



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BİTKİ EKSTRELERİNİN *İN VİTRO* ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Utku GÜNEŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ


Temmuz, 2018


İSTANBUL

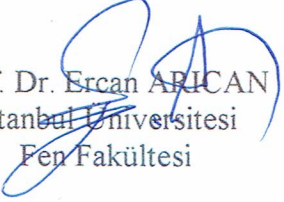
uygulandı.
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ


Bu çalışma, 25.07.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Jürisi


Prof. Dr. Ali KARAGÖZ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı fonu kapsamında desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince kendisi ile çalışmaktan zevk aldığım ve bu süreçte bana her konuda yardımcı olan, beni her zaman dinleyen ve fikirlerime önem veren, deneyimleriyle yolumu aydınlatan, tez çalışmamın tamamlanması için her türlü imkanı sağlayan, güler yüzlü ve anlayışlı olmasıyla örnek aldığım ve bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim çok sevgili danışmanım ve hocam **Prof. Dr. Ali KARAGÖZ**'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca verdikleri fikirlerle yardımcı ve destek olan sevgili hocalarım **Prof. Dr. Günnur DENİZ**, **Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA** ve **Doç. Dr. Umutcan KÜÇÜKSEZER** hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca, her zaman yanımda olan ve bütün çalışmalarına katkı sağlayarak, bu tezin bitmesinde büyük bir payı olan, çok değerli meslektaşım **Fulya Tuğba ARTUN**'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca manevi desteğiyle her an yanımda olan, çok değerli dostlarım **Aslıhan ŞENGELEN**'e, **Yunus AKSÜT**'e ve **Arş. Gör. Burcu ARIKAN**'a ve ayrıca **Proteomik ekibi** çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren her ihtiyaç duyduğumda desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan sevgili eşim **Nurten GÜNEŞ**'e ve oğlum **Yusuf Ali GÜNEŞ**'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Temmuz 2018

Utku GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
876	
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. KANSER.....	3
2.2. BİTKİSEL ÜRÜNLER	4
2.2.1. <i>Crataegus orientalis</i> , <i>C. monogyna</i> ve <i>C. pontica</i>	7
2.2.2. <i>Centaurea kilaea</i> , <i>C. hermannii</i> ve <i>C. behen</i>	9
2.2.3. <i>Kitaibelia balansae</i>	12
2.2.4. <i>Plantago lanceolata</i>	13
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	15
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELERİN HAZIRLANMASI.....	15
3.1.1. Stok EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) Hazırlanması.....	15
3.1.2. Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS) Hazırlanması	15
3.1.3. Tripsin Hazırlanması	15
3.1.4. Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃) Hazırlanması.....	15
3.1.5. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hazırlanması	15
3.1.6. CFDA, SE (Karboksi Floresein Diasetat Süksinimidil Ester) Hazırlanması	16
3.2. BİTKİLERİN ELDESİ VE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI.....	16
3.3. HÜCRE HATLARI.....	16
3.3.1. Hücre Hatlarının Sıvı Azottan Açılması.....	18
3.3.2. Hücre Kültürlerinin Devamlılığının Sağlanması.....	18
3.3.3. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması	18
3.4. EKSTRELERİN HÜCRE HATLARININ ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ.....	19

3.4.1. Sitotoksosite Analiz Testleri	19
3.4.2. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi	19
3.4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi	20
3.4.4. Hücre Generasyonu ve Hücre Siklusu Analiz Testleri.....	21
3.4.5. Hücre Generasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi	21
3.4.6. Propidium İyodür (PI) Boyama ile Hücre Siklusu Analizi	23
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. MTT (3-(4,5-DİMETİLTİYAZOL-2-II)-2,5-DİFENİL TETRAZOLYUM BROMÜR) YÖNTEMİ İLE HÜCRE CANILIĞININ BELİRLENMESİ	26
4.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) DP SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ	38
4.3. HÜCRE GENERASYONUNUN CFSE YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ.....	40
4.4. PROPİDİUM İYODÜR (PI) BOYAMA İLE HÜCRE SIKLUSU ANALİZİ	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Crataegus orientalis</i> türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [43].	8
Şekil 2.2: <i>Crataegus monogyna</i> türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [44].	8
Şekil 2.3: <i>Crataegus pontica</i> türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [45].	9
Şekil 2.4: <i>Centaurea kilaea</i> türüne ait çiçek görüntüsü [59].	10
Şekil 2.5: <i>Centaurea hermannii</i> türüne ait çiçek görüntüsü [60].	11
Şekil 2.6: <i>Centaurea behen</i> türüne ait çiçek görüntüsü [61].	11
Şekil 2.7: <i>Kitaibelia balansae</i> türüne ait çiçek görüntüsü [65].	12
Şekil 2.8: <i>Plantago lanceolata</i> türüne ait çiçek görüntüsü [75].	14
Şekil 3.1: Vero hücrelerinin 48. saat sonunda tek tabaka görüntüsü (100x optik büyütme).	17
Şekil 3.2: HeLa hücrelerinin 48. saat sonunda tek tabaka görüntüsü (100x optik büyütme).	17
Şekil 3.3: xCelligence cihazı ve kullanılan altın kaplı kültür kaplarının yüzeyi [78].	20
Şekil 3.4: xCELLigence ile yapılan ölçümlerde hücre artışına bağlı olarak ölçülen hücre indeksi değerleri [78].	21
Şekil 3.5: CFSE yoğunluğu ve bölünme sayısı ilişkisini gösteren grafik ve histogram [82].	22
Şekil 3.6: Hücre bölünmeleri ile CFSE miktarındaki azalmayı gösteren histogram A) Uyarılmamış splenosit kültürü B) anti-CD3 ile uyarılmış splenosit kültüründe meydana gelen değişim [83].	23
Şekil 3.7: PI floresan emisyonuna göre hücre döngüsünün bölümlerini gösteren histogram [85].	24
Şekil 4.1: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus orientalis</i> ekstresinin etkisi.	27
Şekil 4.2: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea kilaea</i> ekstresinin etkisi.	28

Şekil 4.3: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea hermannii</i> ekstresinin etkisi.	29
Şekil 4.4: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus monogyna</i> ekstresinin etkisi.	30
Şekil 4.5: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Kitaibelia balansae</i> ekstresinin etkisi.	31
Şekil 4.6: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus pontica</i> ekstresinin etkisi.	32
Şekil 4.7: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Plantago lanceolata</i> ekstresinin etkisi.	33
Şekil 4.8: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea behen</i> ekstresinin etkisi.	34
Şekil 4.9: 48. saat sonunda ekstre uygulanmamış (kontrol) Vero hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).	36
Şekil 4.10: 48. saat sonunda <i>Centaurea hermannii</i> ekstresinin IC ₅₀ konsantrasyonunun (349.8 µg/mL) uygulandığı Vero hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).	36
Şekil 4.11: 48. saat sonunda ekstre uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).	37
Şekil 4.12: 48. saat sonunda <i>Centaurea hermannii</i> ekstresinin IC ₅₀ konsantrasyonunun (29.44 µg/mL) uygulandığı HeLa hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).	37
Şekil 4.13: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan Vero hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi ölçüm grafiği.	38
Şekil 4.14: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan Vero hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi verileri (R ² : 0,9916).	39
Şekil 4.15: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan HeLa hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi ölçüm grafiği.	39
Şekil 4.16: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan HeLa hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi verileri (R ² : 0,9605).	40
Şekil 4.17: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 0. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %99,44; Turuncu: 2. nesil, %0; Yeşil: 3. nesil %0; Pembe: 4. nesil %0).	41
Şekil 4.18: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %5,83; Turuncu: 2. nesil, %83,30; Yeşil: 3. nesil %9,06; Pembe: 4. nesil %1,81).	41

Şekil 4.19: 5 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %8,12; Turuncu: 2. nesil, %89,98; Yeşil: 3. nesil, %2,23; Pembe: 4. nesil, %0,48).	42
Şekil 4.20: 25 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %8,72; Turuncu: 2. nesil, %89,28; Yeşil: 3. nesil %1,71; Pembe: 4. nesil %0,29).	42
Şekil 4.21: 100 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %10,15; Turuncu: 2. nesil, %88,62; Yeşil: 3. nesil %0,83; Pembe: 4. nesil %0,21).	43
Şekil 4.22: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %2,19; Turuncu: 2. nesil, %10,34; Yeşil: 3. nesil %86,62; Pembe: 4. nesil %0,85).	43
Şekil 4.23: 5 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %3,38; Turuncu: 2. nesil, %40,73; Yeşil: 3. nesil %54,49; Pembe: 4. nesil %0,79).	44
Şekil 4.24: 25 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %4,09; Turuncu: 2. nesil, %76,75; Yeşil: 3. nesil %17,67; Pembe: 4. nesil %0,49).	44
Şekil 4.25: 100 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %6,73; Turuncu: 2. nesil, %74,65; Yeşil: 3. nesil %18,28; Mor: 4. nesil %0,34).	45
Şekil 4.26: Ekstre uygulanmayan (kontrol) HeLa hücrelerine ait 48. saat hücre siklusu verileri.....	46
Şekil 4.27: 5 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.....	46
Şekil 4.28: 25 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.....	47
Şekil 4.29: 100 µg/mL konsantrasyonda <i>Centaurea hermännii</i> uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.....	47

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bu çalışmada <i>in vitro</i> sitotoksik aktiviteleri değerlendirilen bitkiler.....	7
Tablo 4.1: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus orientalis</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	27
Tablo 4.2: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea kilaea</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	28
Tablo 4.3: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea hermannii</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	29
Tablo 4.4: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus monogyna</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	30
Tablo 4.5: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Kitaibelia balansae</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	31
Tablo 4.6: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Crataegus pontica</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	32
Tablo 4.7: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Plantago lanceolata</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	33
Tablo 4.8: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine <i>Centaurea behen</i> ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.....	34
Tablo 4.9: Ekstrelerin HeLa ve Vero hücreleri üzerinde MTT yöntemi ile belirlenen IC ₅₀ (µg/mL) ve SI değerleri (SI= Vero IC ₅₀ / HeLa IC ₅₀).	35
Tablo 4.10: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresinin, HeLa ve Vero hücreleri üzerinde xCELLigence RTCA yöntemi ile belirlenen IC ₅₀ (µg/mL) ve buna bağlı hesaplanan SI değerleri. (SI= Vero IC ₅₀ / HeLa IC ₅₀).....	40
Tablo 4.11: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin CFSE boyama ile elde edilen BI (bölünme indeksi) değerleri.....	45
Tablo 4.12: <i>Centaurea hermannii</i> bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.....	48

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

$\mu\text{g/mL}$: Mikrogram/mililitre
$^{\circ}\text{C}$: Derece Santigrat
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre

Kısaltmalar Açıklama

BI	: Bölünme İndeksi
CFSA	: Karboksi Floresein Suksinimidil Ester
CFDA,SE	: Karboksi Floresein Diasetat Suksinimidil Ester
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EMEM	: Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
HeLa	: İnsan Serviks Kanser Hücre Hattı
IC₅₀	: Hücrelerin %50'sinin Ölümüne Neden Olan Konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
PI	: Propidium İyodür
SI	: Seçicilik İndeksi (Selectivity Index)
Vero	: Normal Afrika Yeşil Maymun Böbrek Epitel Hücre Hattı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI BİTKİ EKSTRELERİNİN *İN VİTRO* ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Utku GÜNEŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Bitkiler, birçok hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyeli olan çok sayıda doğal bileşik içerirler. Bu bileşiklerin keşfi için öncelikle bitki ekstralarının biyoaktivitelerinin belirlenmesi gerekir.

Bu tez çalışmasının amacı, antikanser aktivite potansiyeli olan yeni doğal bileşikleri içeren bitki ekstralarının belirlenmesidir. Bu kapsamda, 3'ü Türkiye'ye endemik (*Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Kitaibelia balansae*) olan toplam 8 (*Crataegus orientalis*, *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Crataegus monogyna*, *Kitaibelia balansae*, *Plantago lanceolata*, *Centaurea behen*) metanolik bitki ekstresinin Vero [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı] ve HeLa (insan serviks kanseri epitel hücre hattı) hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini MTT kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışılan bitki ekstralarından en yüksek antikanser aktivite *C. hermannii* ekstresi tarafından ortaya konulmuştur. Potansiyel antikanser aktiviteye sahip olan *C. hermannii* bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini doğrulamak amacıyla xCELLigence RTCA sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir. Daha sonra *C. hermannii* ekstresinin hücre ikilenme süresini nasıl etkilediğini ortaya koymak amacıyla Karboksi Floresein Suksinimidil Ester (CFSE) ve hücre siklusuna olan etkilerini belirlemek için Propidium İyodür (PI) boyama yöntemleri kullanılmıştır.

MTT analizi ile 48. saatte elde edilen veriler değerlendirildiğinde *C. hermannii* ekstresinin normal transforme hücre hattı Vero'daki düşük sitotoksitesisi ve serviks kanseri hücre hattı HeLa'daki seçici yüksek sitotoksitesisi potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. *C. hermannii* bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla elde edilen verilerle IC₅₀ (Hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan ekstre konsantrasyonu) ve SI (Seçicilik indeksi; SI= IC₅₀ Vero hücresi / IC₅₀ HeLa hücresi) değerleri hesaplanmıştır. *C. hermannii* bitki ekstresi IC₅₀ değerleri Vero hücre hattı için 399,8 µg/mL, HeLa hücre hattı için 29,44 µg/mL olarak bulunmuştur. SI değeri ise 11,88 olarak hesaplanmıştır.

C. hermannii için xCELLigence RTCA sistemi ile hücre indeksi parametrelerinin analizi sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri Vero hücre hattı için 364,98 µg/mL ve HeLa hücre hattı için 28,91 µg/mL olarak bulunmuştur. SI değeri ise 12,62 olarak hesaplanmıştır. MTT analizinden elde edilen veriler hem morfolojik değerlendirmeler ile hem de xCELLigence sistemi ile yapılan analiz sonuçlarıyla tutarlıdır.

C. hermannii bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin CFSE boyama ile elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde 24. saatte, kontrol grubunun 2 olan bölünme indeksinin konsantrasyon artışına paralel olarak 1,55'e düştüğü, 48. saatte ise 3,43 olan bölünme indeksinin konsantrasyon artışına paralel olarak 2,05'e düştüğü belirlenmiştir.

C. hermannii bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin 48. saat PI boyama ile elde edilen hücre siklusu analiz değerleri incelendiğinde, kontrol grubunun yapılan analizleri sonucu popülasyonun %80,5'inin G₀-G₁ fazında %2,22'lik kısmının S fazında ve %13,8'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Spontan olarak meydana gelen parçalanmaların ise %4 civarında olduğu hesaplanmıştır. 25 µg/mL konsantrasyonda, popülasyonun %55,2'si G₀-G₁ fazında %9,32'lik kısmının S fazında ve %23,6'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %11,89'dir. 100 µg/mL konsantrasyonda ise, popülasyonun %4,18'i G₀-G₁ fazında, %17,8'i S fazında, %51,2'si ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %16,82'dir.

C. hermannii bitki ekstresinin, HeLa hücre popülasyonunun hücre siklus dağılımlarını anlamlı ölçüde değiştirmesi MTT, xCELLigence ve CFSE yöntemleri ile ortaya konan etkilerini doğrulayan bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Temmuz 2018, 78 sayfa.

Anahtar kelimeler: Metanolik Ekstre, Antikanser Aktivite, MTT, xCELLigence, *Centaurea hermannii*, CFSE, Propidium İyodür

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EVALUATION OF *IN VITRO* ANTICANCER ACTIVITIES OF DIFFERENT PLANT EXTRACTS

Utku GÜNEŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Plants contain a large number of natural compounds which are potentially useful in the treatment of many diseases. The bioactivity of plant extracts must be determined for the discovery of these compounds.

