel

moleküler kusurlara dayalı yeni hedeflenmiş ajanların keşfedilmesine yardımcı olacaktır. Bunlar CCI-779 ve RAD 001 gibi rapamisin inhibitörleri ve bortezomib gibi özel modülatörler ile hedeflenebilir. Çünkü bu yollar tümör hücrelerinde tercihli olarak değiştirilmiş olabilir, ve normal dokuyu az kullanan, tümörlerde ise seçici bir etki için bir potansiyel vardır [102].

1.4.3. Apoptoz Yolak Modülatörlerini Hedefleyen Ajanlar

Proteozom inhibitörleri, mTOR inhibitörleri ve p53 inhibitörleri apoptoz yolak modülatörlerini hedeflemektedir. Bu ajanların etkileri kanser hücrelerine seçici olabilir, çünkü proliferasyon ya da transforme hücrelerde apoptozu dürtülemektedirler. Örneğin, c-myc onkojeninin yüksek oranda ifadesi kanser hücrelerini, proteozom inhibitörü dürtülü apoptoza daha duyarlı yapmaktadır. Proteozom inhibitörleri laktasistin gibi doğal ürünleri, MG132, ALLN, ve MG115 gibi peptid aldehydlerini, ve bortezomib gibi boronik asit inhibitörlerini içermektedir [102].

1.4.3.1. NF-kB İnhibitörü (IKB Kinaz İnhibitörü, PS-1,145)

IKB kinaz inhibitörü PS-1,145 multiple myeloma hücrelerinde IKB' nin fosforilasyonunu önler ve ılımlı bir şekilde direkt olarak büyümelerini engeller. PS-1,145 NF-kB ile dürtülen adhezyon moleküllerinin upregulasyonunu ve multiple myeloma hücrelerinin adhezyonunu ortadan kaldırır. Özel NF-kB inhibitörleri multiple myeloma ve diğer kanserlerin tedavisinde faydalıdır [102].

1.5. Nekroz

Nekrotik hücre ölümü veya nekrozis morfolojik olarak hücre hacminin artması (onkosis), organellerin şişmesi, plazma membranının bozulması ve son olarak hücre içeriğinin kaybı ile karakterize edilir. Uzun zamandır, nekrozis sadece hücrenin kazara kontrolsüz ölümü olarak tanımlanmıştır. Fakat son yıllarda yapılan

çalışmalarla nekrozisin katabolik mekanizmalar ve enerji dönüşümü ile ilgili sinyal iletim yolları ile düzenlenen bir hücre ölümü olduğu anlaşılmıştır [108,109]. Örneğin ölüm domain reseptörleri (TNFR1, Fas/CD95 and TRAIL-R) ve Toll benzeri reseptörler (TLR3 and TLR4) özellikle de kaspaz inhibitörleri yolu ile nekroze yol açtığı görülmüştür. TNFR1-, Fas/CD95-, TRAILR ve TLR3-bağımlı hücre ölümleri görünüşe göre (bu reseptörlerin necrostatin-1 ile inhibisyonları ve knockout/knockdown ları sonucu [110-112]) kinaz RIP1 bağlı olduğu tespit edilmiştir. [113]. Bazı bilim adamları bunu nekroptosis olarak adlandırmıştır. Biyokimyasal seviyede tanımlamak gerekirse nekroptosis, nekrozisin tesadüfi ve programlanmış formları arasındaki ayırımın yapılabilmesini sağlayan hücre ölüm tiplerinden biri olarak kabul edilebilir [110,111].

Bazı mediatörler, organeller ve hücresel süreçler nekrotik hücre ölümünde rol oynasalar da hala aralarında nasıl bir ilişki olduğu açıklanamamıştır. Buna neden olan olaylar açık olmasa da gözlemlenebilmektedir. Bunlar mitokondriyal değişimleri (çözülme, reaktif oksijen türleri (ROS), nitrik oksit veya benzer ürünler [114] ile nitroksidatif stres, ve genelde silofilin D ile kontrol edilen mitokondriyal membran geçirgenliği) lizozomal değişimleri (Fenton reaksiyonlu ROS ürünleri, lizozomal membran geçirgenliği), hücre çekirdeğinde meydana gelen değişiklikleri (PARP-1 in aşırı aktivasyonu ve beraberinde NAD⁺ nin hidrolizi) lipid bozulmasını (fosfolipaz, lipoksigenaz ve sfingomiyelinazın aktivasyonu), mitokondriyal yükün artması ve non-kaspaz proteazların (kalpainler ve katapsinler) aktivasyonu ile sonuçlanan kalsiyumun sitoplazma konsantrasyonunun artmasını içermektedir [108,115]. Yani bazı nekrotik hücre ölümlerinde serin/treonin kinaz RIP1 in çok önemli rolünün olduğu gösterilmiştir [116].

Centaurea fenzlii Reichardt türünün MCF-7 meme kanseri hücre dizisi üzerine sitotoksik ve apoptotik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ülkemizde önemli bir yeri olan *Centaurea* cinsinin birçok türünün ve bitkinin değişik kısımlarının halk arasındaki yaygın kullanımı, literatürdeki ulusal ve uluslararası birçok biyoaktivite çalışmalarından olumlu sonuçlar elde edilmesi dikkate alındığında bu bitkiden ilaç olarak yararlanmak için üzerinde daha fazla çalışmaya gerek duyulduğu ortaya çıkmaktadır. İlaç araştırmaları alanına bu bitkinin daha fazla türünü dahil etmekle hiç

kuşkusuz ihtiyaç duyulan yeni, maliyeti düşük, kolay elde edilebilir ve etkin ilaçların geliştirilebilmesi olasılığı artırılmış olacaktır.

Bu çalışmada *Centaurea fenzlii* Reichardt bitkisi kullanılarak elde edilen hekzan, diklorometan ve metanol ekstralarının ve diklorometan fraksiyonlarının sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. *Centaurea fenzlii* Reichardt

Bitkinin anatomik özellikleri aşağıdaki gibidir;

İki yıllık. Gövde dik, üst kısmında birkaç dallanmış 40-130 cm. Yapraklar sert skabroze, parçalanmamış, 15-16 x 9-11 cm, taban yapraklar ovat-roundat, tabanı kordat, peduncul, alt yapraklar tabandakilere benzer, orta ve üst elliptik den lineara, sapsız ve dekurent. Kapitula 4-15 rasemdedir; globos, 30-40 x 30-50 mm; fillariler imbirikat, tüysüz, dik; dış fillariler orbikular, 4-6 x 3-5 mm, apendeyç 2-2.5 x 2 mm; orta fillariler orbikular, 9-11 x 8-10 mm., apendeyç 2-2.5 x 1-2 mm; iç fillariler orbikular, 15-18 x 14-16 mm., apendeyç 1-1.5 x 0.5-1.5 mm saman rengi; fillarilerin tabanını tamamen örter, dekurent değil, 9-15 silialı, silialar 1-3 mm uzunluğunda. Çiçekcikler sarı, radiant değil; korolla tüpü tüysüz, 10-15 mm uzunluğunda, loblar 5-6 mm, linear; filamentler 4-5 mm uzunluğunda, puberulent; anterler 6-8 x 0.5-1 mm; sitilus 12-15 mm uzunluğunda, sitilus sapı 10-12 mm uzunluğunda, sitilus dallanması 1.5-2 mm uzunluğunda, tabanda tüylü. Akenler ovat, 4-7 x 4-5 mm, beyazımsı, tüysüz; pappus ikiserili, iç seri 1-1.5 mm uzunluğunda, dış seri 6-10 mm uzunluğunda, skabroz, beyaz (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Centaurea fenzlii* Reichardt

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

2.1.2.1. Cihazlar

Bitki örneklerinin öğütülmesi ve ekstraksiyonu için; bitki öğütme değirmeni, soxhlet apereyi, rotavapor (Heidolph, Laborota4000 Efficient), fraksiyonların elde edilmesi için; cam kolon, ince tabaka kromatografi (İTK) için CAMAG – HPTLC sistem, hücre kültürü çalışmaları için biyolojik güvenlik kabini (Esco, Class II BSC), CO₂'li inkübatör (Binder), santrifüj (Hettich, Rotina 380R), su banyosu (Memmert), otoklav (Hirayama, HG-80), tekrarlayıcı pipet (Gilson, Repetman), çok kanallı pipet (Gilson, PipetmanUltra), serolojik pipet tutucu (Brand, accu-jet pro), sitotoksisite çalışmaları için; mikroplaka okuyucu (Biotek, PowerWave XS2), Lüminometre (Biotek, Synergy 2), örneklerin saklanması +4, -20 ve -80 °C dondurucular, apoptoz tayini çalışmalarında mikroskop (Leica, Ctr6000) kullanılmıştır.

2.1.2.2. Sarf Malzemeleri

Bitki örneklerinin ekstraksiyonu için; hekzan (Merck), diklorometan (Merck), metanol (Merck), diklorometan fraksiyonlarının elde edilmesi için; hekzan (Merck), etil asetat (Merck), metanol (Merck), formik asit (Merck) ve silika jel 60 G (Merck), alüminyum İTK silikajel plakaları 60F₂₅₄ (Merck), hücre kültürü çalışmaları için; 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin solüsyonu, 2 mM L-glutamin ve 10% fetal sığır serumu içeren RPMI 1640 ve DMEM besiyerleri, serolojik pipetler (5, 10, 25 ve 50 mL), enjektör filtreleri (0,22 ve 0,45 µm), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS), Tripsin EDTA, sitotoksisite testleri için; MTT, 0.01 N HCl çözülmüş 10 % sodium dodesil sülfat (SDS), ATP bioluminescence assay kit HS II (Roche), apoptoz testleri için; ikili boyama da RNase, propodiyum iodür (PI), Hoechst boyası (33342/PI), kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitki Örneklerinin Toplanması, Öğütülmesi ve Ekstraksiyonu

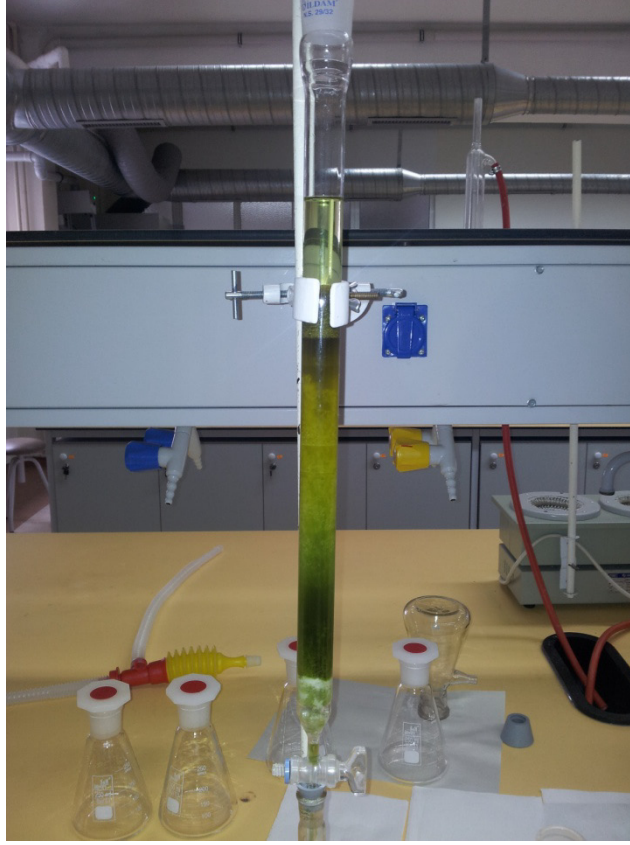
Bitki örnekleri, Elazığ: Malatya-Elazığ 30. km, 1150 m, yol kenarı, konumundan çiçeklenme dönemi olan 15-22 Haziran 2011 tarihleri arasında toplanmıştır. Bitkilerin teşhisi Yrd. Doç. Dr. Faik Ahmet Karavelioğulları (Hakkâri Üniversitesi, Yüksekova Meslek Yüksek Okulu) tarafından yapılmıştır. Toplanan bitki örneklerinin toprak üstü kısımları doğrudan güneş ışığının olmadığı oda sıcaklığında 2 hafta süre ile uygun koşullarda kurutularak, bitki öğütme değirmeni ile mekanik olarak parçalanarak toz haline getirilmiştir 430 gr. öğütülmüş bitki örneği soxhlet apereyinde sırasıyla polar olmayan n-hekzan, orta düzeyde polariteye sahip diklorometan ve polar bir bileşik olan metanol ile 8 saat süreyle ekstre edilmiştir (Şekil 2.2) [43,72,73,117].