Aim of this study, cytotoxic effects of the methanolic extracts of 8 plants (*Crataegus orientalis*, *Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Crataegus monogyna*, *Kitaibelia balansae*, *Plantago lanceolata* *Centaurea behen*), 3 of which are endemic species to Turkey (*Centaurea kilaea*, *Centaurea hermannii*, *Kitaibelia balansae*), on Vero [African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney fibroblast cell line] and HeLa (human cervical carcinoma epithelial cell line) cells were determined by mitochondrial dehydrogenase activity, MTT, colorimetric method. From the plant extracts studied, the highest antitumoral activity was revealed by *Centaurea hermannii* extract. In order to confirm the cytotoxic effect of *Centaurea hermannii* plant extract having potential anticancer activity on Vero and HeLa cell lines, cell-index parameters were determined with xCELLigence RTCA system. Then, Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) method was used to investigate how *C. hermannii* extract affected cell duplication and the Propidium Iodide (PI) staining method was used to determine the effects on the cell cycle.

When the data obtained at 48th hour by MTT analysis is evaluated, the low cytotoxicity in the normal transformed cell line Vero and the selective high cytotoxicity in the cervical cancer cell line HeLa suggest that *C. hermannii* extract has potential anticancer activity. IC₅₀ (extract concentration causing 50% of cells death) and SI (selectivity index; $SI = IC_{50} \text{ Vero cell} / IC_{50} \text{ HeLa cell}$) values were calculated to determine the cytotoxic effect of *C. hermannii* plant extract on Vero and HeLa cell lines. The IC₅₀ values of the *C. hermannii* plant extract were 399.8 µg / mL for the Vero cell line and 29.44 µg/mL for the HeLa cell line. SI value is calculated as 11.88.

The IC₅₀ values of *C. hermannii* obtained from the analysis of cell index parameters by the xCELLigence RTCA system were 364.98 µg / mL for the Vero cell line and 28.91 µg / mL for the HeLa cell line. SI value is calculated as 12.62. The data obtained from the MTT assay is consistent with both the morphological assessments and the results from the xCELLigence system.

When the results obtained by CFSE staining of *Centaurea hermannii* plant extract treated and untreated (control) HeLa cells were evaluated at 24th hour, the cleavage index of the control group which is 2 decreased to 1.55 in parallel with the increase in concentration, and at the 48th hour the cleavage index decreased from 3.43 to 2.05 in parallel with the increase in concentration.

When cell cycle analysis values obtained by PI staining of *Centaurea hermannii* plant extract treated and untreated (control) HeLa cells at 48th hour were examined, analysis of the control group revealed that 80.5% of the population is in the G₀-G₁ phase, 2.22% is in the S phase and 13.8% is in the G₂-M phase. The spontaneous fragments are calculated as about 4%. At 25 µg / mL concentration, it was determined that 55.2 % of the population was in S phase and 9.32 % of in G₀-G₁ phase and 23.6 % of in G₂-M phase. The proportion of the small sized pieces formed by the disintegration of the cells is 11.89%. At the concentration of 100 µg / mL, it was determined that 4.18 % of the population in G₀-G₁ phase, 17.8 % of in S phase, and 51.2 % of in the G₂-M phase. The proportion of the small sized pieces formed by the disintegration of the cells is 16.82%. The significant change in cell cycle distributions of the HeLa cell population by *C. hermannii* plant extract is assessed as a result confirming the effects of *C. hermannii* plant extract by MTT, xCELLigence and CFSE methods.

July 2018, 78 pages.

Keywords: Methanol extract, Anticancer Activity, MTT, xCELLigence, *Centaurea hermannii*, CFSE, Propidium iodide

1. GİRİŞ

Günümüzde, kardiyovasküler hastalıklardan sonra, kanser en çok ölüme neden olan ikinci sıradaki hastalık olarak insanlığı etkilemektedir. Kanser tedavisinde geliştirilen yeni yaklaşımlara rağmen kansere neden olan risk faktörlerinin de artması nedeniyle kanserden kaynaklanan ölümlerin yakın bir gelecekte azalması beklenmemektedir.

Kanser insan hayatını tehdit eden hem ciddi bir hastalık, hem sosyal sorunlara neden olan bir hastalık, aynı zamanda ülkelerin ekonomisi açısından yüksek sağlık giderlerine neden olan bir hastalıktır. 2013 yılı verilerine göre, kanserin Amerika'ya yıllık tedavi maliyeti 124 milyar doların üzerindedir. 2020 yılında ise bu rakamın 157 milyar dolar seviyesine çıkacağı tahmin edilmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan yaklaşımlar cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. İnsanlarda yaklaşık 200 civarında kanser tipi ve bu kanserlerin de alt tipleri bulunması nedeniyle, bu yaklaşımların hepsinin bu kadar çeşit kanser tipine karşı etkin bir şekilde uygulama olanağının bulunamaması, tedavi yaklaşımlarının ciddi yan etkilerinin ortaya çıkması ve maliyetlerinin yüksek olması, tedaviye karşı direnç oluşması gibi sebeplerle araştırmacılar yeni, etkin ve daha düşük maliyetli tedavi yaklaşımlarını ortaya koymak için etkin bir araştırma içindedirler.

Hastalıkların tedavisinde, bitkisel ürünlerin kullanılması antik çağlardan beri devam eden bir süreçtir. Özellikle yüzyıllar boyunca nedeni bilinmeyen ve ismi dahi olmayan pek çok hastalığın tedavisinde çok çeşitli bitkisel ürünler denenmiş ve insanları tedavi ettiğine inanılmıştır. Bu tür tıbbi bitkilerin dünyanın her tarafına dağılması doğanın insanlığa bir hediyesidir [1]. Günümüz modern tıbbında ise, nedensellik çerçevesinde bitkisel ekstratlar yeniden değerlendirilmiş ve bu ekstratların temel bileşenleri aydınlatılmıştır. Bu yaklaşım sayesinde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan çok çeşitli bitkisel moleküller tanımlanmış ve biyoaktiviteleri aydınlatılmıştır. Bu sayede, bitkisel ekstratlar halk tıbbına ait bir yaklaşım olmaktan çıkmış ve yeni moleküllerin keşfi için bir havuz görevi görmeye başlamıştır [2].

Bu havuzdan seçilen moleküller biyoaktivitelerine göre çok çeşitli kullanım alanlarına dağılmaktadır. Bununla birlikte, insanların çoğunluğu sentetik ilaçları kullanmak yerine bu tür

bitkisel ürünleri kullanmayı tercih etmektedir [3]. Aynı zamanda, bu tür ürünlerin doğal kaynaklı olması sebebiyle insanlar bu tür ürünlere daha fazla güvenmektedir [4].

Antikanser aktivite çalışmalarında kullanılan bitkisel ekstrelerin potansiyellerini ortaya koymak için ön çalışmalar *in vitro* yöntemlerle başlamakta, bu sayede çok fazla sayıda ve etkinlikte tarama yapılabilmektedir. Bunun sonucu olarak da ümit vaat eden çok sayıda ajan ortaya çıkmaktadır [5].

Bu çalışmada, 3 tanesi Türkiye'ye endemik 8 metanolik bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi, MTT, kolorimetrik yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Yüksek sitotoksik aktivite ve yüksek seçicilik gösteren ekstreler ile bundan sonraki basamaklara geçilip, xCELLigence cihazı ile gerçek zamanlı hücre analizi yapılacaktır. Buradan çıkacak sonuçlara göre, akan hücre ölçer yardımıyla Karboksi Floresein Suksinimidil Ester boyama kullanılarak ekstrelerin hücrelerin ikilenme zamanına olan etkileri araştırılması ve propidium iyodür boyama yardımı ile de hücre siklusunu fazlarına etkileri belirlenmesi bu tez çalışmasının diğer hedefleridir. Bununla birlikte ülkemizde endemik olan ve olmayan biyolojik aktiviteleri ortaya konulmamış bitki ekstreleri ile yapılacak bu çalışmalar doğal bileşiklerden yeni etkin ilaçların geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Günümüzde, kanser en çok ölüme neden olan hastalıklar arasında 2. sırada yer almaktadır. Her yıl, 14 milyon yeni vaka ve 8,2 milyon kanserle ilişkili ölüm meydana gelmektedir. Bu ölümlerin çoğu düşük ve orta gelir seviyesine sahip ülkelerde meydana gelmektedir [6].

Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) 2013 yılı verilerine göre, kanserin Amerika'ya yıllık tedavi maliyeti 124 milyar doların üzerindedir. 2020 yılında ise bu rakamın 157 milyar dolar seviyesine çıkacağı tahmin edilmektedir [7]. Yine aynı şekilde NIH'nin verilerine göre, bir kişiye yaşamı süresince %38,4 olasılıkla kanser teşhisi konacaktır [8].

Kanser tipleri, çoğu zaman ilk oluştukları organlara göre isimlendirilirler. Melanoma, melanosit adı verilen ve deride, gözde ve birkaç organda daha bulunan ve pigment üreten hücrelerin kanseridir. Lösemiler, lökosit adı verilen kan hücrelerinin kanseridir. Amerika'da en çok görülen kanser tipleri karsinoma olarak adlandırılan ve organların yüzeylerinde yer alan epitel hücrelerinden kökenlenen tiplerdir. Sarkomalar ise, daha nadir görülürler ve mezenşimal hücrelerden kaynaklanırlar [9]. Meme kanseri gibi sadece kadınlarda görülen serviks kanserleri çoğu zaman "human papilloma virüs" (HPV) enfeksiyonu ile ilişkili olan bir kanser tipidir. Uterusun alt bölgesi serviks olarak adlandırılır. Serviks kanseri oluşmadan önce, servikte yer alan hücrelerde zaman içinde mikroskop altında gözlemlenebilen morfolojik değişimler meydana gelir [10].

Dünya Sağlık Örgütü, 2014 yılında kadın üreme organları ile ilişkili olan kanserleri genetik parametreleri de dikkate alınarak sınıflandırmıştır. Yapılan sınıflandırmaya göre serviks kanserleri, kanseri oluşturan hücrelerin kökenlendikleri hücre tiplerine göre skuamöz hücre tümörleri, glandüler tümörler, benign glandüler tümörler, diğer epitel hücre tümörleri, nöroendokrin tümörleri şeklinde isimlendirilmiştir [11].

Kanser, genetik, çevresel ve epigenetik birçok faktörün birleşimi sonucu oluşan bir hastalıktır [12; 13]. Bu faktörlerden en önemlileri, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir [14; 15; 16; 17]. Onkogenler, hücrelerin normal büyümelerini ve gelişmelerini kontrol eden protoonkogenlerin çeşitli nedenlerle oluşan mutasyonlar sonucunda kontrolsüz olarak protein üretmeleri sebebiyle hücreleri sürekli bölünmeye teşvik eden genlerdir [18; 19]. Tümör

baskılayıcı genler ise, hücre döngüsünü kontrol eden ve kontrolsüz bölünmeyi baskılayan genlerdir [20]. Birçok çalışmada bu genlerin anlatımının kanser hücrelerinde azaldığı gösterilmiştir [21]. *BRCA1* geni bu tümör baskılayıcı genlerin en önemlilerinden biridir ve meydana gelen mutasyonların meme kanseri oluşumunda aktif rol oynadığı bilinmektedir [22; 23].

Serviks kanseri sadece kadınlar arasında görülen bir kanser tipidir. 2018 yılında, Amerika'da 13.170 yeni serviks kanseri hastası ve bu hastalığa bağlı 4.210 ölüm meydana gelmesi beklenmektedir. Buna ek olarak, üreme çağındaki kadınlarda meme kanserinden sonra en sık rastlanan kanser tipidir [24].

Serviks kanserlerinin 5 yıllık sağ kalımı %68,8 olarak hesaplanmaktadır ve kadınlar arasındaki insidansının dağılımında etnik köken çok önemli bir unsur oluşturmamaktadır. Serviks kanserlerini en ilgi çekici kılan nokta ise, erken tanı ve tedavi yöntemlerindeki bütün gelişmelere rağmen hastalığın 5 yıllık sağ kalımı 1970'lere oranla günümüzde daha düşük seyretmektedir [25].

Klasik kanser tedavi yaklaşımları cerrahi, hormon terapisi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, gen terapisi olarak gruplanmaktadır [26]. Bu tedavi yaklaşımlarından hangisinin uygulanacağı kanserin tipine ve hastalığın seyrine göre değişmektedir. En çok kullanılan yöntem kemoterapi, kanser hücrelerini yok ettiği kadar hastanın sağlıklı hücrelerine de zarar vermektedir [27]. Serviks kanseri tedavisinde ise, en çok tercih edilen yöntemlerden bir tanesi kemoradyoterapi olarak anılan cisplatin temelli yaklaşım, radyoterapi ve cerrahi operasyonlardır [28]. Bu tedavi yaklaşımlara rağmen serviks kanseri hastalarının 5 yıllık sağ kalımlarında bir iyileşme olmadığı üzerinde durulması gereken bir noktadır.

2.2. BİTKİSEL ÜRÜNLER

Bitkiler insanlar tarafından besin kaynağı olmanın yanı sıra ilaç, tekstil, yakıt ve kimyasal bileşenlerin üretimi için çok uzun yıllardır kullanılmaktadır. Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta kullanılan bitkiler, günlük hayatta kullanılarak nesilden nesile aktarılmıştır ve bu sayede belli bir bilgi birikimi oluşmuştur [29]. Dünyadaki farklı geleneksel tedavi sistemlerinde kullanılan tıbbi bitkilerin farmakolojik özellikleri ve biyolojik aktivitelerinin insanlık yararı için

kullanılmak üzere ortaya konulması için yoğun bir çalışma yürütülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya nüfusunun neredeyse %80'i temel sağlık ihtiyaçları için bitkisel ilaçlara ve/veya bitkisel ürünlere gerek duymaktadır [30].

Tıbbi bitkiler, modern ve geleneksel tıpta kullanılan ilaçların en zengin biyokaynaklarıdır. Geleneksel toplumlar tarafından kullanılan çoğu tıbbi bitkinin etkinliği bilimsel olarak kanıtlanmamış olup bu bitkilerin biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi sağlayacak etkin biyoanalizlere ihtiyaç duyulmaktadır [31]. Etnobotanik çalışmalardan elde edilen bilgi biyolojik kaynakların korunması ve bu kaynaklardan faydalanılması için oldukça önemlidir [29]. Bununla birlikte, geleneksel tıp, bitkilerden elde edilen 1600 yeni ilacın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu yüzden, etnomedikal bitkilere ait bilgilerin ve bilimsel analizlerin bir araya getirilmesi oldukça önemlidir [32]. Temel sağlık tedavisi olarak bitkilerin bölgesel kullanımı farmakolojik özelliklerinden ileri gelmektedir. Çoğu bitki ekstresi etkinliğini metabolitlerinin varlığına borçludur. Bu metabolitler genellikle bitkilerin kök, yaprak, sürgün ve kabuk gibi çeşitli kısımlarında bulunmaktadır. Tıbbi bitkilerin peptitler, doymamış uzun zincirli yağ asitleri, aldehitler, alkaloidler, esansiyel yağlar ve fenolik bileşenler içerdiği farklı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Bu bileşenler virüs, mantar ve bakteriler dahil insan ve hayvan patojenlerine karşı uygulanan tedavilerde oldukça etkindirler [33]. Bu nedenle, bitkilerin çoğu önemli ilaçların kaynağı haline gelmiştir. Böylece ilaç endüstrisi sentetik ilaçların hazırlanmasında kullanılabilen biyoaktif ajanların bir kaynağı ve/veya modeli olarak geleneksel tıptan etkin bir şekilde faydalanmaktadır [34].