Şekil 2.2. Soxhlet apereyinde ekstrelerin elde edilmesi

2.2.2. Diklorometan Ekstresinden Fraksiyonların Elde Edilmesi

1.5 gr diklorometan ekstresi tartılmıştır. Bir miktar hekzan ve silika jel karışımı ile kuruyana kadar muamele edilmiştir. Bu karışım vakumlu kolon kromatografisi (flash kolon kromatografisi) ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Sırasıyla hekzan (100 mL), hekzan - etilasetat (1:1, 100 mL), etilasetat (100 mL), etilasetat - metanol (1:1, 200mL), metanol (100 mL), %2 formik asitli - metanol (100 mL) fraksiyonları elde edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Fraksiyonların flash kromatografi de elde edilmesi

2.2.3. Fraksiyonların İnce Tabaka Kromatografisi İle İncelemesi

Çözücü sistem olarak hekzan-etil asetat (1:1) kullanılmıştır. Sonuçlar UV ışığı altında 365 nm' de alınmıştır.

Bitkilerin öğütülmesi, ekstre ve fraksiyonların elde edilmesi ve ince tabaka kromatografisi (İTK) incelemeleri Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim dalında Prof. Dr. Neşe Kırımer ve ekibinin yardımlarıyla gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları, Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

2.2.4.1. Hücrelerin Üretilmesi

MCF-7 meme kanseri hücre dizisi 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin, 2 mM L-glutamin ve 10% fetal sığır serumu içeren DMEM besiyeri kullanılarak 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde üretilmiştir. Sitotoksik etkinin belirlenmesi için MTT ve ATP testleri yapılmıştır. Kaba ekstratlar ve fraksiyonlar DMSO da çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır [44,72,118].

Çizelge 2.1.' de uygulanan örneklerin ilk kuyucuktaki konsantrasyonları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Uygulanan örneklerin ilk kuyucuktaki konsantrasyonları

Örnekler		İlk kuyucuktaki konsantrasyon (µg/mL)
Kaba ekstratlar	Diklorometan	500
	Hekzan	250
	Metanol	650
Diklorometan ekstratı fraksiyonları	Etilasetat-Metanol (1:1)	1400
	Etilasetat	450
	Metanol	100
	%2 Formik asit-Metanol (1:1)	16
	Hekzan	1250
	Hekzan-Etilasetat (1:1)	10000

2.2.4.2. MTT Testi

96 kuyucuğa 100'er µL besiyeri eklenmiştir . Test edilecek kaba ekstratlar ve fraksiyonların stok çözeltilerden ilk kuyucuklara üç tekrar olacak şekilde 100' er µL ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır. Kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde plakalara hücreler ekilmiştir. Hücreler pozitif kontrol olarak hidrojen peroksitle muamele edilmiştir. Sadece besiyeri ile muamele edilen hücreler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun sonunda her kuyucuğa MTT çözeltisi eklenip 4 saat bekletildikten sonra her kuyucuğa çözücü tampon SDS ilave

edilmiştir. 16 saat inkübasyondan sonra örneklerin absorbansı mikropılaka okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda okunmuştur. DMSO nun kuyucuklardaki konsantrasyonu %0.3' ü geçmemiştir [119].

2.2.4.3. ATP Testi

96 kuyucuğa 100'er µL besiyeri eklenmiştir . Test edilecek kaba ekstreler ve fraksiyonların stok çözeltilerden ilk kuyucuklara üç tekrar olacak şekilde 100' eµL ilave edilerek seri dilüsyon yapılmıştır. Kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde plakalara hücreler ekilmiştir. Hücreler pozitif kontrol olarak hidrojen peroksitle muamele edilmiştir. Sadece besiyeri ile muamele edilen hücreler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun sonunda her bir kuyucuğa ATP ekstraksiyonu için hücre parçalayıcı çözeltiden eklenmiştir. Mikroplakalar 20 dakika oda sıcaklığında bekletilip her bir kuyucuktaki örnek lüminometrik okuma için kullanılan beyaz plakalara transfer edilmiştir. Lusiferaz çözeltisi eklendikten sonra plakalar lüminometrede okunmuştur [120].

2.2.5. Apoptozun Tespiti

2.2.5.1. İkili Boyama

Hücreler, 6 kuyulu plakalara $5 \times 10^5/2$ ml olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra anlamlı sitotoksik aktivite gösteren örneklerin IC₅₀ ve IC₉₀ dozlarını içeren besiyeri eklenmiştir. 48 saat inkübasyonun ardından hücrelerin üzerindeki süpernatantlar tüplere toplanmıştır. Yapışmış olan hücreler ise tripsin-EDTA ile muamele edilerek plakalardan toplanmıştır. Hücre süspansiyonu 5 dakika 600xg'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır, üzerlerine ikili boyama çözeltisi (RNase, hoechst 33342, (PI)) eklenmiştir. Kararıkta 37⁰C de 15-20 dakika bekletildikten sonra, mikroskopta incelenmiştir. Hoechst apoptotik ve canlı hücreleri boyarken, PI nekrotik hücreleri boyar. Böylece hücrelerin morfolojik değerlendirilmesine bağlı

olarak apoptoz veya nekroz sonucu öldükleri anlaşılıp apoptotik ve nekrotik hücre durumu gözlenmiştir [121].

3. SONUÇLAR

3.1. Ekstrelerin ve Fraksiyonların Verimi

Elde edilen ekstrelerin bitkideki yüzde verimleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ekstrelerin bitkideki yüzde verimleri

	Diklorometan	Metanol	Hekzan
Verim (%)	1.02	7.02	1.40

En yüksek verim %7.02 ile metanol ekstresinden elde edilmiştir (Çizelge 3.1).

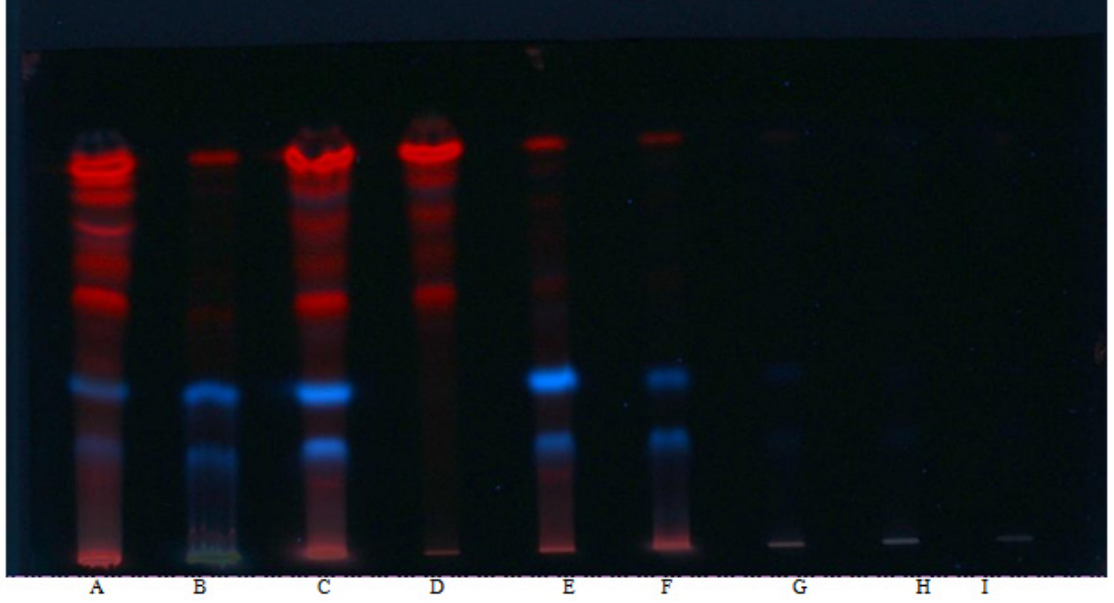
Diklorometan ekstresinden elde edilen fraksiyonların ekstredeki yüzde verimleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Diklorometan ekstresinden elde edilen fraksiyonların ekstredeki yüzde verimleri

	Hekzan	Hekzan - Etilasetat	Etilasetat	Etilasetat – Metanol	Metanol	%2 Formik asit – Metanol
Verim (%)	8.97	47.10	11.95	37.70	2.67	0.72

Diklorometan ekstresindeki en yüksek verim %47.10 ile hekzan - etilasetat fraksiyonundan elde edilmiştir (Çizelge 3.2).

İTK ile hekzan, metanol, diklorometan ekstreleri ve diklorometan ekstresinden elde edilen hekzan, hekzan-etilasetat, etilasetat, etilasetat-metanol, metanol, %2 formik asitli metanol fraksiyonlarının UV ışığı altında 365 nm de elde edilen görüntüleri Şekil 3.1.' de verilmiştir;



Şekil 3.1. Ekstre ve diklorometan ekstresi fraksiyonlarının İTK görüntüsü, A, hekzan ekstresi; B, metanol ekstresi; C, diklorometan ekstresi; D, diklorometan, hekzan fraksiyonu; E, diklorometan, hekzan-etilasetat (1:1) fraksiyonu; F, diklorometan, etilasetat fraksiyonu; G, diklorometan, etilasetat-metanol fraksiyonu (1:1); H, diklorometan, metanol fraksiyonu; I, diklorometan, %2 formik asitli metanol fraksiyonu

3.2. Sitotoksosite Sonuçları

3.2.1. MTT Sonuçları

MTT testine göre, MCF-7 hücre dizilerine uygulanan örneklere ait yüzde inhibisyon değerleri bulmak için, örneklerin mikropłaka okuyucu ile elde edilen optik dansite (OD) değerleri kullanılmıştır ve aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Yüzde İnhibisyon} = (1 - (\text{örnek OD} - \text{pozitif kontrol OD}) / (\text{negatif kontrol OD} - \text{pozitif kontrol OD})) * 100$$

Bu formüle göre, MCF-7 hücre dizileri için konsantrasyon-ortalama yüzde inhibisyon değerleri Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4.' te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Ekstrelerin MCF-7 hücre dizisi üzerine konsantrasyon-ortalama yüzde inhibisyon değerleri

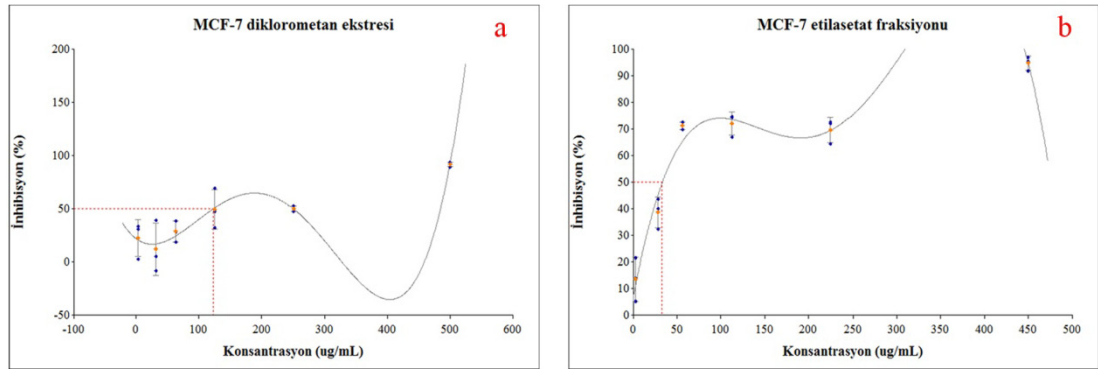
MCF-7 hücre dizisi				
Bitki Ekstresi	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama İnhibisyon (%)	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı (%)
Diklorometan	500	91,999	2,112	2,3
	250	50,408	2,404	4,77
	125	49,743	18,63	37,5
	62,5	28,869	10,097	35
	31,25	12,254	24,701	202
	3,125	22,497	17,311	76,9
Metanol	650	35,149	3,994	11,4
	325	42,964	4,772	11,1
	162,5	6,404	12,246	191
	81,25	21,58	15,902	73,7
	40,625	9,999	27,019	270
	4,0625	31,491	8,291	26,3
Hekzan	250	37,716	15,622	41,4
	125	9,268	6,923	74,7
	62,5	11,281	20,232	179
	31,25	29,901	12,363	41,3
	15,625	-7,344	9,3	-127
	1,5625	13,796	15,933	115

Çizelge 3.4. Diklorometan fraksiyonlarının MCF-7 hücre dizisi üzerine konsantrasyon-ortalama yüzde inhibisyon değerleri

MCF-7 Hücre Dizisi				
Fraksiyonlar	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama İnhibisyon (%)	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı (%)
Hekzan - etil asetat (1:1)	1000	15,519	6,247	40,3
	500	10,424	12,794	123
	250	4,83	14,721	305
	125	13,824	6,722	48,6
	62,5	13,777	3,856	28
	6,25	9,897	7,506	75,8
%2 Formik asit - metanol	16	13,765	4,376	31,8
	8	2,959	9,141	309
	4	2,322	7,589	327
	2	-1,919	3,656	-191
	1	-2,155	5,522	-256
	0,1	13,282	13,456	101
Metanol	100	43,983	3,21	7,3
	50	30,61	10,702	35
	25	29,997	13,626	45,4
	12,5	20,134	2,045	10,2
	6,25	20,645	8,331	40,4
	0,625	8,911	2,505	28,1
Etil asetat	450	94,878	2,578	2,72
	225	69,741	4,659	6,68
	112,5	72,112	4,335	6,01
	56,25	71,29	1,521	2,13
	28,125	38,751	5,81	15
	2,8125	13,622	8,258	60,6
Etil asetat – metanol (1:1)	1400	95,804	0,825	0,861
	700	82,256	1,801	2,19
	350	87,378	1,07	1,22
	175	49,932	4,642	9,3
	87,5	30,371	10,375	34,2
	8,75	27,387	13,877	50,7
Hekzan	125	19,328	10,4	53,8
	62,5	7,658	7,816	102
	31,25	6,201	9,155	148
	15,625	0,865	4,814	556
	7,8125	2,059	5,767	280
	0,78125	5,513	5,734	104

Konsantrasyon ve ortalama yüzde inhibisyon değerleri Biotek Gen5 yazılımı ile 4 parametrelili polinomial regresyon eğrisi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. NCI verilerine göre [122] IC₅₀ değeri 150 µg/mL' den yüksek olan örneklerle çalışılmaya devam edilmeyecektir. Buna göre MCF-7 hücre dizisi için diklorometan ekstresi, etil asetat fraksiyonu açısından anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Bu rnekler için yüzde inhibisyon-konsantrasyon grafikleri Biotek Gen5 yazılımı ile çizilmiştir.

şekil 3.2.'de diklorometan ekstresi ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu için IC₅₀ değerine karşılıklı gelen konsantrasyonlar grafiksel olarak verilmiştir.

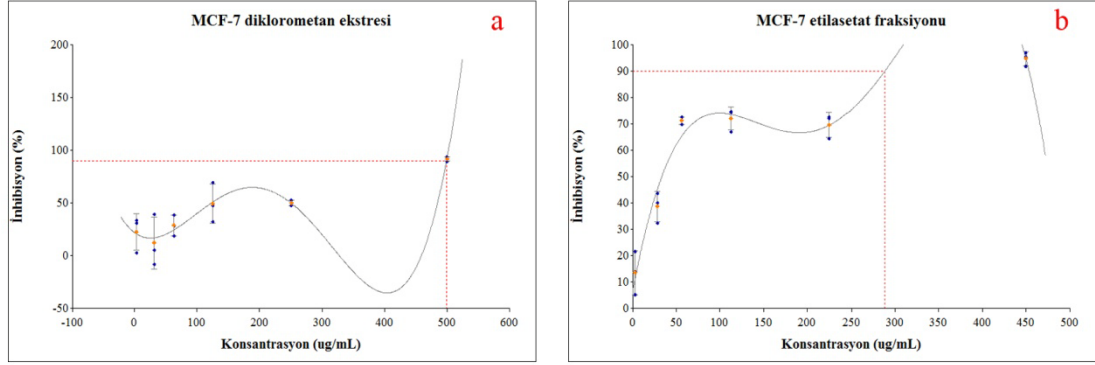


şekil 3.2. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC₅₀ değeri

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan ekstresinin IC₅₀ değeri 122.521 µg/mL olarak bulunmuştur (şekil 3.2.).

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan, etilasetat fraksiyonu için IC₅₀ değeri 33.121 µg/mL olarak bulunmuştur (şekil 3.2.).

Aynı örnekler için IC₉₀ değerleri hesaplanmış ve Şekil 3.3.' te grafiksel olarak verilmiştir.



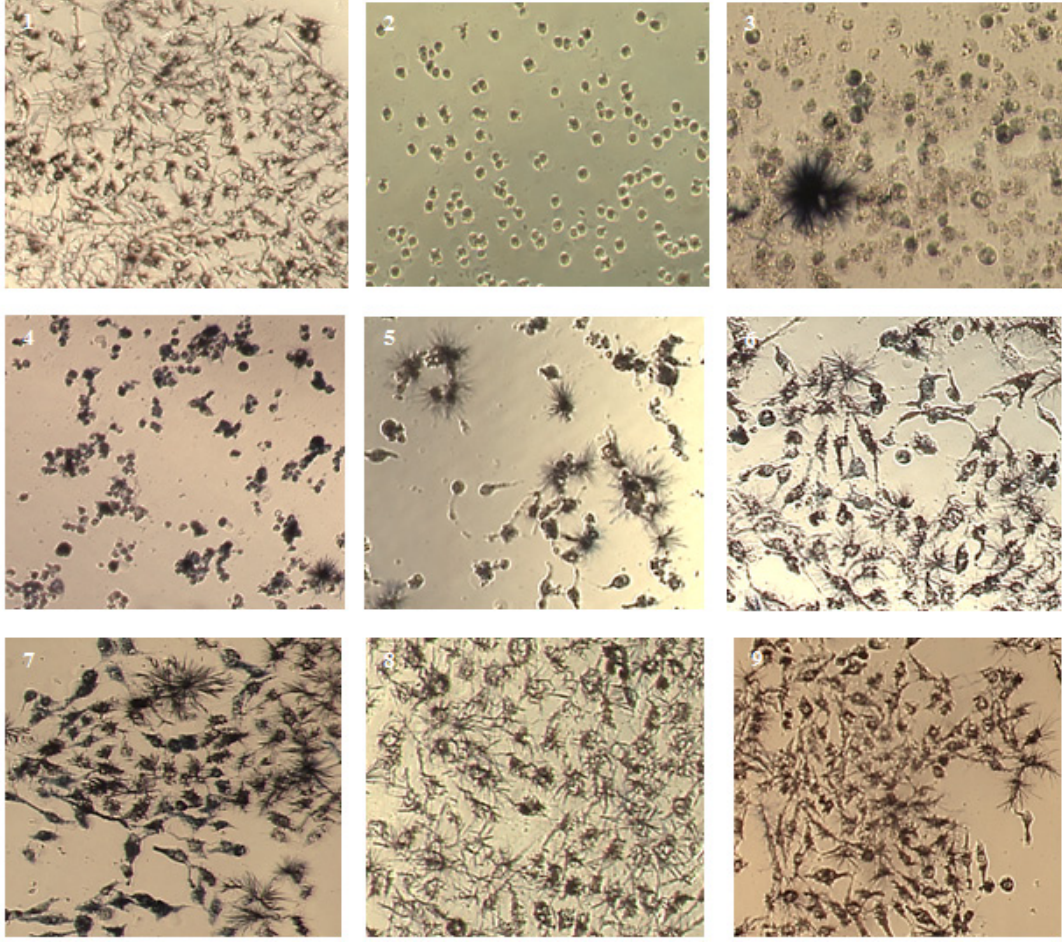
Şekil 3.3. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC₉₀ değeri

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan ekstresinin IC₉₀ değeri 499.361 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.3.).

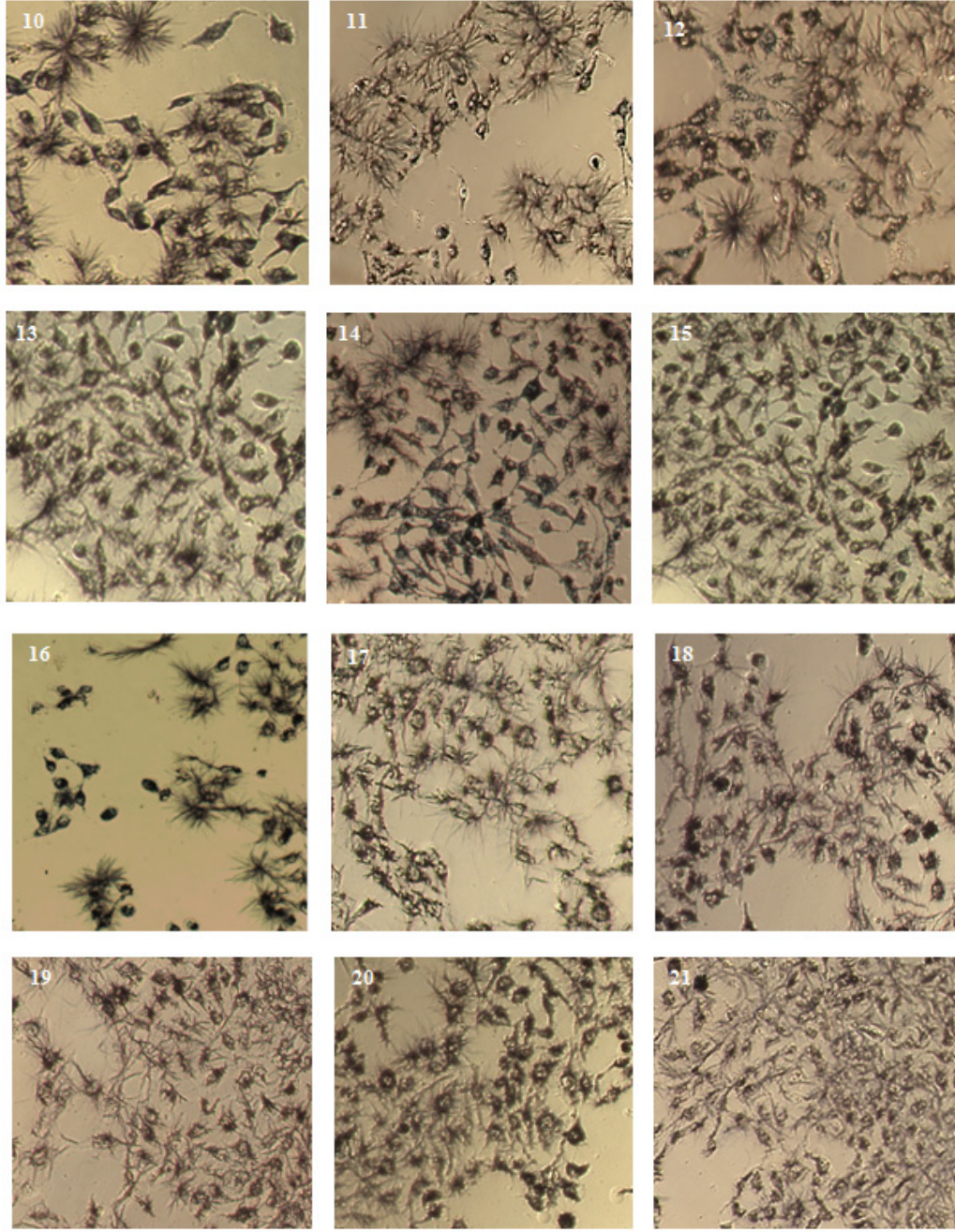
MCF-7 hücre dizileri için diklorometan, etilasetat fraksiyonu için IC₉₀ değeri 287.916 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.3.).

MTT testine göre MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik açıdan en etkin örnek diklorometan, etil asetat fraksiyonu olarak tespit edilmiştir.