Doğal ürünler ve doğal ürünlerden elde edilen ilaçlar viral ve bakteriyel enfeksiyon, kanser ve immünolojik bozukluklar olarak kategorize edilen insan hastalıklarının %87'sinin tedavisinde kullanılmaktadır. Dünyada reçetelendirilen ilaçların yaklaşık olarak %25'i bitkisel orijinli olup 3.000'den fazla bitki türünün ise antikanser özelliklerinin olduğu bildirilmiştir [35]. "Paclitaxel", "vinblastine", "irinotecan", "topotecan", "etoposide" ve "combretastatin" gibi klinik öneme sahip ilaçlar bitkilerden elde edilmiştir.

Antikanser ilaçlar, kanser hücreleri dışında normal hücreleri hedef alan çeşitli mekanizmalarla etkili olabilirler. Bununla birlikte, çoğu antikanser ilaçların birincil hedefi tümör hücreleridir. *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen terpenoit ve "paclitaxel" apoptoz yolu ile hücre ölümünü tetiklerken, "vincristine" (Oncovin), "vinorelbine" (Navelbine) ve "teniposide" (Vumon) doğrudan tümör hücreleri üzerinde etkilidirler [5]. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve

bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar, tıbbi bitkilere olan ilgiyi tekrar üzerine toplamıştır. Bunun başlıca sebepleri arasında; bitkilerin kolay ve ucuz tedavi olanağı sağlaması, sentetik bileşiklerin bazılarında görülen ve kullanılmaya başlandıktan sonra anlaşılan yan etkilerine göre bitkisel ilaçların yan etkilerinin daha az olması, sentetik bileşiklerin genellikle tek bir etkiye sahip olmasına karşın bitkisel ilaçların birkaç etkiye birden sahip olması sayılabilir. Doğal olmaları nedeniyle insan vücudu tarafından kolayca kabul edilen, arzu edilmeyen yan etkileri ya da zararları yılların deneyimiyle iyi bilinen, içermiş oldukları etken maddelerin yapılarının aydınlatılmasıyla, aynı etkiyi gösterebilecek birçok sentetik ilaç için model olarak kullanılabilen bitkisel materyaller halen modern tıbbın vazgeçilemez unsurlarındandır. Ayrıca iyi değerlendirildiklerinde ülkeler için büyük bir ekonomik potansiyel kaynaklarıdır [36; 2].

Türkiye büyük bir halk tıbbı bilgisine ve zengin bir floraya sahiptir, bu nedenle ilgili çalışmalar için potansiyel bir kaynak sunmaktadır. Bitki çeşitliği anlamında en zengin ülkelerden birisi Türkiye'dir. Sınırları dahilinde yaklaşık 10.500 tür tanımlanmış olup bunların %30'u endemiktir [29]. Bir yerin çevresel öneminin ortaya konulmasında endemizm önemli bir belirleyicidir. Diğer Avrupa ülkeleriyle kıyaslandığında Türkiye'deki endemizm oranı oldukça yüksektir. Türkiye'deki geleneksel tıp çalışmaları Cumhuriyetin kuruluşundan (1923) bu yana ilerleyerek devam etmiştir [36; 29]. Günümüzde kırsal alanlarda yaşayan insanların büyük bir çoğunluğu geleneksel olarak besin ve tedavi amaçlı bitkileri kullanmaktadır. Son yıllarda, tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin geleneksel kullanımları Türkiye'de de araştırmacıların dikkatini çekmiştir [29].

Çalışmamızda, 3 tanesi Türkiye'ye endemik olan toplam 8 bitkiye ait bilgiler Tablo 2.1'de bitkilerin genel görünüşleri ise Şekil 2.1-8'de verilmektedir.

Tablo 2.1: Bu çalışmada *in vitro* sitotoksik aktiviteleri değerlendirilen bitkiler.

Kod	Botanik Adı	Aile	Örnek No	Bitkinin Kullanılan Kısmı	Toplanılan Bölge
U1	<i>Crataegus orientalis</i> Pall. ex M.Bieb.	<i>Rosaceae</i>	98194	Yapraklar	Mersin
U2	<i>Centaurea kilaea</i> Boiss.(endemik)	<i>Asteraceae</i>	68296	Toprak üstü kısımları	Tekirdağ
U3	<i>Centaurea hermannii</i> F.Herm. (endemik)	<i>Asteraceae</i>	80922	Toprak üstü kısımları	Kırklareli
U4	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.subsp. <i>monogyna</i>	<i>Rosaceae</i>	109080	Yapraklar	Tekirdağ
U5	<i>Kitaibelia balansae</i> Boiss. (endemik)	<i>Malvaceae</i>	115453	Yaprak ve çiçekler	Kahramanmaraş
U6	<i>Crataegus pontica</i>	<i>Rosaceae</i>	-	Yapraklar	-
U7	<i>Plantago lanceolata</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	106794	Yapraklar	Edirne
U8	<i>Centaurea behen</i> L.	<i>Asteraceae</i>	98997	Toprak üstü kısımları	Malatya

2.2.1. *Crataegus orientalis*, *C. monogyna* ve *C. pontica*

Crataegus, alıç olarak bilinmektedir ve *Rosaceae* ailesine aittir. Bu bitki, dünyanın ılıman kuzey bölgesinde geniş yayılım gösterir. 280 türü ile en çok Doğu Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunur. Bu tez kapsamında, kullanılacak olan *C.orientalis* Akdeniz Bölgesi, Türkiye, Kırım ve Batı İran'da bulunur. Meyveleri turuncu ya da kırmızının farklı tonlarındadır [37; 38; 39]. *Crataegus* cinsleri çok yüksek miktarda flavonoid benzeri yapılar içerirler ve bu küçük moleküller sayesinde çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler. *C. laevigata* ve *C. monogyna* bitkileri soğuk ve kuraklık stresine maruz bırakıldıkları zaman bu bitkilerden elde edilen ekstraların antioksidan aktivitelerinin de arttığı rapor edilmiştir [40]. Başka bir çalışmada, *Crataegus aronia*'nın da önemli derecede antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [41]. *Crataegus monogyna*, türüne ait ekstraların aynı zamanda antimikrobiyal ve antienflamatuar etkilerinin de olduğu gösterilmiştir [42].

Crataegus genusuna ait bitkiler çok çeşitli biyoaktiviteler gösterebilirler de *Crataegus orientalis*, *Crataegus monogyna* ve *Crataegus pontica* türlerinin antikanser aktiviteleri ile ilgili literatür taramaların da çok fazla bilgi yer almamaktadır.



Şekil 2.1: *Crataegus orientalis* türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [43].



Şekil 2.2: *Crataegus monogyna* türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [44].



Şekil 2.3: *Crataegus pontica* türüne ait meyve ve yaprak görüntüsü [45].

2.2.2. *Centaurea kilaea*, *C. hermannii* ve *C. behen*

Centaurea genusu Türkiye’de en yaygın olarak bulunan genuslardan bir tanesidir [46]. Yabani tür olarak yetişen 205 taksonu bulunmaktadır [47; 48]. *Centaurea* genusu flavonoid, terpen ve laktonlar açısından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. Geleneksel halk tıbbında bu genusa ait bitkiler yüksek ateşin tedavisinde, karaciğer ve böbrek hastalıklarının tedavisinde, antidiyabetik olarak kullanılmaktadır [36; 49]. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda *Centaurea* genusuna ait 3 tür kullanılmıştır.

Centaurea kilaea, yaklaşık bir metre boyuna kadar uzayabilen, kumlu sahil ve kumsal tepesinde yetişen bir bitkidir. Genellikle deniz seviyesinde yetişir. Türkiye’ye ait endemik bir türdür ve halk arasında Kilyos düğmesi olarak bilinir. Çiçeklenme zamanı Haziran-Ağustos arasında olan bu bitki Düzce, İstanbul, Kırklareli ve Sakarya çevresinde yetişir [50].

Centaurea hermannii, Çatalca peygamber çiçeği olarak bilinmektedir. Türkiye’ye endemik olan çok yıllık bir türdür. Yalnızca Marmara bölgesinde yetişir, maki topluluklarında ya da meşe ormanlarında rastlanır. Taban yaprakları parçalı ve dik gövdeli, turuncu çiçekleri vardır. *Centaurea hermannii*, kullanılarak yapılan çalışmaların çoğunluğu ekstre içeriğinin

aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalardır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, ekstre içeriğinin yüksek oranda β -sitosterol, α -amyrin gibi maddeleri içerdiği tespit edilmiştir [51].

Centaurea behen yaklaşık bir metreye kadar uzayabilen, dik gövdeli, dikensiz, sarı çiçeklere sahip ve geniş yapraklı çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenme dönemi Haziran-Ağustos dönemidir. Filistin, Lübnan, Kuzey Irak, Kuzeybatı ve Kuzey İran'dan Türkiye'de Doğu Anadolu'ya kadar geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir. Genellikle 340-1730 metre arası yükseltide ve kayalık yamaçlarda, meralarda ve kumlu-taşlı alanlarda görülür. Yem değeri olmayan bir bitki olup istilacı bitki sınıfında yer alır [52].

Centaurea behen'in kökleri eski yıllardan beri Hindistan'da bitkisel ilaç yapımında da kullanılmaktadır. Bu bitkinin kökleri ile yapılan bir çalışmada CCl_4 'ün indüklediği hepatoselüler hasara karşı doza bağımlı bir koruma sağlayabildiği gösterilmiş ve bunun da karaciğer hasarına karşı etkili bir antioksidan etkiden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir [53]. Ayrıca farklı çalışmalarda köklerinden hazırlanan etanol ekstresinin antioksidan [54], tüm bitkiden hazırlanan metanol ekstresinin antioksidan [55], antibakteriyel [56; 57], antifungal [57], antianjiyogenik [58] aktiviteleri olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.4: *Centaurea kilaea* türüne ait çiçek görüntüsü [59].



Şekil 2.5: *Centaurea hermannii* türüne ait çiçek görüntüsü [60].



Şekil 2.6: *Centaurea behen* türüne ait çiçek görüntüsü [61].

2.2.3. *Kitaibelia balansae*

Kitaibelia cinsinin Türkiye’de bulunan tek türü *Kitaibelia balansae*’dır. Çok yıllık karasal bir otsu bitki olan *Kitaibelia balansae* uzun ve dallanmış gövdeye sahiptir. Her dal üzerinde bir tane pembe renkte çiçek bulunmaktadır. Haziran-Eylül ayları arasında çiçeklenme gerçekleştirmektedir. Kökleri yaklaşık 100-150 cm uzunluğunda olabilmektedir. *Kitaibelia balansae* 1100-1900 m arasındaki yüksekliklerde doğal olarak görülmektedir. Mersin Gülekboğazi’ndan 1855 yılında ilk defa Balansa tarafından toplanmıştır [62].

Kitaibelia balansae ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında (2015) bu bitkinin uçucu yağlarının ve biyolojik aktif bileşiklerinin taraması yapılmıştır. Çalışma sonucunda antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi olan hiperisin, antidepresan etkisi olan hiperforin, antiviral etkileri olan likokalkon, antimikrobiyal, antioksidan ve antidiyabetik etkileri olan mangiferin gibi önemli moleküller rapor edilmiştir [63]. Yapılan bir diğer çalışmada ise yaprak, çiçek ve gövdeden elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Çiçek ve gövdeden yapılan ekstrelerde antimikrobiyal aktivite görülürken, yaprak ekstrelerinde hangi bir aktivite görülmemiştir [64].



Şekil 2.7: *Kitaibelia balansae* türüne ait çiçek görüntüsü [65].

2.2.4. *Plantago lanceolata*

Plantago lanceolata (Dar yapraklı sinirli ot) gövdesi yuvarlak, yaprakları kısa saplı ve paralel damarlı, çok yıllık karasal otsu bitkidir. Çiçekleri uzun sapın ucunda başak şekilde bulunur. Nisan-Ağustos arası çiçek açar. Avrasya'ya özgü bir bitki olmasına rağmen Kuzey Amerika ve dünyanın birçok yerinde uygun yaşam alanlarında görülmektedir. Geleneksel tıpta *Plantago lanceolata*'nın bazı kısımları, idrar söktürücü, antienflamatuvar, antibakteriyel, deri ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı rapor edilmektedir [66; 67]. *Plantago lanceolata* hayvanların beslenmesinde de önemli bir yere sahiptir [68].

Plantago lanceolata'nın yapraklarından yapılan analizlerde birkaç aktif molekül izole edilmiştir. Bu moleküller laksatif ve diüretik etkisi olan aucubin, asperuloside, catalpol; antienflamatuvar etkiye sahip olan apigenin, 7-O-glukosit ve skutellareindir [69]. *Plantago lanceolata*'dan hazırlanan ekstraktlar ile yapılan çalışmalarda birçok biyolojik aktivite ortaya konmuştur. Bitkinin toprak üstü kısmı ile yapılan çalışmalarda bronşiyal nezle, farenksin mukoz membranındaki inflamasyonun ve ağız-boğaz hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı rapor edilmektedir [70; 71]. *Plantago lanceolata*'nın metanol ekstresi ile insan renal adenokarsinoma (TK-10), meme adenokarsinoma (MCF-7) ve melanomu (UACC-62) hücre hatları üzerinde yapılan çalışmada, bu kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bitkinin antikanser etkisinin sahip olduğu luteolin-7-O-β-glukozit flavonoide bağlı olduğunu bildirilmiştir [72]. *Plantago lanceolata*'nın su ekstresinin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [73]. Ayrıca bitkinin yaprak kısımlarında bulunan polisakkaritlerin, makrofajları aktive ederek immun düzenleyici etkilerinin olduğu rapor edilmiştir [74].



Şekil 2.8: *Plantago lanceolata* türüne ait çiçek görüntüsü [75].

Bu çalışmada, 3 tanesi Türkiye'ye endemik olan toplam 8 bitki ekstresinin normal transforme hücre hattı (Vero) ve serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerindeki sitotoksik etkilerini mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi (MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-II)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA) DP Sistemi ile hücre indeksi değerlerinin belirlenmesi, hücre çoğalmasını takip eden Karboksi Floresein Suksinimidil Ester (CFSE) boyama yöntemi ve DNA miktarını ölçen propidium iyodür (PI) boyama yöntemi ile ortaya koyarak bitkilerin antikanser aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELERİN HAZIRLANMASI

3.1.1. Stok EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) Hazırlanması

9,5 gram toz EMEM tartıldı. 100 mL distile su içinde iyice çözününceye kadar karıştırıldı. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. +4°C'de saklandı.

Stok EMEM'den 200 mL besiyeri hazırlamak için, 20 mL stok besiyeri, 20 mL ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), 2 mL antibiyotik-antimikotik karışımı [(penisilin (100 U/mL), streptomisin (100 µg/mL), amphoteresin B (0,25 µg/mL)], 2 mL sodyumbikarbonat (NaHCO₃) ve 156 mL steril distile su eklendi ve nazikçe karıştırıldı. +4°C'de saklandı.

3.1.2. Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (DPBS) Hazırlanması

9,55 g toz halindeki DPBS 1 L distile suda çözdürüldü. 121°C'de 1,2 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.1.3. Tripsin Hazırlanması

70 mL steril DPBS içine 0,2 g tripsin ve 0,04 g etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) eklendi ve karışım 100 mL'ye tamamlandı. Ultrasonik su banyosu yardımıyla çözdürüldü. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanım kolaylığı açısından mikro santrifüj tüplerine bölünüp, -20°C de saklandı.

3.1.4. Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) Hazırlanması

%5'lik NaHCO₃ hazırlamak için 2,5 g sodyum bikarbonat tartıldı ve hacim 50 mL'ye tamamlandı. 121°C'de 1,2 atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.1.5. MTT(3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hazırlanması

Mililitrede 5 mg olacak şekilde 200 mL hazırlamak için, 1 g MTT, 200 mL PBS'de ultrasonik su banyosu yardımıyla çözdürüldü. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. 15 mL'lik santrifüj tüplerine bölündü ve alüminyum folyo ile sarılıp -20°C'de saklandı.

3.1.6. CFDA, SE (Karboksi Floresein Diasetat Suksinimidil Ester) Hazırlanması

1 flakon CFDA, SE üzerine firmanın talimatları doğrultusunda 18 µL steril dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Nazikçe pipetaj işlemi yapıldı. +4°C’de saklandı.

3.2. BİTKİLERİN ELDESİ VE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI

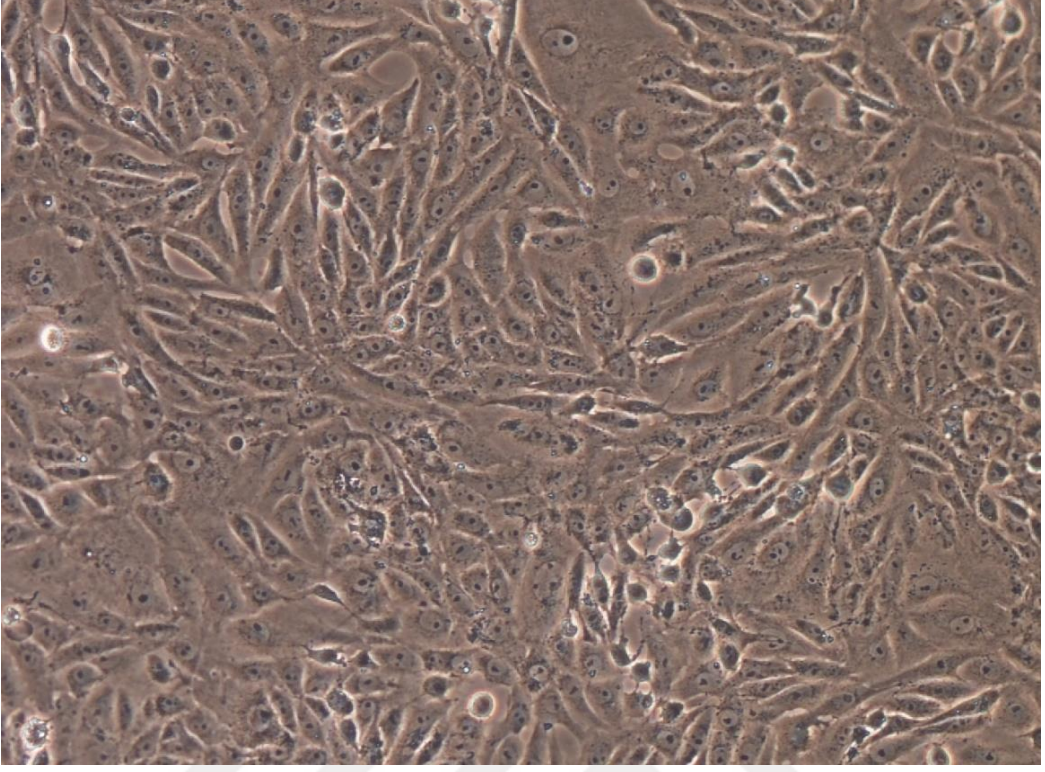
Bu tezde kullanılan bitkilerin toplanması, metanolik ekstralarının hazırlanması İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalında gerçekleştirilmiş olup, ekstralar Doç. Dr. Çağlayan GÜRER’den temin edildi.

Kurutulmuş bitki materyalleri (*Crataegus orientalis* Pall. ex M.Bieb., *Centaurea kilaea* Boiss., *Centaurea hermannii* F.Herm., *Crataegus monogyna* Jacq.subsp. *monogyna*, *Kitaibelia balansae* Boiss., *Plantago lanceolata* L., *Centaurea behen* L.) oda sıcaklığında metanol (% 95) ile perkole edildi. Metanol ekstraları 40 ile 50°C’de kuruyana kadar döner evaporatörde bekletildi. Daha sonra metanol ekstraları 72 saat -80 °C’de bekletilip donduruldu ve bu süre sonunda liyofilizasyon ile çözücü olan metanol uçurularak kuru ekstralar haline getirildi. Toplam ekstre miktarları hassas terazide tartılarak belirlendi ve her biri ayrı bir deney tüpüne aktarılıp karanlıkta +4 °C’de muhafaza edildi.

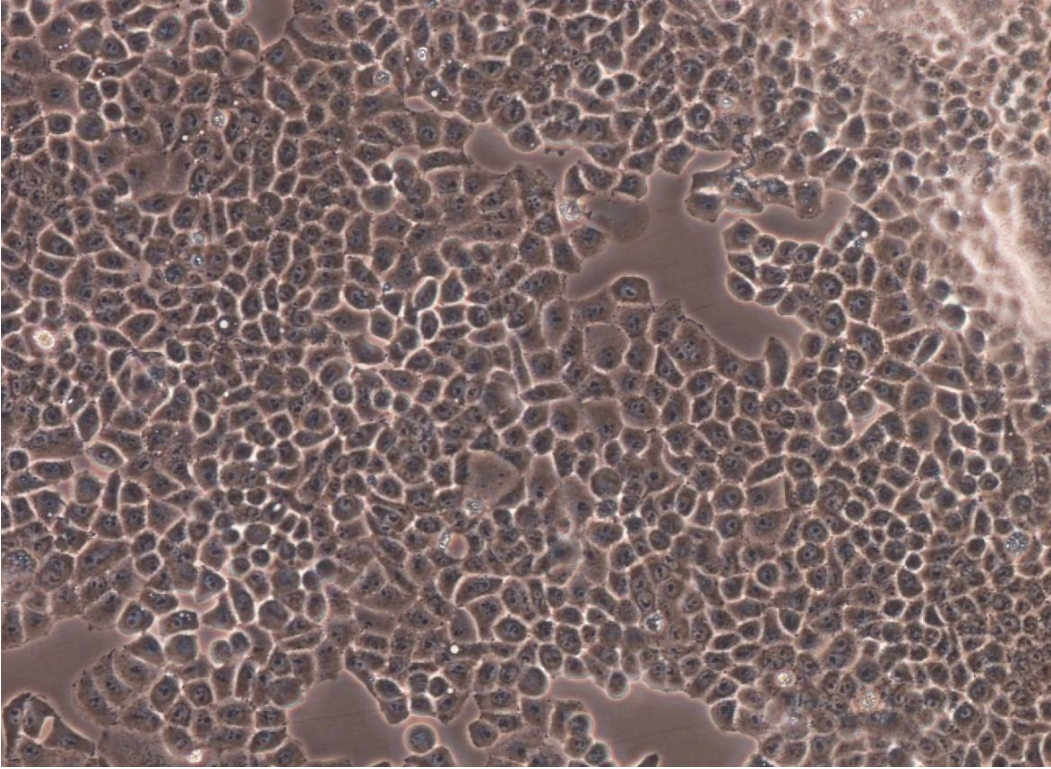
Tüm ekstraların stok konsantrasyonları 10 mg/mL olacak şekilde vorteks ve ultrasonikatör ile su içinde tam olarak çözünmeleri sağlandı. Ana stoklar 0,45 µm çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Hazırlanan ekstre ana stokları (10 mg/mL) Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM) besiyerleri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve kültür ortamlarına aktarıldı.

3.3. HÜCRE HATLARI

Hazırlanan ekstraların *in vitro* antikanser aktivite potansiyellerini belirlemek amacıyla deneylerimizde normal transforme hücre hattı olan Vero [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı] ve kanser hücre hattı olan HeLa (1951 yılında insan serviks karsinomundan elde edilmiş epitel hücre hattı) hücreleri kullanıldı. Hücrelerin devamlılığını sağlamak için, haftada 2 defa pasajlama işlemi yapıldı.



Şekil 3.1: Vero hücrelerinin 48. saat sonunda tek tabaka görüntüsü (100x optik büyütme).



Şekil 3.2: HeLa hücrelerinin 48. saat sonunda tek tabaka görüntüsü (100x optik büyütme).

3.3.1. Hücre Hatlarının Sıvı Azottan Açılması

HeLa ve Vero hücreleri sıvı azottan alındıktan sonra 37°C’de su banyosunda çözdürüldü. 15 mL’lik santrifüj tüplerinde 5 mL besiyeri üzerine 1 mL çözünmüş hücre eklendi. 5 dakika 1200 devir/dakika’da santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. 5 mL besiyeri ile pipetaj yapılarak kültür kabına alındı. 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. Sıvı azottan çıkarılan hücreler, yeniden geçerli morfolojilerini göstermeleri ve standart büyüme eğrilerine ulaşmaları için deneylere başlamadan önce 4 kez pasajlandı (alt kültürleme). Daha sonra deneylerde kullanıldı.

3.3.2. Hücre Kültürlerinin Devamlılığının Sağlanması

Tam tabaka oluşturmuş HeLa ve Vero hücrelerinin (monolayer) devamlılıklarının sağlanması için yeni kültür ortamına aktarılması (pasajı) gerekmektedir. Bu amaçla, öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler, Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile üç kez yıkandı ve Tripsin/EDTA enzim çözeltisi (kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS içerisinde hazırlanmış %0,2 Tripsin ve %0,04 EDTA çözeltisi ile 3-5 dakika süreyle 37°C’de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine antibiyotik-antimikotik karışımı ve ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS içeren taze EMEM eklendi ve hücreler 1500 devir/dakikada, 5 dakika süreyle santrifüj edilerek toplandı ve ardından taze EMEM ile hücreler yeniden süspanse edildi. Hücreler hemositometrede sayılarak, yaklaşık 2×10^4 hücre/cm² olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarıldılar. Daha sonra kültür kapları %90’dan fazla bağıl nem ve %5 CO₂ sağlayan 37°C’lik etüve (Heraus B-5060 EK/CO₂) kaldırıldılar. Aynı işlemler ortalama haftada iki kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlandı.

3.3.3. Hücre Hatlarının Dondurularak Saklanması

Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler erken pasajlarında iken dondurularak saklandı. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüjlenerek toplandı. %45 FBS, %10 DMSO ve %45 EMEM içeren saklama ortamına 1×10^7 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları kademeli olarak donduruldu (-80°C ve -196°C).

3.4. EKSTRELERİN HÜCRE HATLARININ ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

3.4.1. Sitotoksite Analiz Testleri

Tez kapsamında kullanılan bitkisel ekstraların Vero ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için kolorimetrik bir yöntem olan MTT [76] yöntemi ve gerçek zamanlı hücre ölçümü ile sitotoksiteyi belirleyen xCELLigence yöntemleri kullanıldı [77].

3.4.2. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-II)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Yöntemi

MTT kolorimetrik yöntemi, canlı hücrelerin sarı MTT'yi mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile suda çözünmeyen koyu kahverengi formazan kristalleri şekline çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO ile çözündürülerek canlılıkla doğru orantılı olarak oluşan rengin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçümü temeline dayanır.

Bu doğrultuda, 96 kuyucuklu kültür kaplarına 2×10^5 hücre/mL'lik hücre (Vero ve HeLa) stoğundan 100 μ L/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 18 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdaki besiyerleri uzaklaştırılmadan kuyulara değişik konsantrasyonlarda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri 100 μ L olarak eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik inkübasyonundan sonra kuyulardaki EMEM besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara (30 μ L/kuyu) MTT eklendi ve 3 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda her kuyuya 150 μ L DMSO eklendi ve kültür kapları 30 dakika oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için karıştırıldı. Daha sonra oluşan renk 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Absorbsiyon değerlerinden kontrole göre karşılaştırılarak % cinsinden hücrelerin canlılık ve inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanarak belirlendi (Denklem 3.1 ve 3.2).

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100 \quad \text{Denklem (3.1)}$$

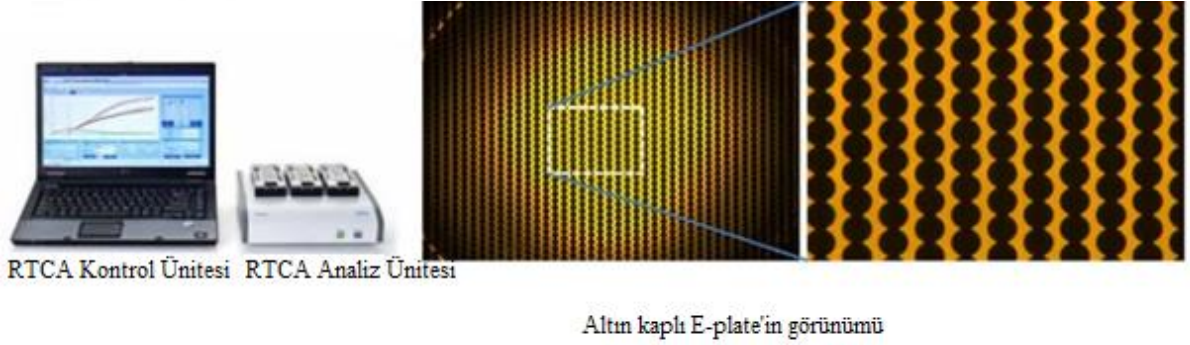
$$\% \text{ İnhibisyon} = (1 - (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı})) \times 100 \quad \text{Denklem (3.2)}$$

Ekstrelerin Vero ve HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkilerini ortaya koymak için hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten IC_{50} (Hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan μ g/mL cinsinden ekstre konsantrasyonu) değerleri belirlendi. Her iki hücre hattı için elde edilen IC_{50} değerleri ile her bir metanolik bitki ekstresinin seçicilik indeksi (Selectivity Index; SI =

IC₅₀ Vero hücresi / IC₅₀ HeLa hücresi) değeri de belirlendi. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

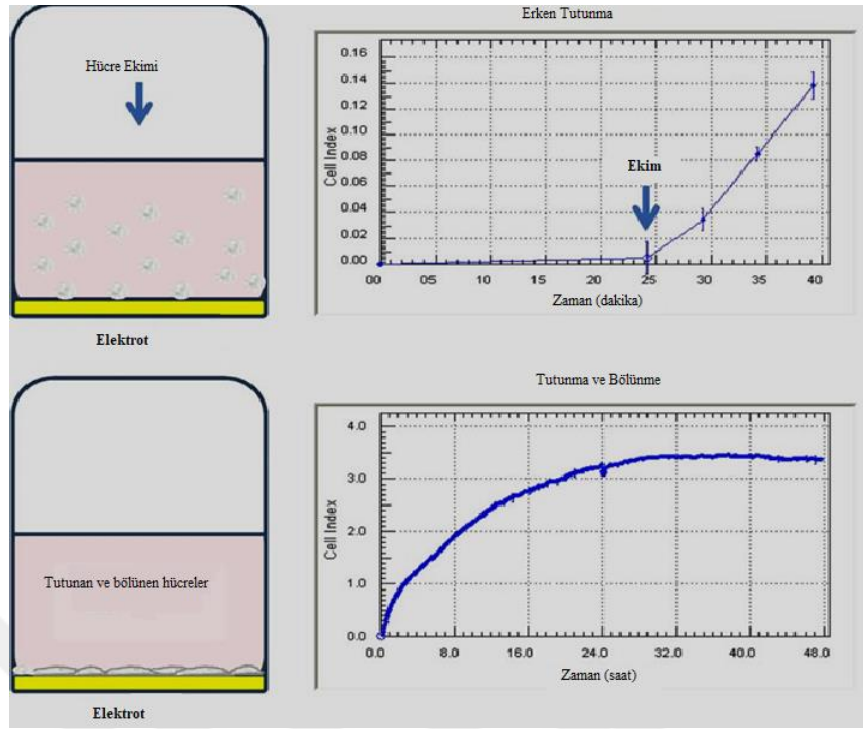
3.4.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi

xCELLigence, gerçek zamanlı hücre analiz cihazı (RTCA), altın elektrotlardan oluşan özel bir yüzey üzerine hücrelerin tutunması ve artan tutunmaya bağlı olarak, bu elektrotlardan geçen mikro akım miktarındaki azalmayı ölçerek gerçek zamanlı olarak hücre canlılığını ölçmeyi sağlamaktadır [78].