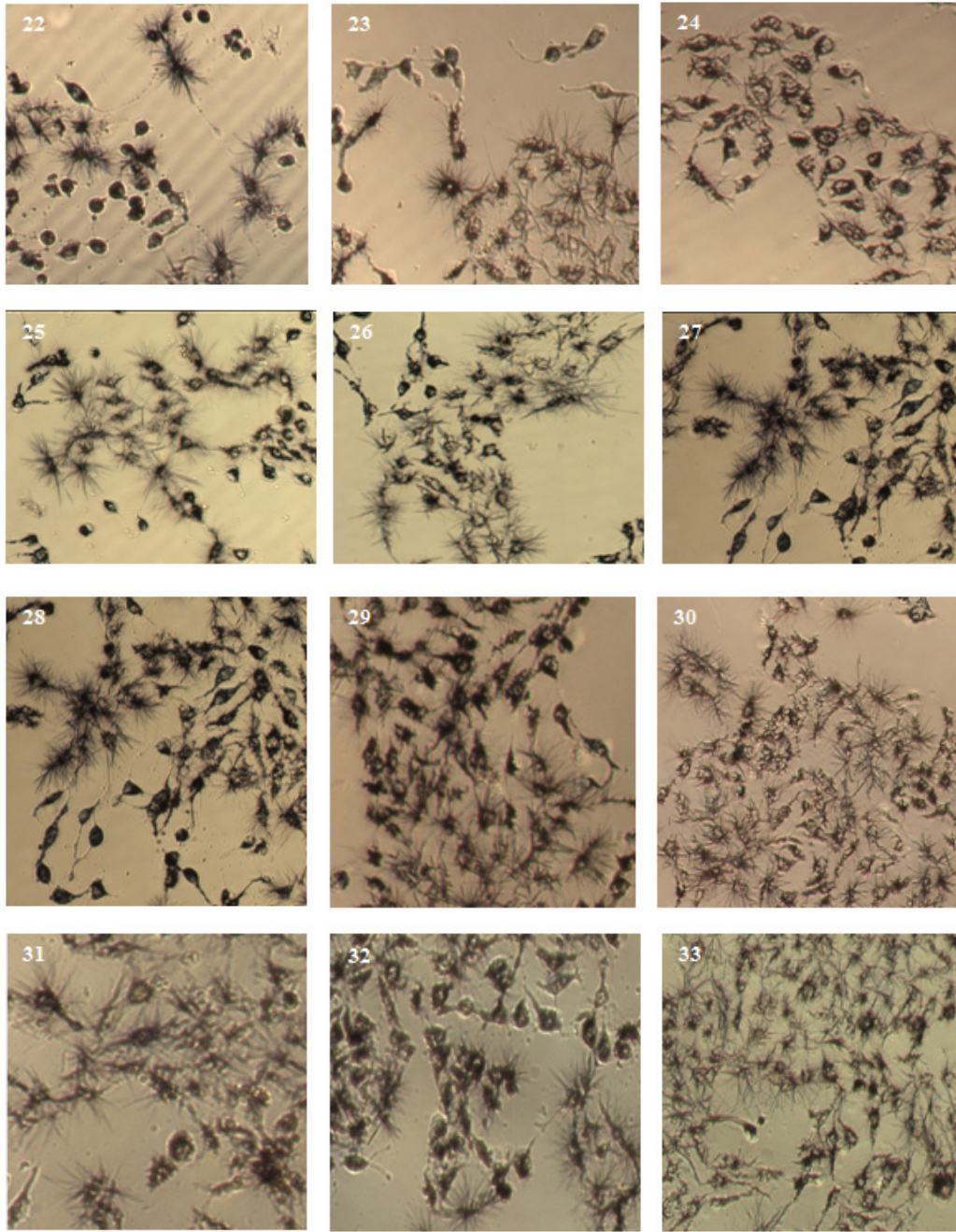
MCF-7 hücrelerine uygulanan örneklerin, pozitif ve negatif kontrol gruplarının MTT sonuçlarının mikroskopik görüntüleri Şekil 3.4., Şekil 3.5., Şekil 3.6., Şekil 3.7. ve Şekil 3.8.' da verilmiştir;



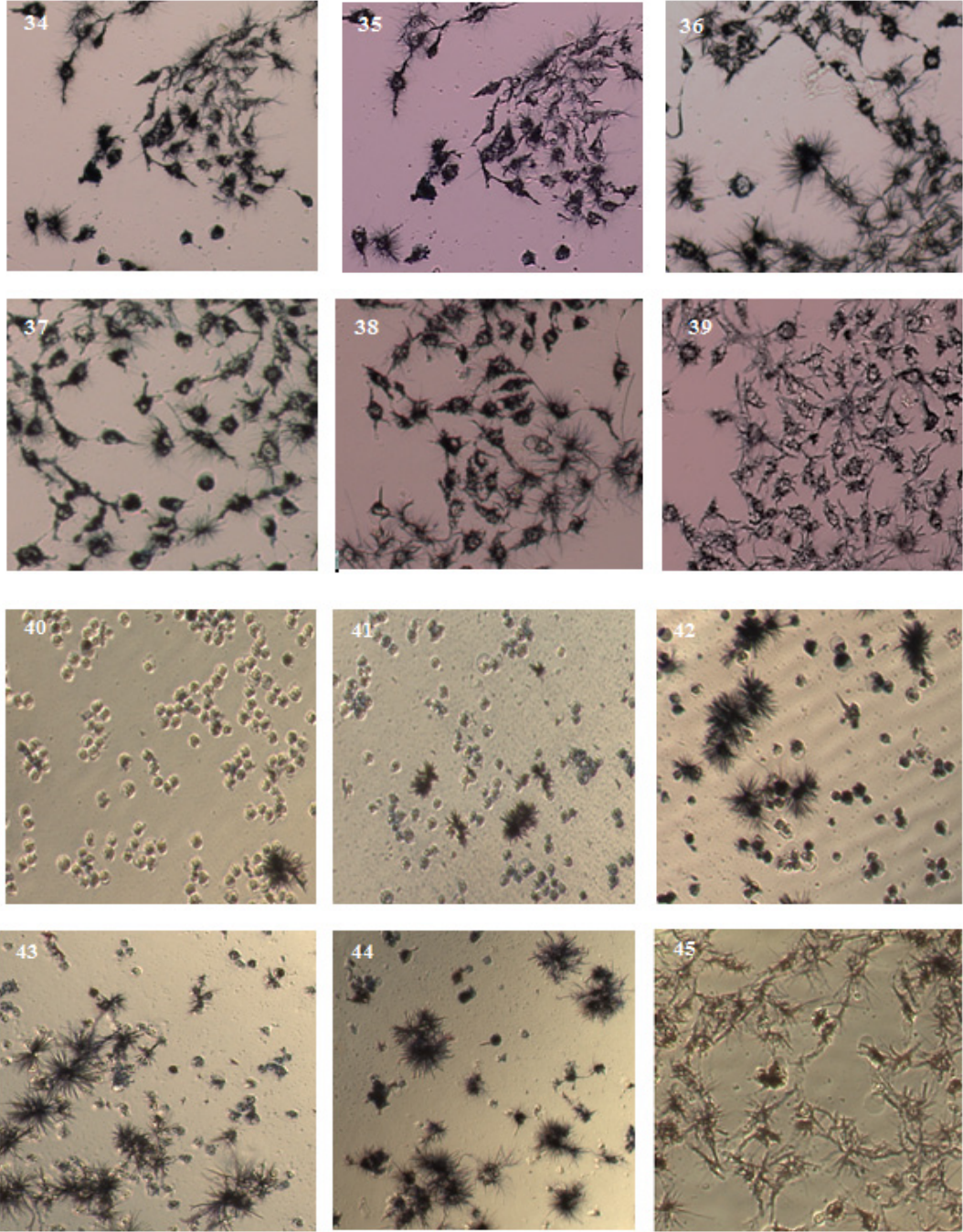
Şekil 3.4. MCF-7 hücre dizisi için kaba ekstraktların MTT inverted mikroskop görüntüleri (10x); Negatif kontrol (1), Pozitif kontrol (2), 200 TDC Sindaksel (3), 500 µg/mL diklorometan (4), 250 µg/mL diklorometan (5), 125 µg/mL diklorometan (6), 62.5 µg/mL diklorometan (7), 31.25 µg/mL diklorometan (8), 3.125 µg/mL diklorometan (9)



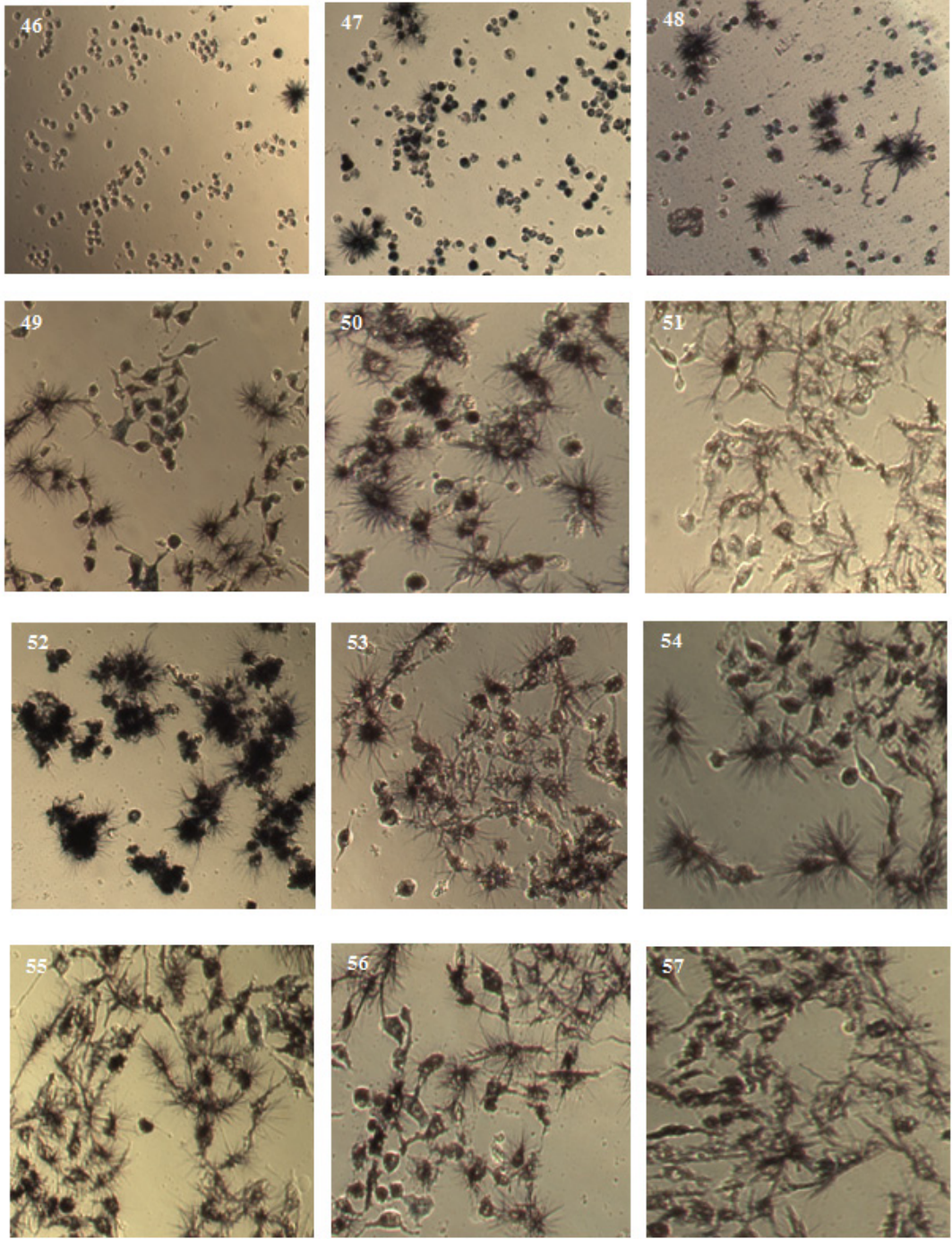
Şekil 3.5. MCF-7 hücre dizisi için kaba ekstraktların MTT inverted mikroskop görüntüleri (10x); 500 µg/mL metanol (10), 250 µg/mL metanol (11), 125 µg/mL metanol (12), 62.5 µg/mL metanol (13), 31.25 µg/mL metanol (14), 3.125 µg/mL metanol (15), 250 µg/mL hekzan (16), 125 µg/mL hekzan (17), 62.5 µg/mL hekzan (18), 31.25 µg/mL hekzan (19), 15.6 µg/mL hekzan (20), 1.56 µg/mL hekzan (21)



Şekil 3.6. MCF-7 hücre dizisi için dikolorometan fraksiyonları, MTT inverted mikroskop görüntüleri (10x); 10000 µg/mL hekzan-etilasetat (22), 5000 µg/mL hekzan-etilasetat (23), 2500 µg/mL hekzan-etilasetat (24), 1250 µg/mL hekzan-etilasetat (25), 625 µg/mL hekzan-etilasetat (26), 6.25 µg/mL hekzan-etilasetat (27), 16 µg/mL %2 formik asit-metanol (28), 8 µg/mL %2 formik asit-metanol (29), 4 µg/mL %2 formik asit-metanol (30), 2 µg/mL %2 formik asit-metanol (31), 1 µg/mL formik asit-metanol (32), 0.1 µg/mL %2 formik asit-metanol (33)