Şekil 3.3: xCelligence cihazı ve kullanılan altın kaplı kültür kaplarının yüzeyi [78].

Bu doğrultuda, E-plate adı verilen 16 kuyucuklu özel kültür kaplarının her bir kuyusuna 50 µL besiyeri eklendi, daha sonra E-plate xCELLigence istasyonuna yerleştirildi ve arka plan empedansı ölçüldü. Bu ölçümden sonra, her bir kuyuya 1.6×10^5 hücre/mL hücre stoğundan 50 µL eklendi. Hücreler 18 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. 18 saat sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine değişik konsantrasyonlarda bitki ekstraktlarını içeren ve içermeyen 100 µL taze besi yeri eklendi ve karbondioksitli etüvde 48 saat inkübe edildi. RTCA 2.0 yazılımı kullanılarak 15 dakikalık periyotlar ile her bir kuyudaki empedansa bağlı olan hücre indeksi ölçüldü. Deney sonunda, RTCA 2.0 yazılımı kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki hücre indeksi (cell index) değişimleri analiz edildi ve IC₅₀ hesaplaması yapıldı.



Şekil 3.4: xCELLigence ile yapılan ölçümlerde hücre artışına bağlı olarak ölçülen hücre indeksi değerleri [78].

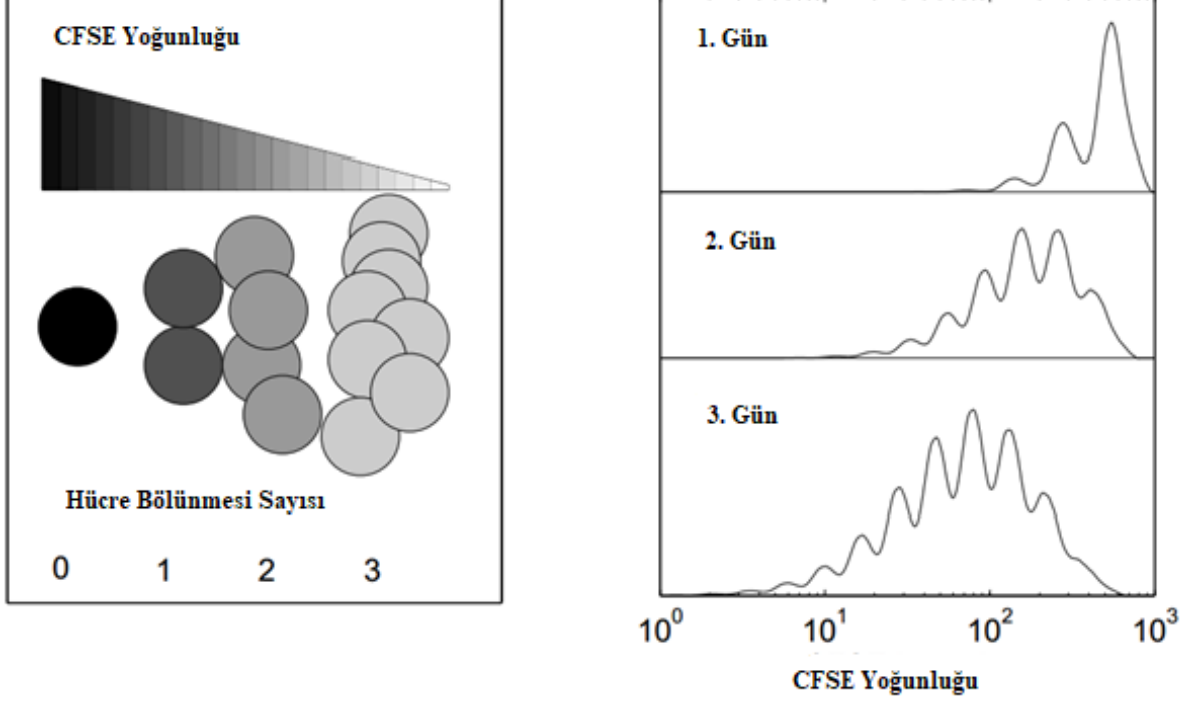
3.4.4. Hücre Generasyonu ve Hücre Siklusunu Analiz Testleri

Tez kapsamında kullanılan bitkisel materyalin Vero ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT ve xCELLigence yöntemiyle belirlendikten sonra hücre generasyonunu belirlemek için florimetrik bir yöntem olan CFSE yöntemi, hücre siklusunu analizi için ise Propidium İyodür (PI) boyama yöntemi kullanıldı [79].

3.4.5. Hücre Generasyonunun CFSE Yöntemiyle Belirlenmesi

Karboksi Floresein Suksinimidil Ester (CFSE) yöntemi, hücre generasyonunun takibi için kullanılan floresan bir yöntemdir. Karboksi Floresein Dasetat Suksinimidil Ester (CFDA, SE) hücre içine girmeden önce floresan olmayan bir boyadır. Hücre içine girdikten sonra, hücre içi esterazlar tarafından asetat grupları kesilir bunun sonucunda karboksi floresein molekülünün membran geçirgenliği engellenir ve floresan özellik kazanır. Suksinimidil ester grubu ise hücre içi serbest amin gruplarına bağlanır ve her bir mitoz bölünmede sonraki nesillere miktarı azalarak aktarılan Karboksi Floresein Suksinimidil Ester (CFSE) halini alır [80].

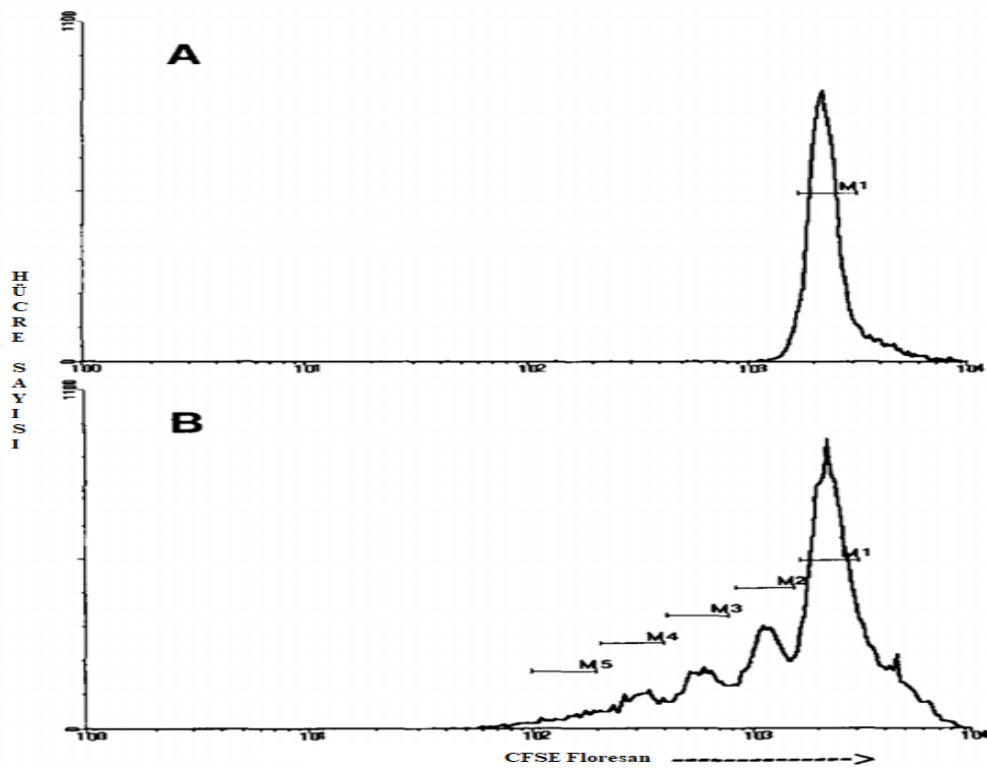
Bu hücre içindeki azalma, hücre başına düşen emisyon miktarının da azalmasına yol açarak Akan Hücre Ölçer analiz programlarına yansır [81].



Şekil 3.5: CFSE yoğunluğu ve bölünme sayısı ilişkisini gösteren grafik ve histogram [82].

Hücre nesillerini takip etme amacıyla, hücreler tripsinle tutundukları yüzeyden kaldırıldı, üzerlerine 5 mL EMEM besiyeri eklendi. 1800 devir/dakika santrifüj yapılarak hücreler çöktürüldü. Üst faz atıldı, üzerlerine 1 mL besiyeri eklenerek hücreler tekrar süspansiyon edildi ve hemositometri yardımıyla sayıldı ve en fazla hücre sayısı 2×10^7 hücre olacak şekilde 1 mL besiyerinde tekrar seyreltilti. Bu hücre süspansiyonunun içerisine, daha önceden hazırlanmış olan CFDA, SE 1 μ L olarak karanlık ortamda eklendi ve nazikçe pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu karıştırıldı. 6 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, fazla boyayı uzaklaştırmak için 5 mL serumlu besiyeri eklenerek nazikçe pipetaj yapılarak 1800 devir/dakikada santrifüj yapıldı ve üst faz atıldı. Bu basamak 2 kez tekrarlandı. 2. santrifüjden sonra hücreler süspansiyon edildi ve hemositometri yardımıyla sayıldı. 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyu başına 500 μ L olacak şekilde ekildi. Hücreler 18 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. 18 saat sonunda, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmadan değişik konsantrasyonlarda bitki ekstraktlarını içeren ve içermeyen 500 μ L taze besiyeri eklendi ve

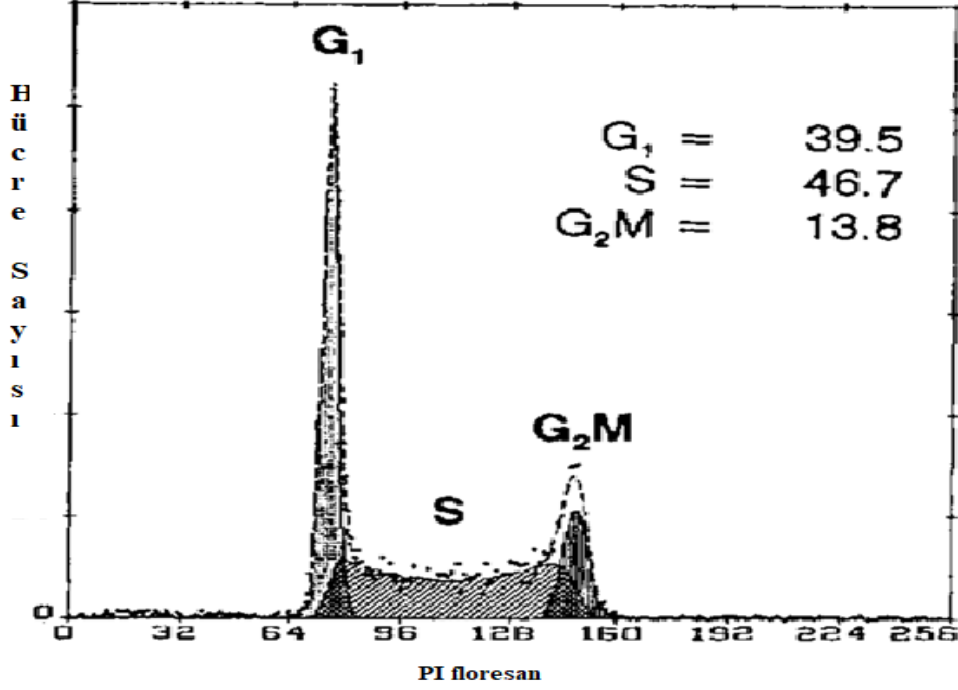
karbondioksitli etüvde 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildi. 24. ve 48. saatin sonunda hücreler, eksitasyon/emisyon dalgaboyu 495 nm / 517 nm olacak şekilde BD FACS Akan Hücre Ölçer cihazında ölçüldü. Konsantrasyonlara göre hücre başına düşen ortalama emisyon değerinde meydana gelen değişime göre analiz işlemi yapıldı. Elde edilen veriler FlowJo ve Modfit programı ile analiz edildi.



Şekil 3.6: Hücre bölünmeleri ile CFSE miktarındaki azalmayı gösteren histogram A) Uyarılmamış splenosit kültürü B) anti-CD3 ile uyarılmış splenosit kültüründe meydana gelen değişim [83].

3.4.6. Propidium İyodür (PI) Boyama ile Hücre Siklusu Analizi

Propidium İyodür (PI) DNA ve RNA farkı gözetmeksizin nükleik asitlere bağlanan floresan bir boyadır. Akan Hücre Ölçer'nin kırmızı floresan kanalında ölçülür ve hücrelerin sahip olduğu DNA miktarını histogram şeklinde verir [84].



Şekil 3.7: PI floresan emisyonuna göre hücre döngüsünün bölümlerini gösteren histogram [85].

Hücre döngüsünü PI ile analiz edebilmek için, hücreler öncelikle 24 kuyucuklu plakalara 10^5 hücre/mL olacak şekilde 1 mL ekildi. 24 saat %5 CO_2 varlığında inkübe edildi. 24 saat sonunda, değişen konsantrasyonlarda ekstratler uygulandı ve 48 saat tekrar inkübasyona bırakıldı. 48. saatin sonunda hücreler, PBS ile 2 defa yıkandı ve tripsin ile yüzeyden kaldırıldı. Üzerlerine besiyeri eklendi ve santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Çöken hücreler, 2 mL %70 soğuk etanol ile vortekslendi ve $4^\circ C$ 'de 30 dakika fikse olmaları için bekletildi. 30 dk sonrasında 4 mL PBS nazıkçe pipetaj yapılarak eklendi ve hücreler tekrar santrifüjlendi. Hücrelerin üzerine 200 μL bağlanma tamponu eklendi sonrasında 10 μL PI eklenip oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk boyanması için bekletildi. Akan Hücre Ölçer'de, 605 nm emisyon olacak şekilde ölçüm yapıldı. Tüm deneyler 3 tekrar olarak yapıldı. Elde edilen veriler FlowJo programı ile analiz edildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

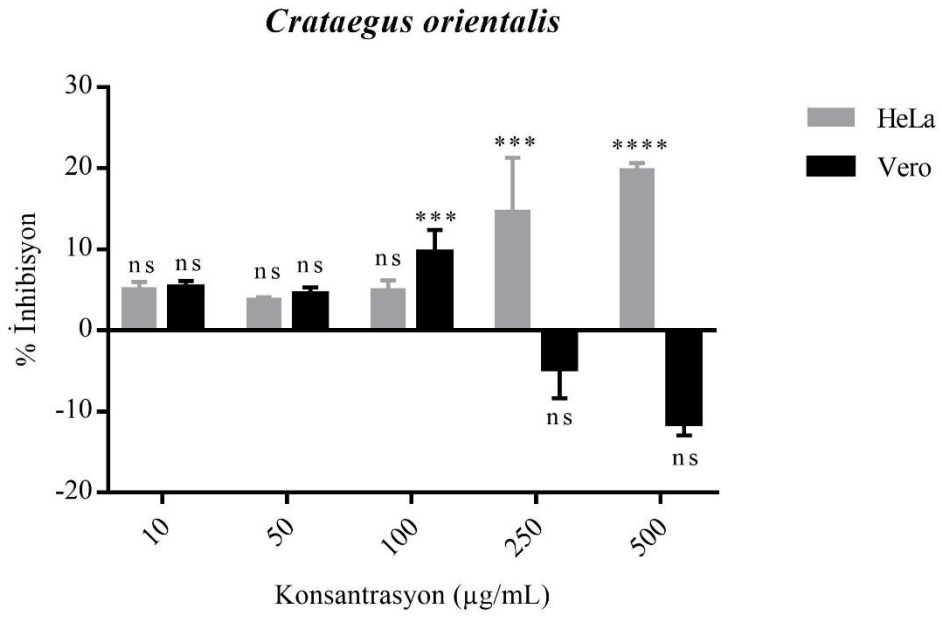
Deneylere ait tüm sayısal veriler kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel olarak GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) kullanılarak değerlendirildi. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları tek yönlü ANOVA ve Dunnett testi ile değerlendirildi. Anlamlılık değeri olarak $P < 0.05$ seviyesi temel alındı.



4. BULGULAR

4.1. MTT (3-(4,5-DİMETİLTİYAZOL-2-İİ)-2,5-DİFENİL TETRAZOLYUM BROMÜR) YÖNTEMİ İLE HÜCRE CANILIĞININ BELİRLENMESİ

Çalışmamızda 8 metanolik bitki ekstresinin ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyon değerlerine göre Vero ve HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerleri ortaya konulmuştur. Konsantrasyonlara karşı % inhibisyon değerlerine göre hazırlanan grafikler Şekil 4.1-8'de gösterilmektedir. Bu grafiklere ait inhibisyon değerleri Tablo 4.1-8'de verilmiştir. Ayrıca her iki hücre hattı için grafiklerden hesaplanan IC_{50} (half maximal inhibitory concentration: hücrelerin % 50'sinin ölümüne yol açan konsantrasyon) değerlerine ve IC_{50} değerlerinden hesaplanan, SI (Vero IC_{50} /HeLa IC_{50}) değerlerine göre hazırlanan sonuçlar ise Tablo 4.9'de verilmektedir.

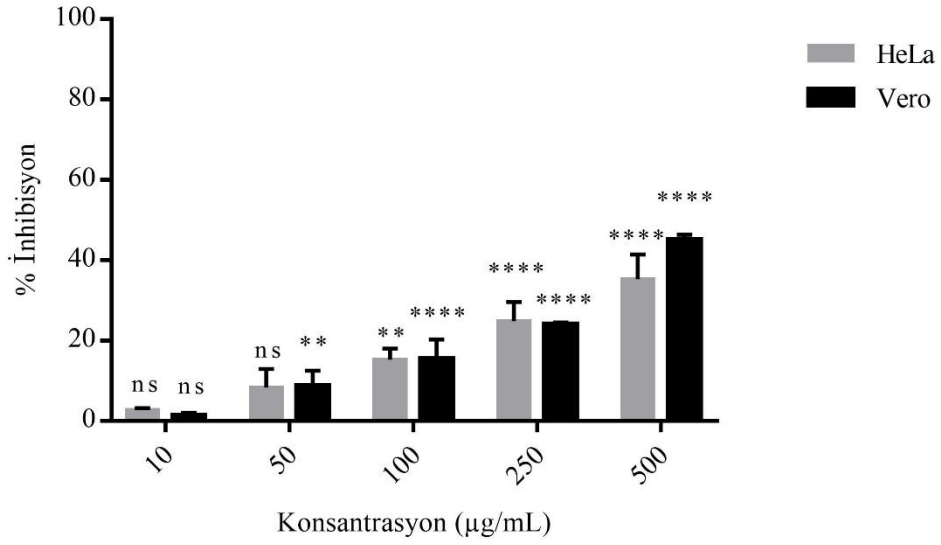


Şekil 4.1: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus orientalis* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.1: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus orientalis* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	5,26	5,10
50	4,45	3,83
100	9,62	4,99
250	-4,70	14,66
500	-11,44	19,77

Crataegus orientalis ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonuna kadar uygulanan değerlerinin HeLa ve Vero hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi saptanmamıştır. 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonları Vero hücrelerinde proliferatif etki gösterirken, HeLa hücrelerinde hafif sitotoksik etki göstermektedir.

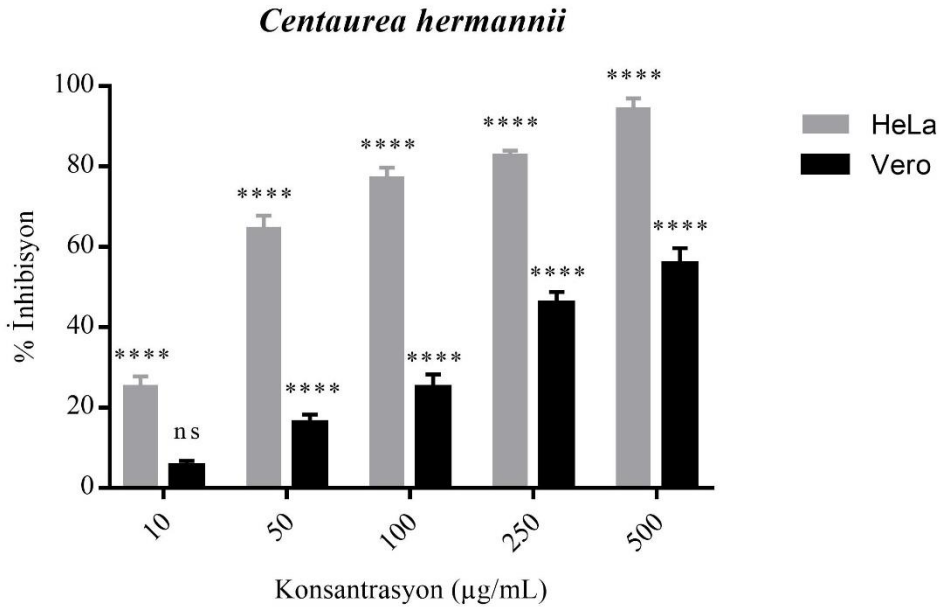
Centaurea kilaea

Şekil 4.2: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea kilaea* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.2: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea kilaea* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	1,30	2,78
50	8,69	8,40
100	15,37	15,32
250	24,00	24,90
500	45,01	35,29

Centaurea kilaea ekstresinin 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar uygulanan değerlerinin HeLa ve Vero hücreleri üzerinde etkileri incelendiğinde Vero hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etkisi olduğu ortaya çıkmaktadır.

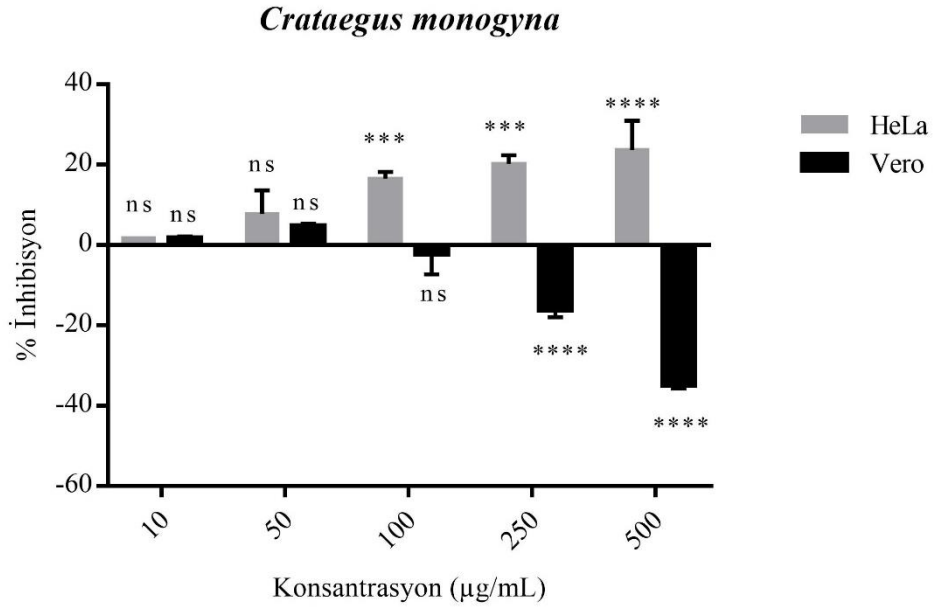


Şekil 4.3: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea hermannii* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.3: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea hermannii* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	5,44	25,09
50	16,21	64,51
100	24,84	77,05
250	45,90	82,68
500	55,75	94,19

Centaurea hermannii ekstresinin 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar uygulanan değerleri incelendiğinde, Vero hücrelerine kıyasla HeLa hücreleri üzerinde çok daha yüksek sitotoksik etkisi olduğu ortaya çıkmaktadır.

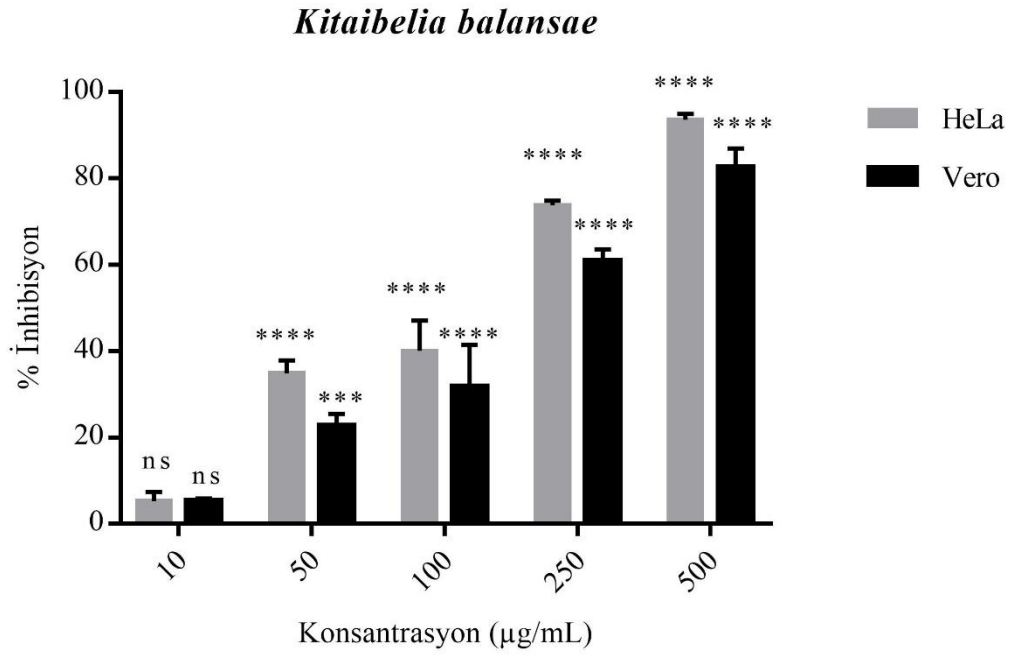


Şekil 4.4: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus monogyna* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.4: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus monogyna* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	1,71	1,72
50	4,75	7,75
100	-2,05	16,57
250	-16,06	20,19
500	-34,79	23,59

Crataegus monogyna ekstresinin, Vero ve HeLa hücreleri üzerine olan etkileri değerlendirildiğinde 50 µg/mL konsantrasyona kadar her iki hücre hattında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. 100 µg/mL konsantrasyondan itibaren Vero hücre hattında konsantrasyon artışına paralel olarak yüksek mitotik aktivite ortaya çıkarken HeLa hücre hattında ise konsantrasyon artışına paralel olarak sitotoksik aktivite ortaya çıkmıştır.

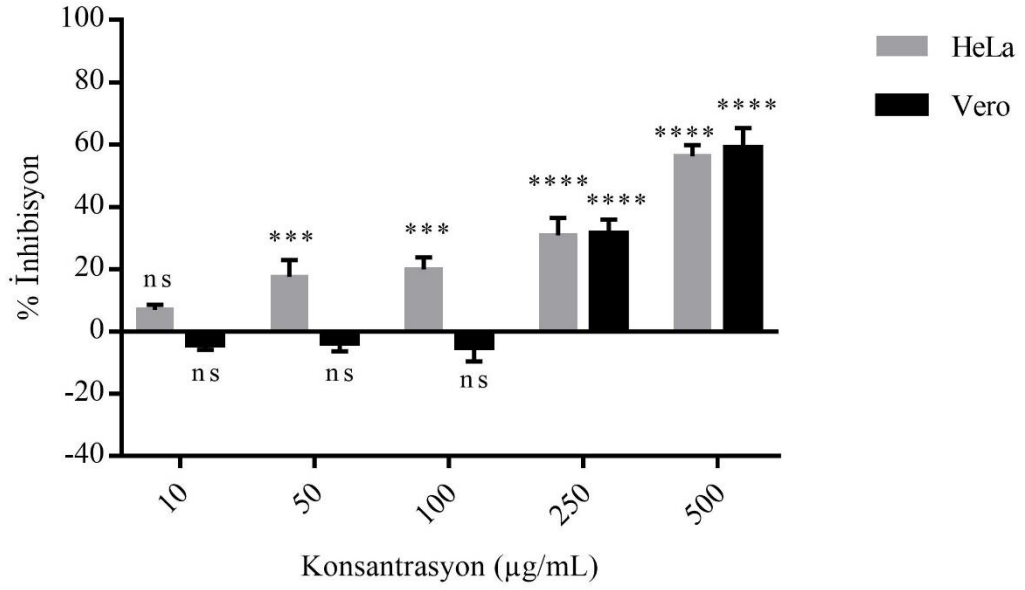


Şekil 4.5: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Kitaibelia balansae* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.5: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Kitaibelia balansae* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	5,27	5,28
50	22,72	34,83
100	31,68	40,09
250	60,89	73,80
500	82,57	93,66

Kitaibelia balansae ekstresinin, Vero ve HeLa hücreleri üzerinde 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar anlamlı bir farklılık oluşturmadığı ortaya çıkmaktadır.

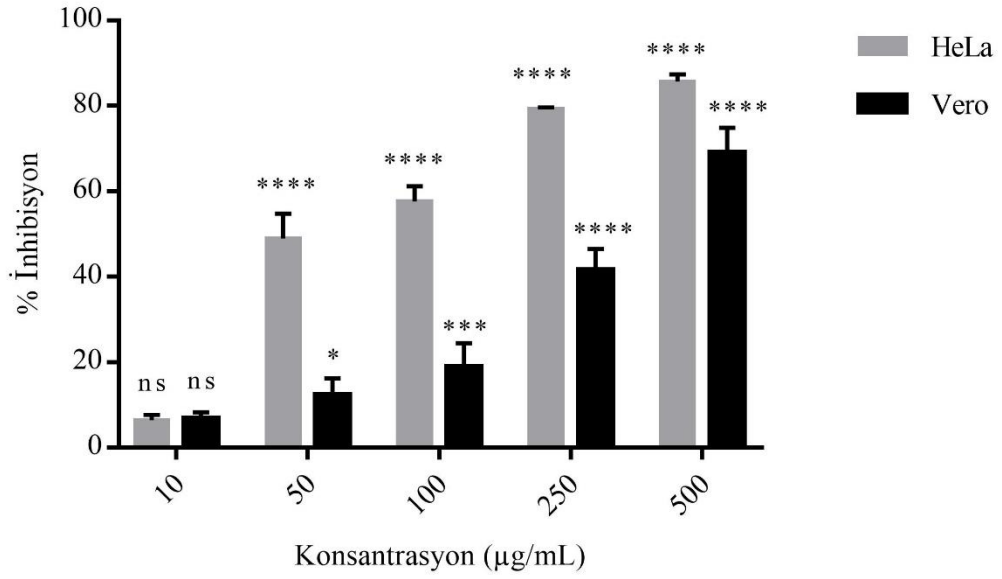
Crataegus pontica

Şekil 4.6: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus pontica* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.6: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Crataegus pontica* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	-4,09	7,01
50	-3,39	17,56
100	-4,98	19,87
250	31,22	30,82
500	58,86	56,14

Crataegus pontica ekstresinin, Vero ve HeLa hücreleri üzerinde 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görülmektedir.