Şekil 3.7. MCF-7 hücre dizisi için dikolorometan fraksiyonları, MTT inverted mikroskop görüntüleri (10x); 100 µg/mL metanol (34), 50 µg/mL metanol (35), 25 µg/mL metanol (36), 12.5 µg/mL metanol (37), 6.25 µg/mL metanol (38), 0.625 µg/mL metanol (39), 450 µg/mL etilasetat (40), 225 µg/mL etilasetat (41), 112.5 µg/mL etilasetat (42), 56.25 µg/mL etilasetat (43), 28.1 µg/mL etilasetat (44), 2.81 µg/mL etilasetat (45)



Şekil 3.8. MCF-7 hücre dizisi için fraksiyonların MTT inverted mikroskop görüntüleri (10x); 1400 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (46), 700 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (47), 350 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (48), 175 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (49), 87.5 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (50), 8.75 µg/mL etilasetat-metanol (1:1) (51), 1250 µg/mL hekzan (52), 625 µg/mL hekzan (53), 312.5 µg/mL hekzan (54), 156.25 µg/mL hekzan (55), 78.1 µg/mL hekzan (56), 7.81 µg/mL hekzan (57)

3.2.2. ATP Testi Sonuçları

MTT sonuçlarına göre MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi anlamlı olduğu tespit edilen diklorometan ekstresi ve diklorometan etilasetat fraksiyonu için ATP testi yapılmıştır. Bu örnekler için yüzde inhibisyon değerleri lüminometreden elde edilen relatif ışık ünitesi (RLU) değerleri kullanılmıştır ve aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Yüzde İnhibisyon} = (1 - (\text{örnek RLU} - \text{pozitif kontrol RLU}) / (\text{negatif kontrol RLU} - \text{pozitif kontrol RLU})) * 100.$$

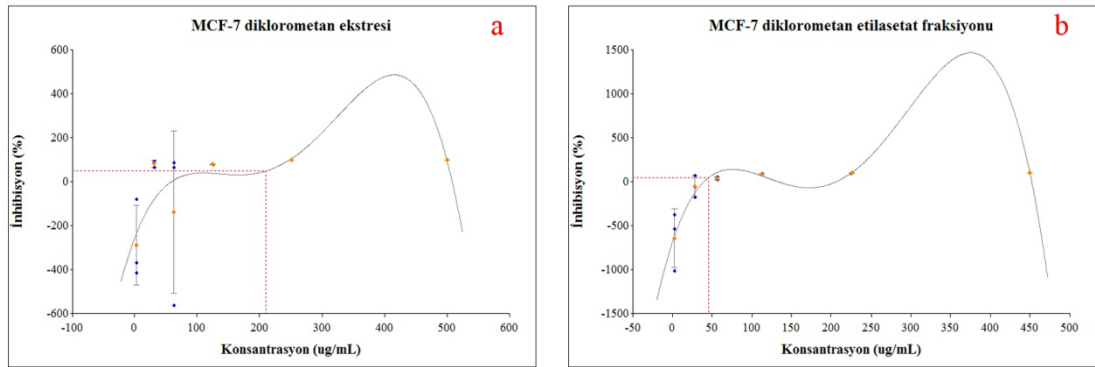
Buna göre MCF-7 hücre dizileri için ATP testi ile elde edilen diklorometan ekstresi ve diklorometan etilasetat fraksiyonu için RLU değerlerine göre konsantrasyon-ortalama yüzde inhibisyon değerleri Çizelge 3.5.' te verilmiştir;

Çizelge 3.5. MCF-7 hücre dizisi üzerine diklorometan, etilasetat fraksiyonu ve diklorometan ekstresinin konsantrasyon-ortalama yüzde inhibisyon değerleri

Örnekler	Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama İnhibisyon (%)	Standart Sapma	Varyasyon Katsayısı (%)
Etilasetat	450	100	0	0,0451
	225	100	0	0,0667
	112,5	89	5	5,45
	56,25	39	15	38,8
	28,125	-50	122	-241
	2,8125	-638	333	-52,2
Diklorometan	500	100	0	0,102
	250	100	0	0,0273
	125	80	0	0,575
	62,5	-136	370	-272
	31,25	83	16	19,3
	3,125	-287	181	-63,1

Diklorometan ekstresi ve diklorometan, etilasetat fraksiyonu için konsantrasyon ve ortalama yüzde inhibisyon değerleri Biotek Gen5 yazılımı ile 4 parametrelilik polinomial regresyon eğrisi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Bu örnekler için yüzde inhibisyon - konsantrasyon grafikleri çizilmiştir.

Şekil 3.9.'da diklorometan ekstresi ve diklorometan, etilasetat fraksiyonu için IC_{50} değerine karşılık gelen konsantrasyonlar grafiksel olarak verilmiştir.

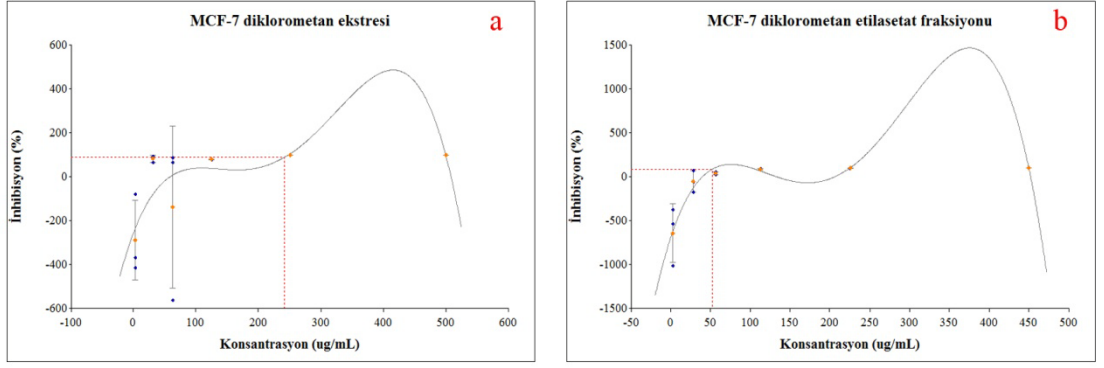


Şekil 3.9. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC_{50} değeri

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan ekstresinin IC_{50} değeri 210.787 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.9.).

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan, etilasetat fraksiyonu için IC_{50} değeri 45.771 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.9.).

Aynı örnekler için IC_{90} değerleri hesaplanmış ve Şekil 3.10.'da grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 3.10. Diklorometan ekstresi (a) ve diklorometan, etil asetat fraksiyonu (b) için IC₉₀ değeri

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan ekstresinin IC₉₀ değeri 241.935 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.10.).

MCF-7 hücre dizileri için diklorometan, etilasetat fraksiyonu için IC₉₀ değeri 52.419 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 3.10.).

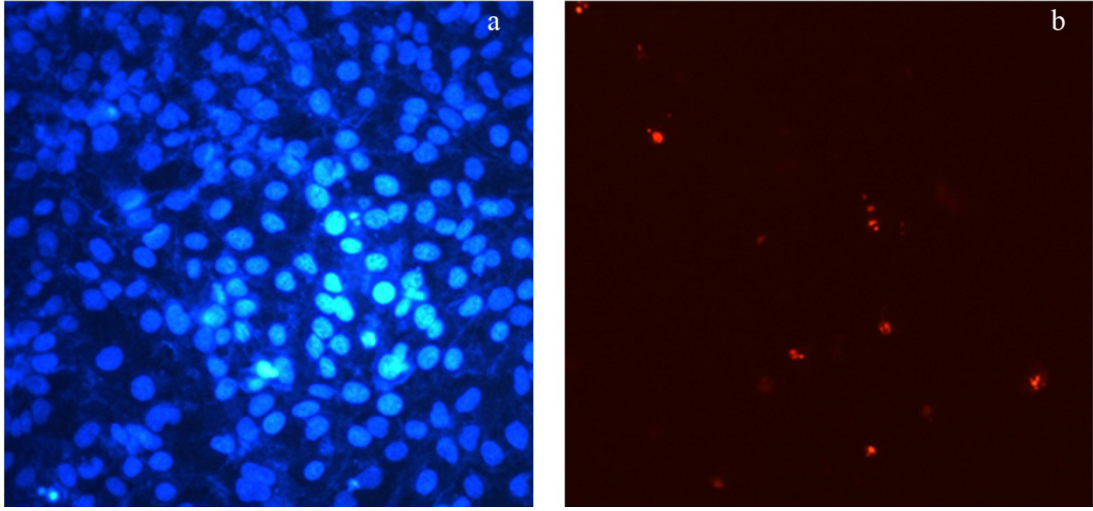
ATP testine göre de MCF-7 hücre dizileri üzerine sitotoksik açıdan en etkin örneğin diklorometan, etil asetat fraksiyonu olduğu tespit edilmiştir.

3.3. Apoptoz Sonuçları

3.3.1. İkili Boyama Sonuçları

MTT testinden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu, diklorometan ekstresi ve diklorometan, etilasetat fraksiyonunun IC₅₀ ve IC₉₀ dozları MCF-7 meme kanseri hücre dizisine uygulanmış, apoptotik ve nekrotik hücre durumu floresan mikroskopunda değerlendirilmiştir.

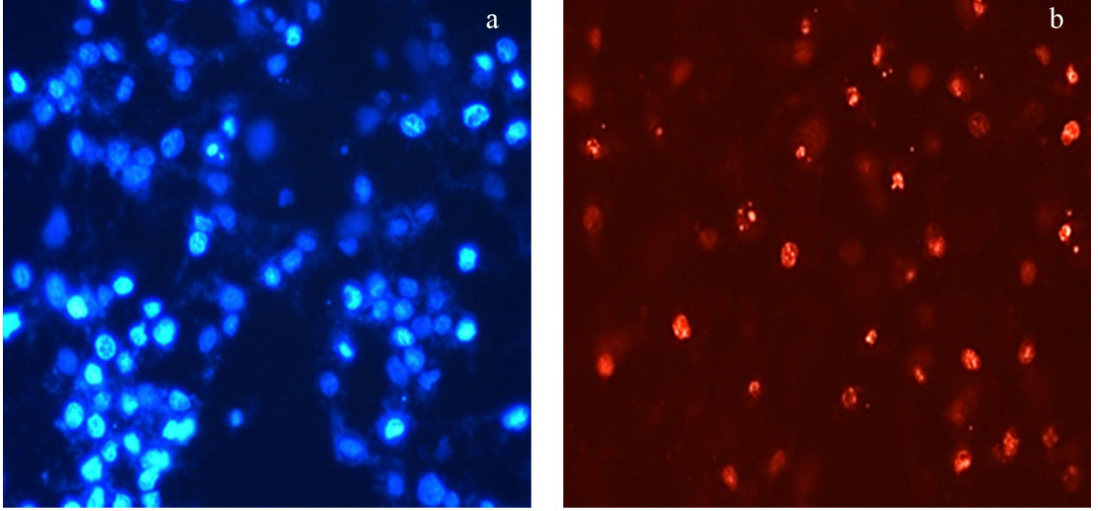
Şekil 3.11.' de kontrol grubunun floresan mikroskobik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.11. Kontrol grubunda aynı alanda, hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

Şekil 3.11.' de PI (kırmızı boyanan hücreler) ile boyanan hücreler ölü hücreleri göstermektedir. Buna göre kontrol grubunda ölüm oranı yaklaşık % 1' dir.