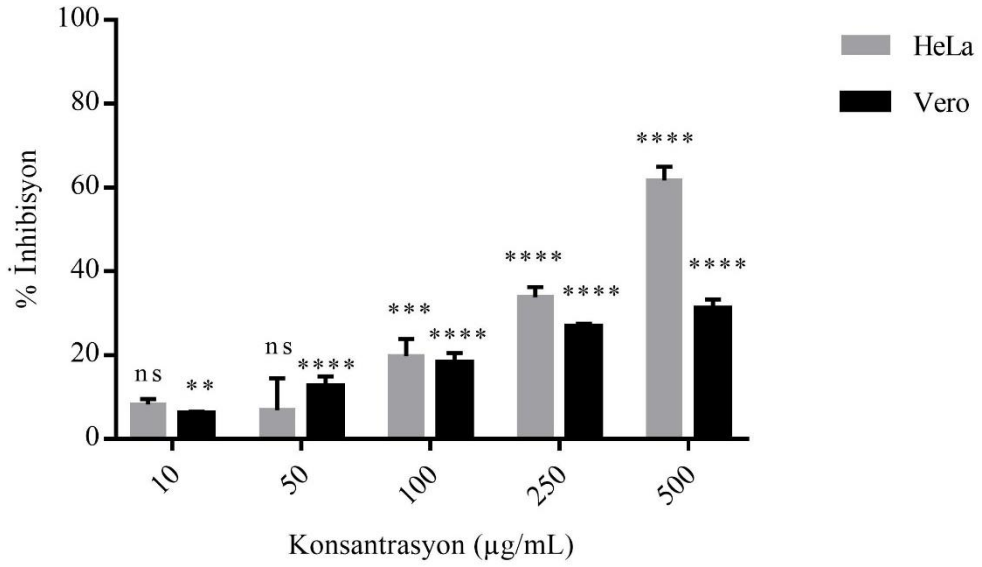
Plantago lanceolata

Şekil 4.7: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Plantago lanceolata* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.7: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Plantago lanceolata* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	6,77	6,43
50	12,19	48,99
100	18,90	57,61
250	41,48	79,26
500	68,92	85,75

Plantago lanceolata ekstresinin, Vero hücrelerine göre HeLa hücreleri üzerinde konsantrasyon artışına paralel olarak hafif düzeyde sitotoksik etki gösterdiği ortaya çıkmaktadır.

Centaurea behen

Şekil 4.8: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea behen* ekstresinin etkisi.

Tablo 4.8: Vero ve HeLa hücrelerinin canlılığı üzerine *Centaurea behen* ekstresinin konsantrasyonlara göre % inhibisyon değişimi.

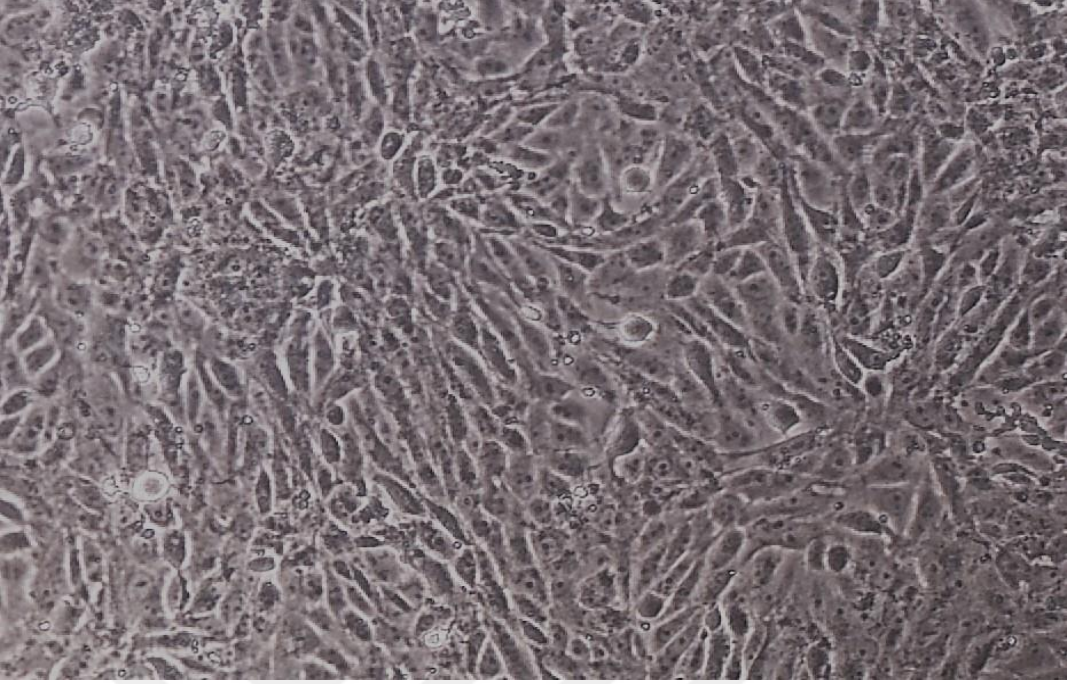
Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon Vero	% İnhibisyon HeLa
10	6,16	8,30
50	12,60	6,90
100	18,22	19,79
250	26,83	33,83
500	31,11	61,69

Centaurea behen ekstresinin, Vero hücrelerine kıyasla HeLa hücreleri üzerinde 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar orta düzeyde sitotoksik etkisi olduğu ortaya çıkmaktadır.

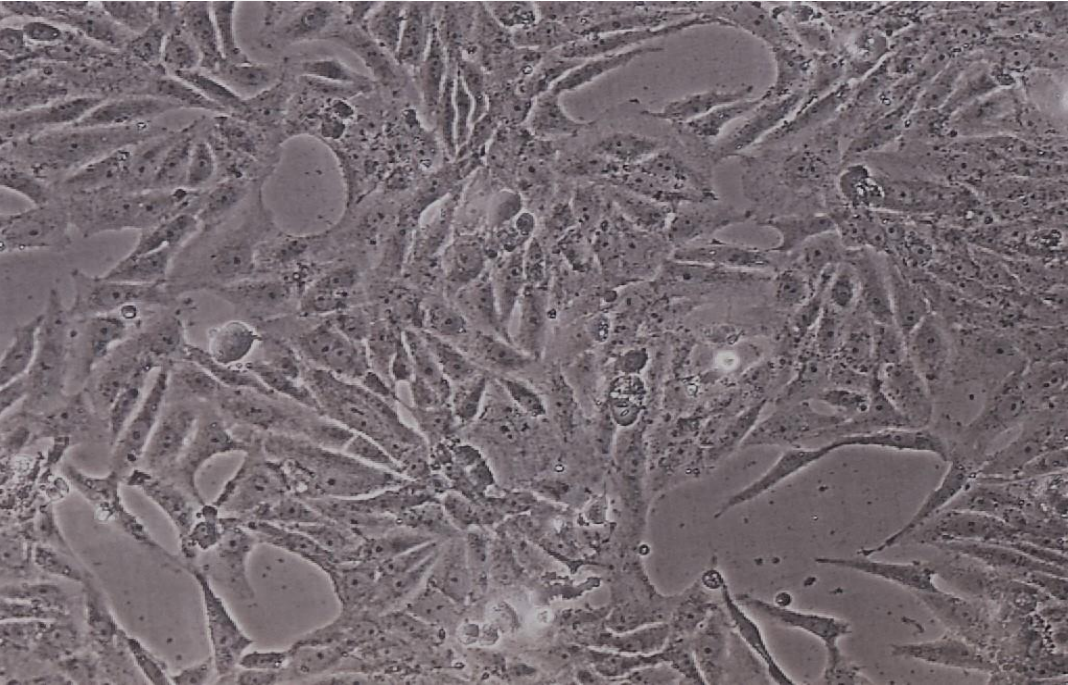
Tablo 4.9: Ekstrelerin HeLa ve Vero hücreleri üzerinde MTT yöntemi ile belirlenen IC₅₀ (µg/mL) ve SI değerleri (SI= Vero IC₅₀/ HeLa IC₅₀).

Bitki ekstrereeri	Vero IC ₅₀ (µg/mL)	HeLa IC ₅₀ (µg/mL)	SI
<i>Crataegus orientalis</i>	>500	>500	-
<i>Centaurea kilaea</i>	>500	>500	-
<i>Centaurea hermanni</i>	349,8	29,44	11,88
<i>Crataegus monogyna</i>	>500	>500	-
<i>Kitaibelia balansae</i>	165	106	1,55
<i>Crataegus pontica</i>	404	470	0,85
<i>Plantago lanceolata</i>	296,4	66,98	4,3
<i>Centaurea behen</i>	>500	371	>1,3

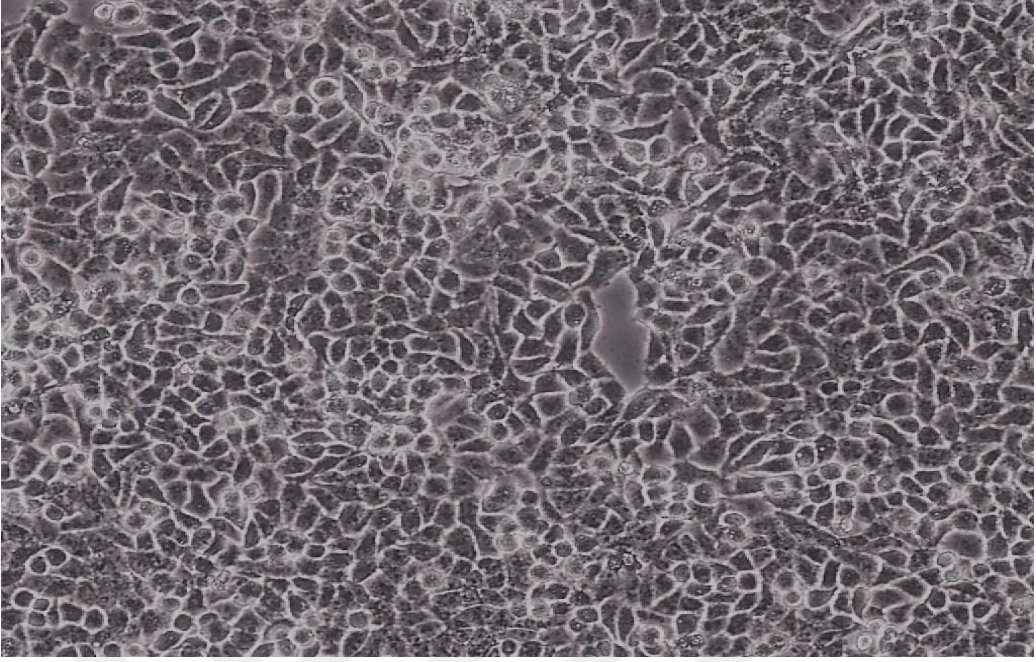
MTT yöntemi ile belirlenen, IC₅₀ değerleri kullanılarak oluşturulan SI değerleri göz önüne alındığında (SI değeri ≥ 2'den büyük olan ajanların potansiyel antikanserojen aday olabileceği gerçeğinden) en yüksek SI değerinin (11,88) *Centaurea hermannii* bitki ekstresi, daha sonra *Plantago lanceolata* bitki ekstresi (4,3) olduğu ortaya çıkmaktadır. *Crataegus orientalis* ve *C. monogyna*'ya ait SI değerleri hesaplanamamakla birlikte, özellikle *C. monogyna* bitki ekstresinin normal transforme hücre hattı olan Vero hücrelerinde mitotik aktivite gösterirken, kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermesi bitkinin potansiyel antikanserojen moleküller taşıyabileceği fikrini ortaya koymaktadır.



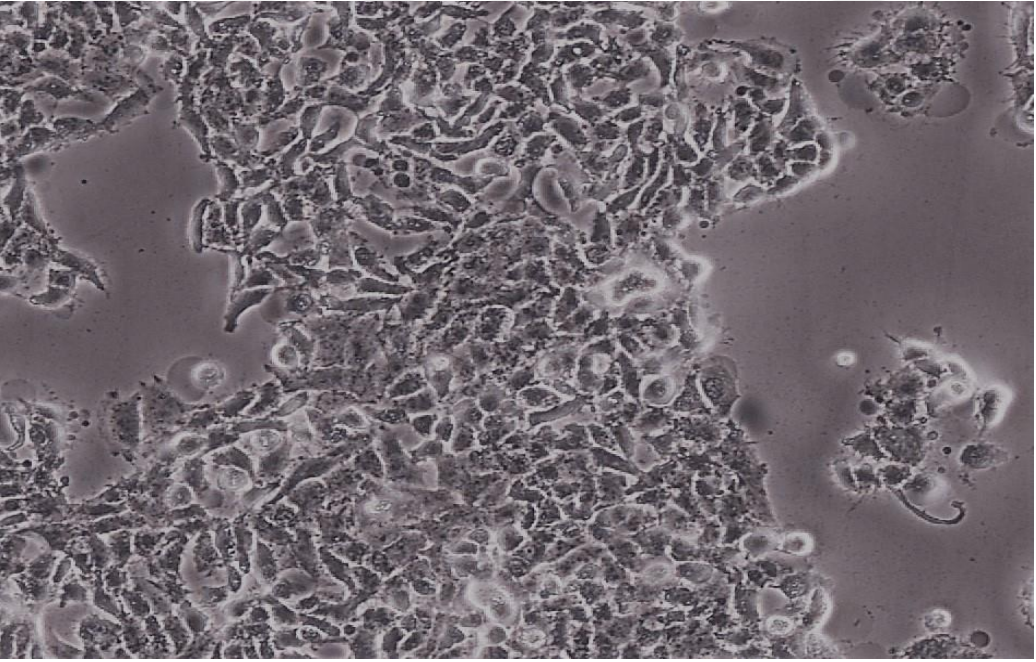
Şekil 4.9: 48. saat sonunda ekstre uygulanmamış (kontrol) Vero hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).



Şekil 4.10: 48. saat sonunda *Centaurea hermannii* ekstresinin IC₅₀ konsantrasyonunun (349.8 µg/mL) uygulandığı Vero hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).



Şekil 4.11: 48. saat sonunda ekstre uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).

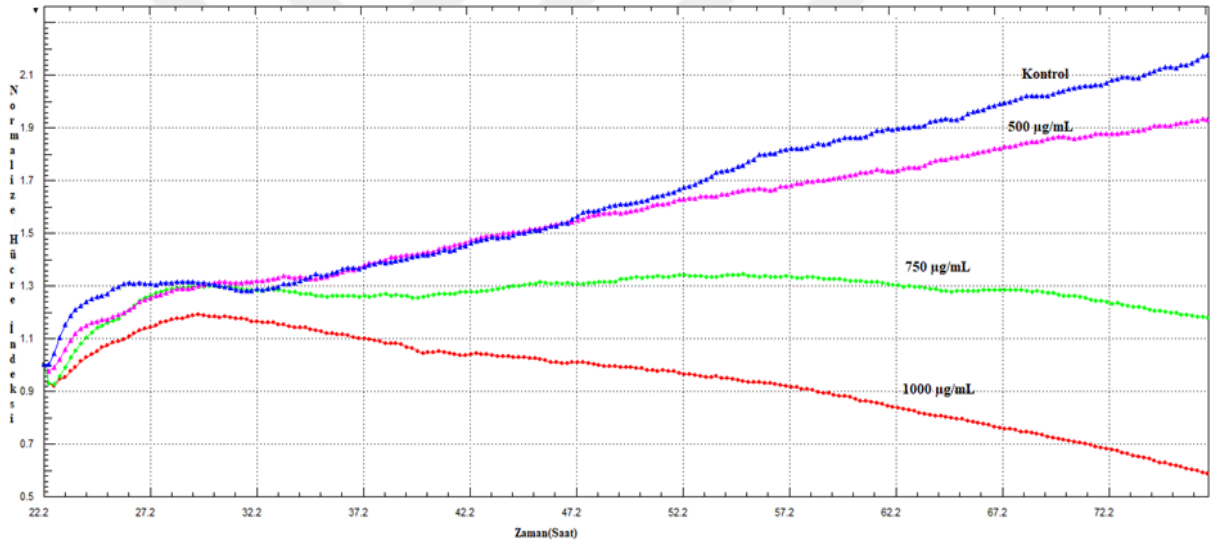


Şekil 4.12: 48. saat sonunda *Centaurea hermannii* ekstresinin IC₅₀ konsantrasyonunun (29.44 µg/mL) uygulandığı HeLa hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (100x optik büyütme).