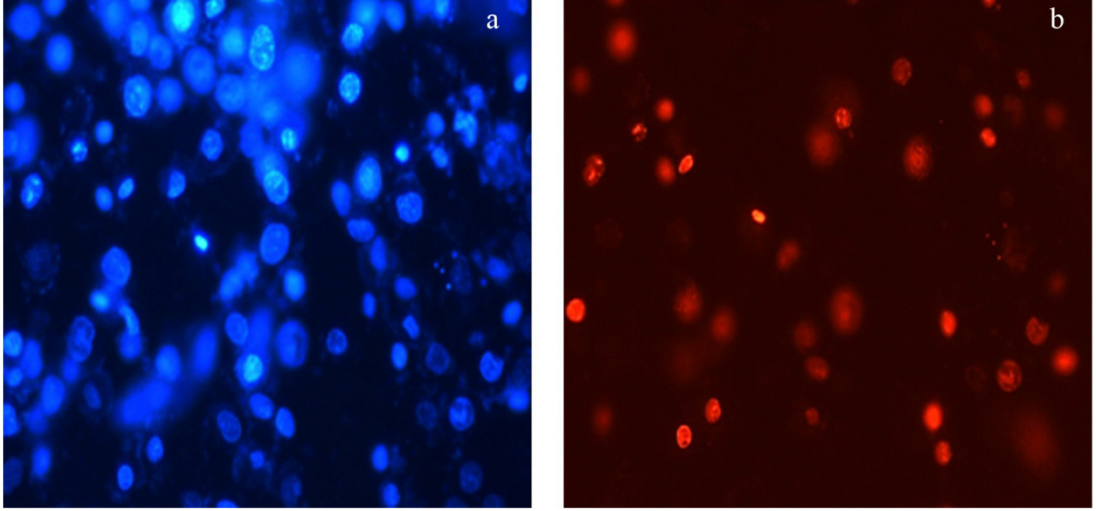
Şekil 3.12.' de diklorometan ekstresinin IC_{50} dozunun floresan mikroskobik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.12. Diklorometan ekstresinin IC_{50} dozunun aynı alanda, hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

Şekil 3.12.' de hoechst (a) ile boyanan hücrelerde, diklorometan ekstresinin IC_{50} dozunun apoptotik fragment nukleuslu hücrelerin (erken apoptoz) oluşmasına neden olduğu görülmektedir. PI (b) ile boyanan hücrelerde ise hücre membranının bütünlüğünü kaybettiği görülmektedir.

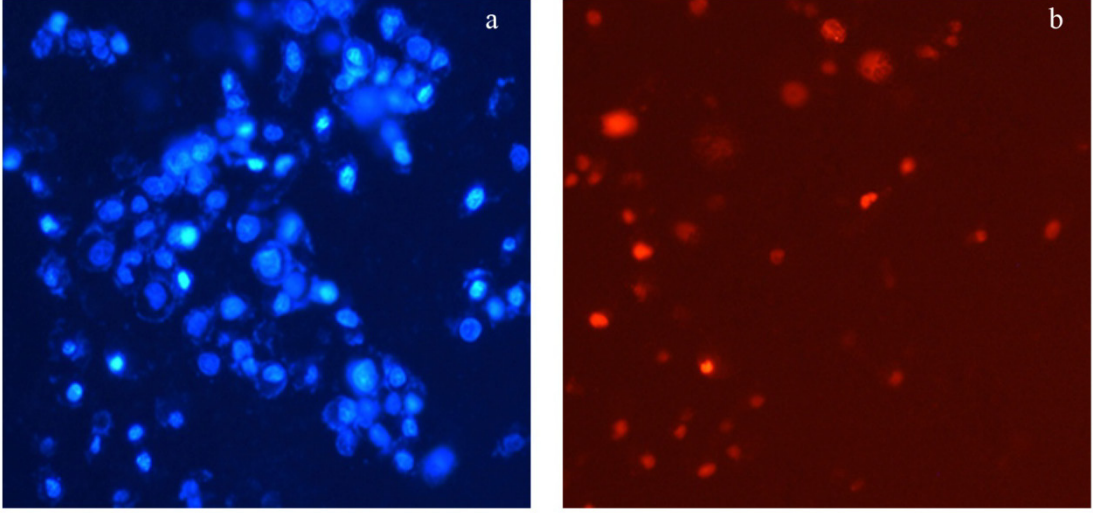
Şekil 3.13.' de diklorometan ekstresinin IC_{90} dozunun floresan mikroskopik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.13. Diklorometan ekstresinin IC₉₀ dozunun aynı alanda, hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

Şekil 3.13.' de hoechst (a) ile boyanan hücrelerde erken apoptoz görülse de aynı alanda PI (b) ile boyanan hücrelerde genellikle piknotik nukleuslu hücrelere rastlanmaktadır. Buda hücrelerin bu dozda sekonder nekroza ya da geç apoptoza gittiğini göstermektedir. Ölüm oranı yaklaşık %30' dur.

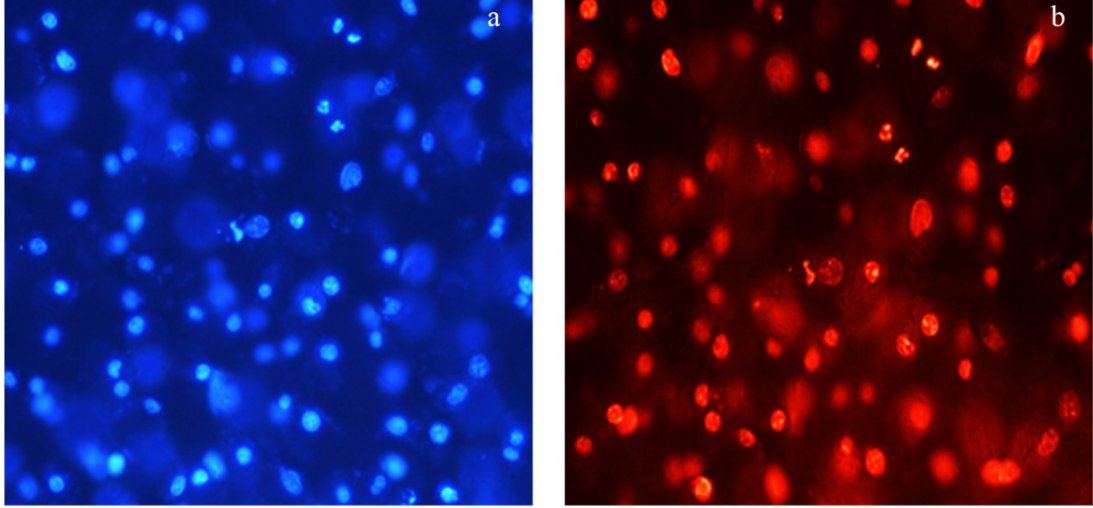
Şekil 3.14.' te diklorometan, etil asetat fraksiyonunun IC₅₀ dozunun floresan mikroskopik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.14. Diklorometan, etil asetat fraksiyonunun IC_{50} dozunun aynı alanda, hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

Şekil 3.14.' te, bu dozda aynı alanda hücrelerin genelde hem hoechst (a) hem de PI (b) ile boyandığı görülmektedir. Buna göre çekirdek yapıları da dikkate alındığında hücrelerin genel de sekonder nekroza gittiği görülmektedir. Yaklaşık ölüm oranı ise %90' dır.

Şekil 3.15.' te diklorometan, etil asetat fraksiyonunun IC₉₀ dozunun floresan mikroskopik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.15. Diklorometan, etil asetat fraksiyonunun IC₉₀ dozunun aynı alanda, hoechst (a) ve PI (b) ile boyanan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

Şekil 3.15.' te, bu dozda aynı alanda hücrelerin genelde hem hoechst (a) hem de PI (b) ile boyandığı görülmektedir. Buna göre hücrelerin çekirdek yapıları da dikkate alındığında çok az sayıda hücrenin erken apoptoz da olduğu, genellikle primer nekroza gittikleri görülmüştür. Ölüm oranı yaklaşık %100' dür.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye için endemik bir bitki olan *C. fenzlii* bitkisinin diklorometan, metanol ve hekzan ekstreleri kullanılarak MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

Bitkiden elde edilen üç farklı ekstre içerisinde en yüksek verim %7.02 ile metanol ekstresinden elde edilmiştir. Karamenderes ve arkadaşlarının [123] yaptığı çalışmada, *C. calolepis*, *C. cariensis* subsp. *maculiceps*, *C. cariensis* subsp. *microlepis*, *C. hierapolitana*, *C. cadmea*, *C. ensiformis*, *C. Depressa* ve *C. urvillei* subsp. *urvillei* bitkilerinden n-hekzan, kloroform, metanol ekstreleri elde edilmiş ve en yüksek verimler metanol ekstrelerinden elde edilmiştir. Shoeb ve arkadaşlarının [17] yaptığı çalışmada *Centaurea urvillei* subs. *armata*, *Centaurea mucronifera* bitkileri n-hekzan, diklorometan ve metanol ile ekstre edilmiş ve en yüksek verimin metanol ekstresinden olduğu tespit edilmiştir. Löffler ve arkadaşlarının [124] yaptığı çalışmada çözücü olarak hekzan, kloroform, metanol ve su kullanılmış, *C. biebersteinii* bitkisinde en yüksek verim metanol ekstresinden elde edilmiştir. Bu çalışmalarda en yüksek verimin metanol ekstrelerinden elde edilmesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Löffler ve arkadaşları [124] *C. jacea* ve *C. spinulosa* bitkilerinde ise en yüksek verimi su ekstresinden elde etmişlerdir. Bu sonuçlar sonraki çalışmalarımızda suyun son çözücü sistem olarak kullanılabilmesi hakkında fikir vermektedir. Seghiri ve arkadaşları [125] yaptıkları çalışmada *C. africana* bitkisinden ekstre elde etmek için kloroform, etilasetat ve bütanol kullanmışlar ve en yüksek verimi bütanol ekstresinden elde etmişlerdir. Bu çalışmada ekstre elde ederken farklı bir çözücü sistem kullanılabilmesini göstermektedir.

Ekstrelerin sitotoksik etkilerine ilk önce MTT testi ile bakılmış ve diklorometan ekstresinin diğer ekstrelerle oranla MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Shoeb ve arkadaşları [72] yaptıkları bir çalışmada *C. gigantea* bitkisinden üç farklı ekstre elde etmişlerdir. Bu ekstreleri içerisinde CaCo-2 kolon kanseri hücre dizisi üzerine en yüksek ve anlamlı sitotoksik etkiyi metanol ekstresinde tespit etmişlerdir. Shoeb ve arkadaşlarının [17] yaptığı

diğer bir çalışmada *C. urvillei* subs. *Armata* ve *C. mucronifera* bitkilerinin metanol ekstresinin CaCo-2 kolon kanseri hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisinin diğer ekstrelele oranla daha yüksek ve anlamlı olduğunu görülmüştür. Aynı cinse ait bitki türlerinden benzer ve etken maddeler bulunabilir [117]. Fakat bu çalışmalarda *Centaurea* cinse ait türler kullanılsa da farklı kanser hücre dizileri üzerinde sitotoksik açıdan diklorometan ekstresi yerine metanol ekstresi etkili olmuş olabilir. Löffler ve arkadaşları [124] yaptıkları çalışmada *C. biebersteinii*, *C. jacea* ve *C. spinulosa* bitkilerinin kloroform ekstresinin HeLa servikal kanser hücre dizileri, MCF-7 meme kanseri hücre dizileri ve A431 epidermal kanser hücre dizileri üzerinde en yüksek sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu alışmada MCF-7 meme kanseri hücre dizileri kullanılmasına rağmen farklı üzücü sistemleri ile ekstreler elde edilmiştir. Genel olarak çalışmalarda farklı üzücü sistemlerinin veya farklı kanser hücre dizilerinin kullanılması sitotoksik etki gösteren ekstrelerin farklı olmasının nedeni olabilir.

Sitotoksik etkisi en yüksek bulunan diklorometan ekstresinden heksan, heksan-etilasetat (1:1), etilasetat, etilasetat-metanol (1:1), metanol, %2 formik asitli metanol fraksiyonları elde edilmiş ve yüzde verimleri belirlenmiştir. Bu fraksiyonların içerisinde en yüksek verim sırasıyla heksan-etilasetat (1:1) ve etilasetat-metanol (1:1) fraksiyonlarından elde edilmiştir. Kolli ve arkadaşları [126] *C. omphalotricha* bitkisinden 25 fraksiyon elde etmişler, kloroform ekstresinden elde edilen petroleter-etil asetat (65:35) en yüksek verimli fraksiyon olarak bulunmuştur. Khanavi ve arkadaşları [127] *C. bruguierana* subsp. *belangerana* bitkisinden 4 fraksiyon elde etmişler, metanol ekstresinden elde edilen kloroform en yüksek verimli fraksiyon olarak bulunmuştur. Hammoud ve arkadaşları [128] *C. nicaeensis* bitkisinden toplam 54 fraksiyon elde etmişlerdir. En yüksek verim etil asetat ekstresinden elde edilen kloroform-etanol (90:10) fraksiyonundan alınmıştır. Yapılan bu çalışmalarda görüldüğü gibi fraksiyonları elde etmek için farklı üzücü sistemleri seçilmiştir. Çalışmamızda bitki örneklerimiz için en uygun üzücü sistemi oluşturulup fraksiyonlar elde edilmiştir.

Diklorometan ekstresinden elde edilen fraksiyonların MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmış ve en yüksek sitotoksik aktivite

etilasetat fraksiyonundan elde edilmiştir. Csapi ve arkadaşları [129] *C. arenaria* bitkisi ile yaptıkları çalışmada, ileri kromatografik deneyler yaptıktan sonra elde ettikleri örneklerin NMR ile yapı tayinini gerçekleştirmiş ve 16 maddenin HeLa servikal kanser hücre dizileri, MCF-7 meme kanseri hücre dizileri ve A431 epidermal kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Shoeb ve arkadaşları [72] *C. gigantea* ile yaptıkları çalışmada ileri kromatografik deneyler yaptıktan sonra elde ettikleri örneklerin NMR ile yapı tayinini gerçekleştirmiş ve 6 maddenin CaCo-2 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada elde edilen ve MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerinde sitotoksik açıdan etkili bulunan etilasetat fraksiyonunun ileri kromatografik yöntemlerle analizi ve sitotoksik açıdan anlamlı bulunan örneklerin NMR ile tayini sonraki çalışmalarla yapılabilir.

MTT testleri sonucu sitotoksitesi fazla olan diklorometan ekstresi, diklorometan, etilasetat fraksiyonunun sitotoksik aktivitelerinin doğrulanması için ATP testi yapılmıştır. Wang ve arkadaşlarının [97] yaptığı bir çalışmada yeşil çaydaki fenolik bileşiklerin LNCaP prostat kanser hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine sitotoksik aktivitesi MTT, MTS ve ATP testleri ile araştırılmış, MTT ve MTS testlerinde elde edilen yüzde canlılığın ATP testinden yüzde canlılığa göre yüksek çıktığı görülmüştür. Bu çalışmada da MTT testinin bazı sınırlamaları (bazı kimyasalların veya fitokimyasalların süksinat dehidrogenazın aktivitesini değiştirmesi veya MTT ile doğrudan reaksiyona girmesi [130,131]) düşünüldüğü için ATP testi ile diklorometan ekstresi, diklorometan, etilasetat fraksiyonunun sitotoksik etkisi araştırılmıştır.

MTT testi ile sitotoksik açıdan etkin olduğu tespit edilen diklorometan ekstresi ve diklorometan, etilasetat fraksiyonunun IC_{50} ve IC_{90} dozlarının MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine apoptotik ve nekrotik etkileri ikili boyama ile floresan mikroskopunda değerlendirilmiştir. Diklorometan ekstresinin IC_{50} dozunda 48 saat uygulama sonunda; MCF-7 meme kanseri hücrelerinin genelde erken apoptoza, IC_{90} dozunda ise hücrelerin aynı sürede genelde geç apoptoza gittikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, diklorometan ekstresinde doz miktarı ve doza maruziyet süresi artırılınca geç apoptoza giden hücre sayısının arttığını göstermektedir. Diklorometan, etilasetat

fraksiyonunun IC₅₀ dozunda 48 saat uygulama sonunda, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin genelde geç apoptoza az sayıda hücrenin ise primer nekroza gittiği görülürken, IC₉₀ dozunda aynı süre sonunda, hücrelerin genelde primer nekroza gittikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, hücrelerin diklorometan, etil asetat fraksiyonunda doz miktarı ve doza maruziyet süresi artırılınca primer nekroza giden hücre sayısının arttığını göstermektedir. Literatürde *Centaurea* cinsinin kanser hücreleri üzerine apoptotik ve nekrotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunamamıştır. Bu durum bu çalışmanın özgün bir değer taşıdığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Baytop, T., Türkiye' de Bitkilerle Tedavi, 2. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 1999.
- [2] Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental Health Perspectives. 109: 69-75, 2001.
- [3] Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H., Natural Plant-Chemicals - Sources of Industrial and Medicinal Materials. Science. 228(4704): 1154-1160, 1985.
- [4] Baytop, T., Türkiye'de bitkiler ile tedavi (Geçmişte ve bugün). İ.Ü. Yayın no: 3255, Eczacılık Fak. Yayın no:40. 520 s., 1984.
- [5] Başaran, S., Elmalı yöresinde doğal olarak yetişen bazı bitkilerin etnobotanik özellikleri. Batı Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Dergisi. 5, Antalya, 2003.
- [6] Çakıroğlu, E., Erdoğan, T.Ö., Tıbbi ve ticari amaçlı kullanılan bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri. OT Sistemik Botanik Dergisi. 9(1): 111-116, 2002.
- [7] Uğuz, T.M., Nacar, Ş., İlçim, A., *Salva tomentosa*, *Micromeria fruticosa* subsp. *brachycalyx* ve *Rhus coriaria* türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri. OT Sistemik Botanik Dergisi. 8(2): 121, 2002.
- [8] Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. Economic botany. 39(3): 231-240, 1985.

- [9] Pezzuto, J.M., Plant-derived anticancer agents. *Biochemical pharmacology*. 53(2): 121-133, 1997.
- [10] Kintzios, S.E., Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25(2): 79-113, 2006.
- [11] Celik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W., Bruno, M., Sesquiterpene lactones from *Anthemis wiedemanniana*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33(9): 952-956, 2005.
- [12] Celik, S., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M., Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34(4): 349-352, 2006.
- [13] Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Celik, S., Sarker, S.D., Lignans and flavonoids from the seeds of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. ex. Bornm. and *Centaurea huber-morathii* Wagenitz. *Polish journal of chemistry*. 81(1): 39-44, 2007.
- [14] Ozkan, G., Gokturk, R.S., Unal, O., Celik, S., Determination of the volatile constituents and total phenolic contents of some endemic *Stachys* taxa from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(2): 172-174, 2006.
- [15] Erdemgil, Z., Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Celik, S., Michalska, K., Kisiel, W., Bruno, M., An unusual pregnane derivative and dibenzylbutyrolactone lignans from *Centaurea screlolepis*. *Polish Journal of Chemistry*. 80: 647-650, 2006.
- [16] Shoeb, M., Macmanus, S.M., Kong-Thoo-Lin, P., Celik, S., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *Daru-Journal of Faculty of Pharmacy*. 15(3): 118-122, 2007.

- [17] Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik, S., Sarker, S.D., Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17(2): 155-159, 2007.
- [18] Delazar, A., Celik, S., Gokturk, R.S., Unal, O., Nahar, L., Sarker, S.D., Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. *Pharmazie*. 60(11): 878-880, 2005.
- [19] Spiridon, E.K., Maria, G.B., *Plants that Fight Cancer*, CRC Press, Page, 2004.
- [20] Dixon, R.A., The Phytoalexin Response - Elicitation, Signaling and Control of Host Gene-Expression. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 61(3): 239-291, 1986.
- [21] Facchini, P.J., Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 29-66, 2001.
- [22] Dixon, R.A., Paiva, N.L., Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*. 7(7): 1085-1097, 1995.
- [23] Trapp, S., Croteau, R., Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 689-724, 2001.
- [24] Agarwal, C., Sharma, Y., Agarwal, R., Anticarcinogenic Effect of a Polyphenolic Fraction Isolated From Grape Seeds in Human Prostate Carcinoma DU145 Cells: Modulation of Mitogenic Signaling and Cell-Cycle Regulators and Induction of G1 Arrest and Apoptosis. *Molecular carcinogenesis*. 28(3): 129-138, 2000.

- [25] Bharti, A.C., Shishodia, S., Reuben, J.M., Weber, D., Alexanian, R., Raj-Vadhan, S., Estrov, Z., Talpaz, M., Aggarwal, B.B., Nuclear factor- κ B and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood*. 103(8): 3175-3184, 2004.
- [26] Perabo, F., Von Löw, E., Ellinger, J., von Rücker, A., Müller, S., Bastian, P., Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 11(1): 6-12, 2007.
- [27] Wall, M.E., Wani, M.C., Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*. 51(1-3): 239-254, 1996.
- [28] Yoder, B.J., Isolation and structure elucidation of cytotoxic natural products from the rainforests of Madagascar and Suriname. PhD Dissertation, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. November, 2005.
- [29] Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T., Sim, G.A., The isolation and structure elucidation of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88: 3888-3890, 1966.
- [30] Aslan, S., Vural, M., Sahin, B., Celik, S., Karaveliogullari, F., Presence of *Centaurea regia* Boiss. subsp. *regia* (Subgen. *Cynaroides*(Boiss. ex Walp.) Dostal, Compositae) in Turkey. *Biological Diversity and Conservation*. 3(2): 185-191, 2010.
- [31] Wei, H.X., Gao, W.Y., Tian, Y.K., Guan, Y.K., Huang, M.H., D.L., C., New eudesmane sesquiterpene and thiophene derivatives from the roots of *haponticum uniflorum*. *Pharmazie*. 52(3): 245-247, 1997.
- [32] Chucla, M.T., Lamela, M., Gato, A., Cadavid, I., *Centaurea-Corcubionensis* - a Study of Its Hypoglycemic Activity in Rats. *Planta Medica*. (2): 107-109, 1988.

- [33] Vazquez, F.M., Suarez, M.A., Perez, A., Medicinal plants used in the Barros Area, Badajoz Province (Spain). *Journal of Ethnopharmacology*. 55(2): 81-85, 1997.
- [34] Bastos, M.M.S.M., Kijjoa, A., Pinto, M.M.M., Constituents of *Centaurea ornata* ssp. *ornata*. *Fitoterapia*. 65(2): 191, 1994.
- [35] Ali, Y.E., Omar, A.A., Sarg, T.M., Slatkin, D.J., Chemical-Constituents of *Centaurea-Pallescens*. *Planta Medica*. (5): 503-504, 1987.
- [36] Arif, R., K peli, E., Ergun, F., The biological activity of *Centaurea* L. species. *GU Journal of Science*. 17(4): 149-164, 2004.
- [37] Al-Easa, H.S., Kamel, A., Rizk, A.-F.M., Flavonoids from *Centaurea sinaica* *Fitoterapia*. 66(3): 468-469, 1992.
- [38] Barrero, A., Oltra, J., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D., Ruiz, P., Lactones from species from *Centaurea*. Cytotoxic and antimicrobial activities. *Fitoterapia*. 66(3): 227-230, 1995.
- [39] Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., Gravalos, D.G., Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. *Fitoterapia*. 68(3): 281-283, 1997.
- [40] Gurkan, E., Sarioglu, I., Oksoz, S., Cytotoxicity assay of some plants from asteraceae. *Fitoterapia*. 69(1): 81-82, 1998.
- [41] Lonergan, G., Routsis, E., Georgiadis, T., Agelis, G., Hondrelis, J., Matsoukas, J., Larsen, L.K., Caplan, F.R., Isolation, NMR studies, and biological activities of onopordopicrin from *Centaurea sonchifolia*. *Journal of natural products*. 55(2): 225-228, 1992.

- [42] Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C., Dimas, K., Bioactive sesquiterpene lactones from *Centaurea* species and their cytotoxic/cytostatic activity against human cell lines in vitro. *Planta Medica*. 68(7): 649-652, 2002.
- [43] Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S.M., Nahar, L., Paul, K.T.L.D., Sarker, S.D., Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron*. 61(38): 9001-9006, 2005.
- [44] Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S.D., Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*. 62(48): 11172-11177, 2006.
- [45] Shoeb, M., Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 1(2): 35-41, 2008.
- [46] Sarker, S.D., Dinan, L., Šik, V., Underwood, E., Waterman, P.G., Moschamide: An unusual alkaloid from the seeds of *Centaurea moschata*. *Tetrahedron letters*. 39(11): 1421-1424, 1998.
- [47] Shoeb, M.J., Jaspars, M., Macmanus, S.M., Thoo-Lin, P.K., Celik, S., Sarker, S.D., Bioactivity of the extracts and the isolation of lignans from the seeds of *Centaurea dealbata*. *Ars Pharm*. 47(4): 417-424, 2006.
- [48] Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M., Girre, L., Chemical and biological activity of the genus *Centaurea*. *Pharm. Acta Helv*. 67(7): 178-188, 1992.
- [49] Sarker, S.D., Savchenko, T., Whiting, P., Šik, V., Dinan, L.N., Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Natural Product Letters*. 9(3): 189-199, 1997.

- [50] Erol, M.K., Eğirdir (Isparta) yöresinin geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkileri. XI.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı, Ed. Coşkun, M, Ankara Üniversitesi EczacılıkFakültesi Yayınları No:75, Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara Üniversitesi Basımevi: 466-475, 1997.
- [51] Farrag, N.M., Abd El Aziz, E.M., El-Domiaty, M.M., El Shafea, A.M., Phytochemical investigation of *Centaurea araneosa* growing in egypt. Zag. J. Pharm. Sci. 2(1): 29-45, 1993.
- [52] Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriate, E., Calleja, J., Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corubionensis*. Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research. 64(2): 116-119, 1998.
- [53] Negrete, R., Backhouse, N., Avendano, S., San Martin, A., Dehydrocostus lactone and 8 β - hydroxydehydrocostus lactone in *Centaurea chilensis* Hook and Arn. Planta Med. 18(3): 226-232, 1984.
- [54] Negrete, R.E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B.K., Breitmaier, E., Eckhardt, G., Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. Journal of Ethnopharmacology. 40(3): 149-153, 1993.
- [55] Sepúlveda, S., Delhvi, S., Koch, B., Zilliken, F., Cassels, B.K., Isolated in the laboratory of SSB from the aerial parts of *Centaurea chilensis*; for published work on the flavonoids of this plant. Fitoterapia. 65(1): 88-89, 1994.
- [56] Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdir provinces. Economic botany. 51(3): 195-211, 1997.
- [57] Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yesilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshiro, Y., Traditional medicine in Turkey III. Folk medicine in east Anatolia, Van and Bitlis provinces. Pharmaceutical Biology. 32(1): 3-12, 1994.

- [58] Honda, G., Sezik, E., A report on Traditional Medicine and Medicinal Plants in Turkey (1986). Faculty of Pharmaceutical Sciences. Kyoto University, 1988.
- [59] Baytop, T., Türkçe bitki adları sözlüğü. Türkçe bitki adları sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları, No: 578, Türk Tarih Kurumu Basımevi. Ankara, 1994.
- [60] Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. Journal of Ethnopharmacology. 75(2): 95-115, 2001.
- [61] Ertuğ, F., Plant used in domestic handicrafts in Central Turkey. Ot Sistematik Botanik Dergisi. 6(2): 57-68, 1999.
- [62] Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. Journal of Ethnopharmacology. 46(3): 133-152, 1995.
- [63] Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. Journal of Ethnopharmacology. 53(2): 75-87, 1996.
- [64] Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. Economic botany. 49(4): 406-422, 1995.
- [65] Sadıkoğlu, N., Alpınar, K., Etnobotanik Açından Bartın, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. İstanbul, 2001.
- [66] Yesilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y., Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. Journal of Ethnopharmacology. 39(1): 31-38, 1993.

- [67] Gürbüz, İ., *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* Bitkisinin Antiülserojenik Aktivitesi Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 2002.
- [68] Tuzlacı, E., Erol, M., Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*. 70(6): 593-610, 1999.
- [69] Sayar, A., Güvensen, A., Ozdemir, F., Öztürk, M., Muğla (Türkiye) ilindeki bazı türlerin etnobotanik özellikleri. *Ot Sistematiği Botanik Dergisi*. 2(1): 151-160, 1990.
- [70] Ekim, T., *Centaurea tchihatcheffii* Fisch. & Mey. The Karaca Arboretum Magazine. 2(3): 137, 1994.
- [71] Sarker, S.D., Shoeb, M., Celik, S., Jaspar, M., Nahar, L., KongThoo-Lin, P., MacManus, S.M., Extracts of *Centaurea bornmuelleri* and *Centaurea huber-morathii* inhibit the growth of colon cancer cells in vitro. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 7(4): 336-340, 2007.
- [72] Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Celik, S., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S.D., Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines*. 61(2): 164-169, 2007.
- [73] Shoeb, M., Celik, S., Nahar, L., MacManus, S., Kong-Thu-Lin, P., Jaspars, M., Sarker, S., Two salonenolide derivatives from the aerial parts of *Centaurea gigantea* inhibit the growth of colorectal cancer cells in vitro. *Natural Products Communications*. 2: 121-125, 2007.
- [74] Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., Basic Pathology. Çevikbaş U (Çev ed) . Temel Patoloji. Sekizinci Baskı, İstanbul. Nobel, 2008.
- [75] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 55(2): 74-108, 2005.

- [76] Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E., Cancer statistics, 2010. CA: a cancer journal for clinicians. 60(5): 277-300, 2010.
- [77] Demirci, T., Hmg-Koa Redüktaz İnhibitörlerinin Meme Adenokarsinom Hücre Hattı Mcf-7 Üzerinde Hücre Proliferasyonu ve Hücre Ölüm Mekanizmaları (Apoptoz Ve Otofaji) Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2010.
- [78] Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri (1995-1999), T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı Bakanlık. YayınNo: 618, 145.
- [79] Hamzaoğlu, O., Özcan, U., Türkiye Sağlık İstatistikleri. Ankara: Türk Tabipler Birliği Yayınları, 2006.
- [80] Kuzey, G.M., Temel Patoloji. I.Baskı Ankara, Güneş Kitabevi. 2007.
- [81] Vita Jr, V.D., Hellman, S., Rosenberg, S., Markoe, A.M., Cancer: Principles and Practice of Oncology. American Journal of Clinical Oncology. 2005.
- [82] Sayek, İ., Temel Cerrahi, İkinci Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi. 835-892, 1996.
- [83] Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., Breast tumor cell lines from pleural effusions. Journal of the National Cancer Institute. 53(3): 661-674, 1973.
- [84] Watanabe, N., Okochi, E., Mochizuki, M., Sugimura, T., Ushijima, T., The presence of single nucleotide instability in human breast cancer cell lines. Cancer research. 61(21): 7739, 2001.
- [85] Nieves-Neira, W., Pommier, Y., Apoptotic response to camptothecin and 7 hydroxystaurosporine (UCN01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationships with topoisomerase i,

protein kinase C, Bcl2, p53, MDM2 and caspase pathways. *International journal of cancer*. 82(3): 396-404, 1999.

- [86] Kısım, A., (-)-Gossypol (at-101) ve Rekombinant İnsan Apo2l/Trail'in Tekli ve Kombine Dozlarının Meme Kanseri Hücre Hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi, Manisa, 2010.
- [87] Schwarz, V., Hornung, R., Fedier, A., Fehr, M., Walt, H., Haller, U., Fink, D., Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and-proficient tumour cells. *British journal of cancer*. 86(7): 1130-1135, 2002.
- [88] Nagasawa, H., Keng, P., Maki, C., Yu, Y., Little, J.B., Absence of a radiation-induced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer research*. 58(9): 2036, 1998.
- [89] Rait, A.S., Pirollo, K.F., Rait, V., Krygier, J.E., Xiang, L., Chang, E.H., Inhibitory effects of the combination of HER-2 antisense oligonucleotide and chemotherapeutic agents used for the treatment of human breast cancer. *Cancer gene therapy*. 8(10): 728, 2001.
- [90] Musgrove, E.A., Robert L. Sutherland, Colin KW Watts, Christine SL Lee and. *Human Cell Culture*. 79, 1999.
- [91] Botos, J., Barhoumi, R., Burghardt, R., Kochevar, D.T., Rb localization and phosphorylation kinetics correlate with the cellular phenotype of cultured breast adenocarcinoma cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 38(4): 235-241, 2002.
- [92] Berridge, M.V., Tan, A.S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 303(2): 474-82, 1993.

- [93] Butler, M., *Animal cell culture & technology*: London. 32-33, 2004.
- [94] Holst-Hansen, C., Brunner, N., MTT-cell proliferation assay in cell biology. *A laboratory handbook* 1(2): 16-18, 1998.
- [95] Barile, F.A., *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. Boca Raton, FL: CRC Press. 27-32, 1994.
- [96] Fotakis, G., Timbrell, J.A., In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*. 160(2): 171-177, 2006.
- [97] Wang, P., Henning, S.M., Heber, D., Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*. 5(4): e10202, 2010.
- [98] Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G., Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 10(3): 221-237, 2011.
- [99] Galluzzi, L., Aaronson, S., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D., Baehrecke, E., Bazan, N., Blagosklonny, M., Blomgren, K., Borner, C., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*. 16(8): 1093-1107, 2009.
- [100] Lowe, S.W., Lin, A.W., Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21(3): 485-495, 2000.
- [101] Mak, T., Apoptotic signaling in cancer. Program and abstracts of the 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Washington, DC., 2003.
- [102] Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A., Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*. 55(3): 178-194, 2005.

- [103] Gozuacik, D., Kimchi, A., Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23(16): 2891-2906, 2004.
- [104] Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8(9): 741-752, 2007.
- [105] Antonsson, B., Martinou, J.C., The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*. 256(1): 50-7, 2000.
- [106] Kaur, M., Agarwal, R., Agarwal, C., Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation. *Molecular cancer therapeutics*. 5(5): 1265, 2006.
- [107] Cao, W., Chi, W.H., Wang, J., Tang, J.J., Lu, Y.J., TNF-alpha promotes Doxorubicin-induced cell apoptosis and anti-cancer effect through downregulation of p21 in p53-deficient tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 330(4): 1034-40, 2005.
- [108] Golstein, P., Kroemer, G., Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 32(1): 37-43, 2007.
- [109] Festjens, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1757(9): 1371-1387, 2006.
- [110] Degtarev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., Yuan, J., Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*. 1(2): 112-119, 2005.

- [111] Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology*. 4(5): 313-321, 2008.
- [112] Kalai, M., Van Loo, G., Vanden Berghe, T., Meeus, A., Burm, W., Saelens, X., Vandenabeele, P., Correspondence, P., Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ*. 9(9): 981-994, 2002.
- [113] Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., Tschopp, J., Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology*. 1(6): 489-495, 2000.
- [114] Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G., Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ*. 6(10): 931, 1999.
- [115] Nicotera, P., Melino, G., Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*. 23(16): 2757-2765, 2004.
- [116] Festjens, N., Berghe, T.V., Cornelis, S., Vandenabeele, P., RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death & Differentiation*. 14(3): 400-410, 2007.
- [117] Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., Natural product isolation. *Natural Products Isolation*, ed. SD Sarker, Z. Latif and AI Gray, 2nd edn, Humana Press, Totowa, New Jersey. 1-25, 2006.
- [118] Shoeb, M., Macmanus, S., Kong-Thoo-Lin, P., Celik, S., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S., Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15(3), 2007.

- [119] Özdikicioğlu, F., Ulukaya, E., Yılmaztepe Oral, A., Özel, M.Z., Kutlular, Ö., The differential anticancer effects of green tea in estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative human breast cancer cell lines. *Advances in Molecular Medicine*. 3(2): 69-75, 2007.
- [120] Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., Demirci, M., The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in vitro*. 22(1): 232-239, 2008.
- [121] Ulukaya, E., Kurt, A., Wood, E.J., 4-(N-hydroxyphenyl) retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts. *Cancer Invest*. 19(2): 145-154, 2001.
- [122] <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/handlingprep.html> (Erişim tarihi: 21.06.2012).
- [123] Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S., Khan, I.A., Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. *Phytotherapy Research*. 21(5): 488-491, 2007.
- [124] Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Réthy, B., Zupkó, I., Máthé, I., Rédei, T., Falkay, G., Hohmann, J., Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research*. 23(8): 1109-1115, 2009.
- [125] Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estevez, F., Leon, F., Bermejo, J., Benayache, F., A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*. 2(3): 114-118, 2009.
- [126] Kolli, E.H., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, S., Cytotoxic sesquiterpene lactones and

other constituents of *Centaurea omphalotricha*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 23(5): 977-983, 2012.

[127] Khanavi, M., Rajabi, A., Behzad, M., Hadjiakhoondi, A., Vatandoost, H., Abaee, M.R., Larvicidal Activity of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana* against *Anopheles stephensi* Larvae. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10(4), 2011.

[128] Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. Natural Product Research. 26(3): 203-208, 2012.

[129] Csapi, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Berényi, Á., Forgo, P., Szabó, P., Hohmann, J., Bioactivity guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. Phytotherapy Research. 24(11): 1664-1669, 2010.

[130] Hsu, S., Bollag, W.B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, T., Schuster, G., Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 306(1): 29-34, 2003.

[131] Devika, P., Stanely Mainzen Prince, P.,-() Epigallocatechin -gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiac toxicity in albino Wistar rats: A transmission electron microscopic and in vitro study. Pharmacological Research. 57(5): 351-357, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

07.12.1975 tarihinde Kayseri’ de doğdum. İlkokulu Kayseri Yavuz Selim İlköğretim Okulu’ nda tamamladıktan sonra, Ortaöğretimimi Kayseri Atatürk Lisesi’ nde tamamladım. 1998 yılında Erciyes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’ nden mezun oldum. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisansımı tamamladım. 2008 yılında Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale Meslek Yüksek Okulu’ nda Öğretim Görevlisi olarak göreve başladım. 2012 yılında ise Kırıkkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı’ nda doktora programını tamamladım.