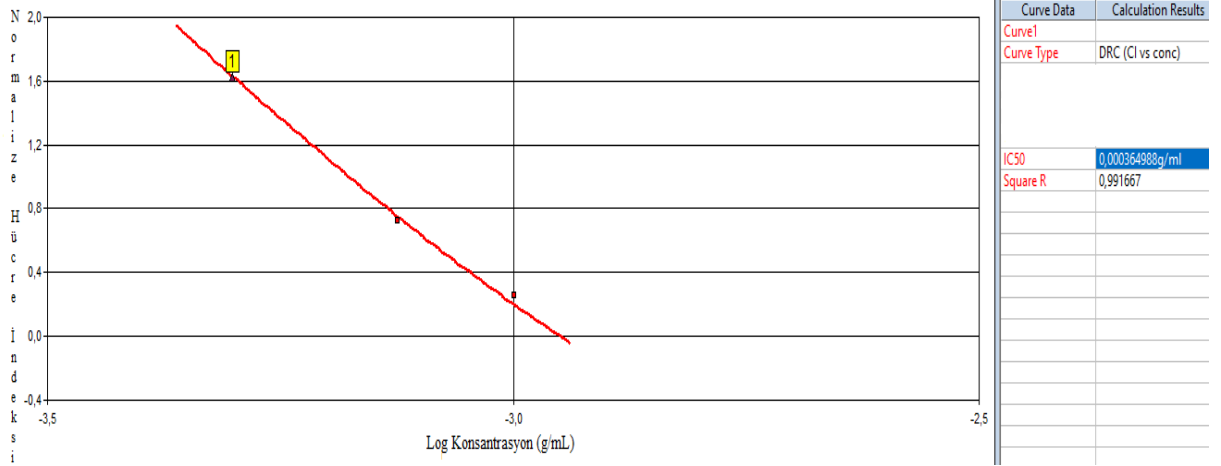
C. hermannii ekstresinin IC₅₀ konsantrasyonunun Vero ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri sonucu ortaya çıkan mikroskop görüntüleri (Şekil 4.9-12) incelendiğinde MTT sonuçları ile uyumlu olduğu ortaya çıkmaktadır.

4.2. XCELLIGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) DP SİSTEMİ İLE HÜCRE İNDEKSİ DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

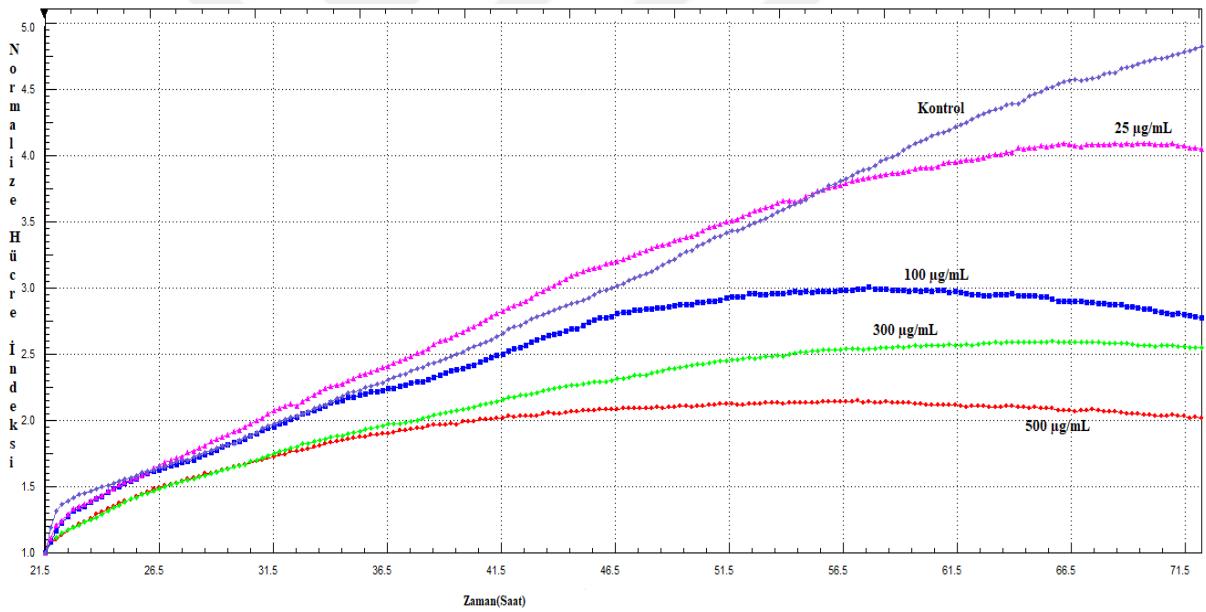
MTT analizi sonucunda elde edilen verilere göre ortaya çıkan (Tablo 4.9) sonuçlara göre en yüksek aktiviteye sahip *C. hermannii* ekstresinin HeLa ve Vero hücreleri üzerindeki etkileri xCELLigence hücre analiz sistemi ile de ortaya konmuştur. Bu analizden elde edilen verilere ait sonuçlar ve bu verilere ait IC₅₀ değerleri Şekil 4.13-16'da, IC₅₀'den elde edilen SI değerlerine ait veriler ise Tablo 4.10'da verilmiştir.



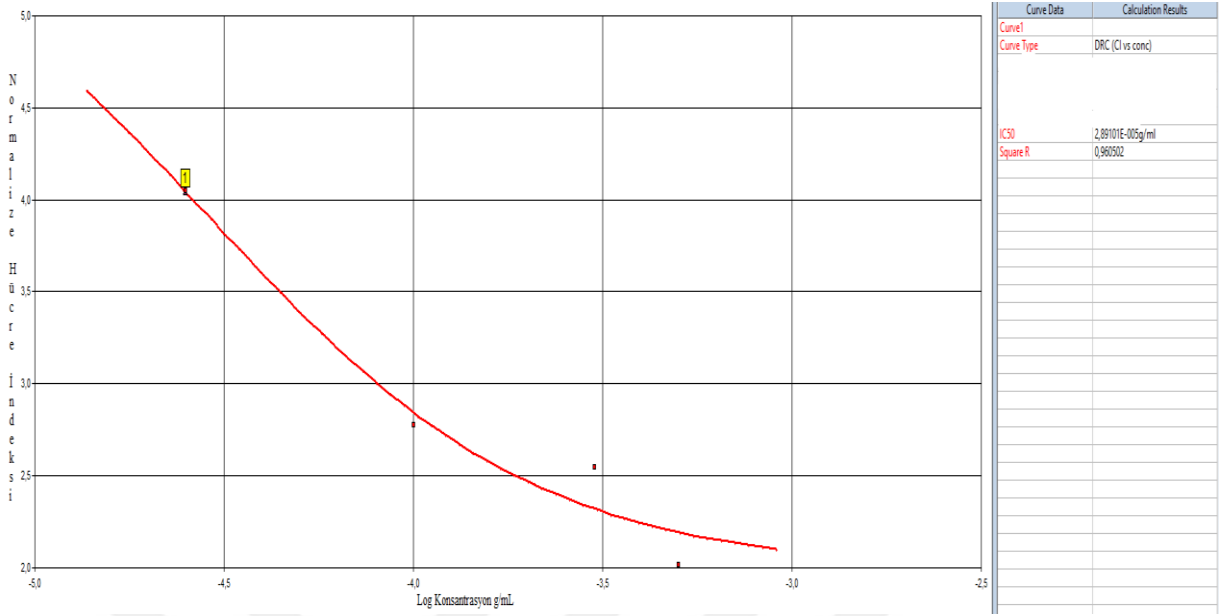
Şekil 4.13: *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan Vero hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi ölçüm grafiği.



Şekil 4.14: *Centaurea hermännii* bitki ekstresinin konsantrasyona bağı oluşan Vero hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi verileri (R^2 : 0,9916).



Şekil 4.15: *Centaurea hermännii* bitki ekstresinin konsantrasyona bağı oluşan HeLa hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi ölçüm grafiğı.



Şekil 4.16: *Centaurea hermännii* bitki ekstresinin konsantrasyona bağlı oluşan HeLa hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre indeksi verileri (R^2 : 0,9605).

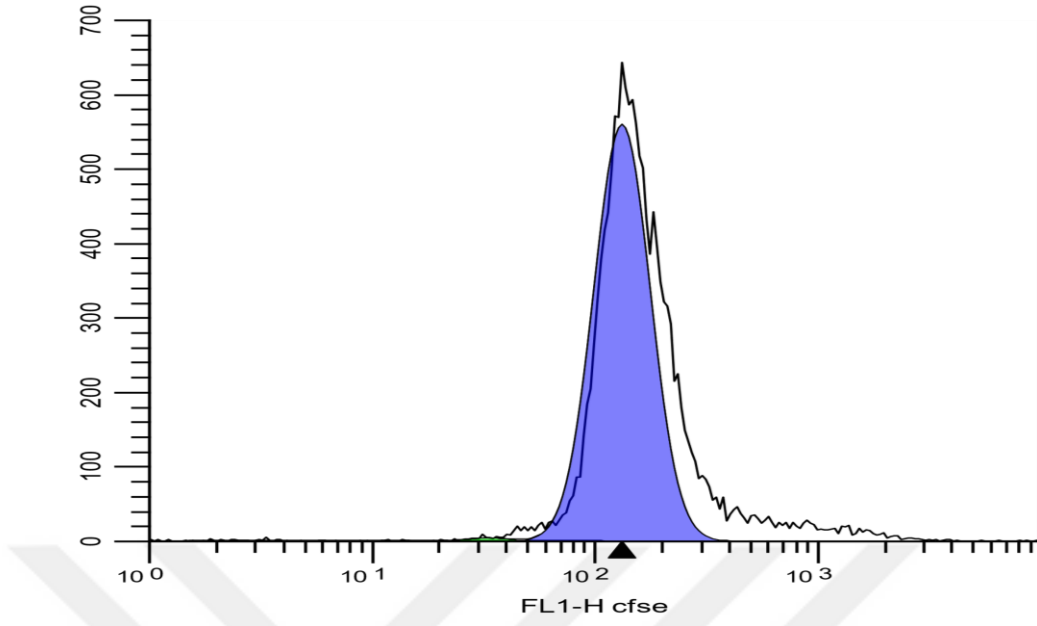
Tablo 4.10: *Centaurea hermännii* bitki ekstresinin, HeLa ve Vero hücreleri üzerinde xCELLigence RTCA yöntemi ile belirlenen IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ve buna bağlı hesaplanan SI değerleri. ($SI = \text{Vero } IC_{50} / \text{HeLa } IC_{50}$).

Bitki ekstresi	Vero IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	HeLa IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SI
<i>Centaurea hermännii</i>	364,98	28,91	12,62

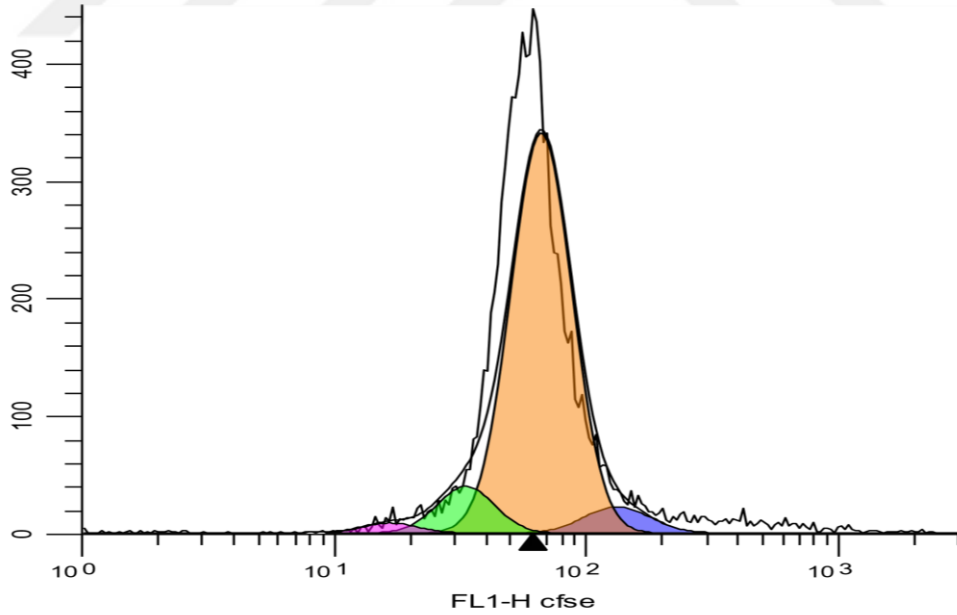
xCELLigence RTCA yöntemi ile belirlenen *C. hermännii* ekstresine ait SI değeri (12,62) daha önce MTT analizi ile belirlediğimiz SI değeri ile (11,88) uyumlu olduğu görülmektedir.

4.3. HÜCRE GENERASYONUNUN CFSE YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

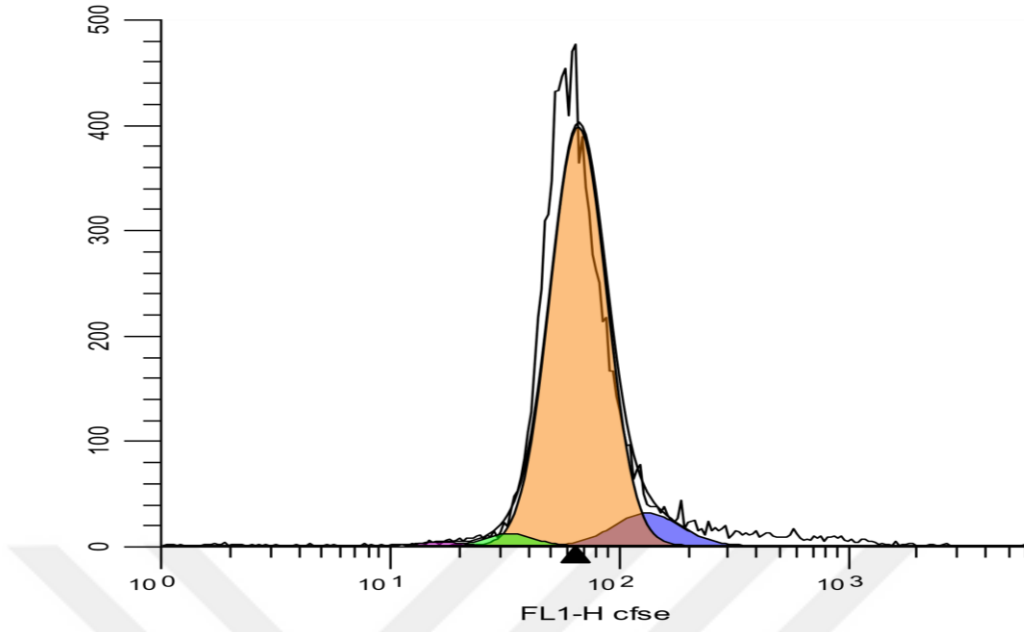
MTT ve xCELLigence yöntemleri ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, en yüksek aktiviteye sahip *Centaurea hermännii* ekstresinin HeLa hücrelerinin ikilenme süresi üzerindeki etkileri CFSE boyama yöntemi kullanılarak ortaya konulmuştur (86). 0. 24. ve 48. saat sonunda Akan Hücre Ölçer'den elde edilen verilerin Modfit programları ile analiz sonuçları Şekil 4.17-25'te verilmiştir. *Centaurea hermännii* ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) gruplardaki her bir hücrenin kaçınıcı generasyonda olduğunun ortalamasını veren Bölünme İndeksi'ne (BI: Proliferation index) göre hazırlanan sonuçlar Tablo 4.11'de verilmektedir.



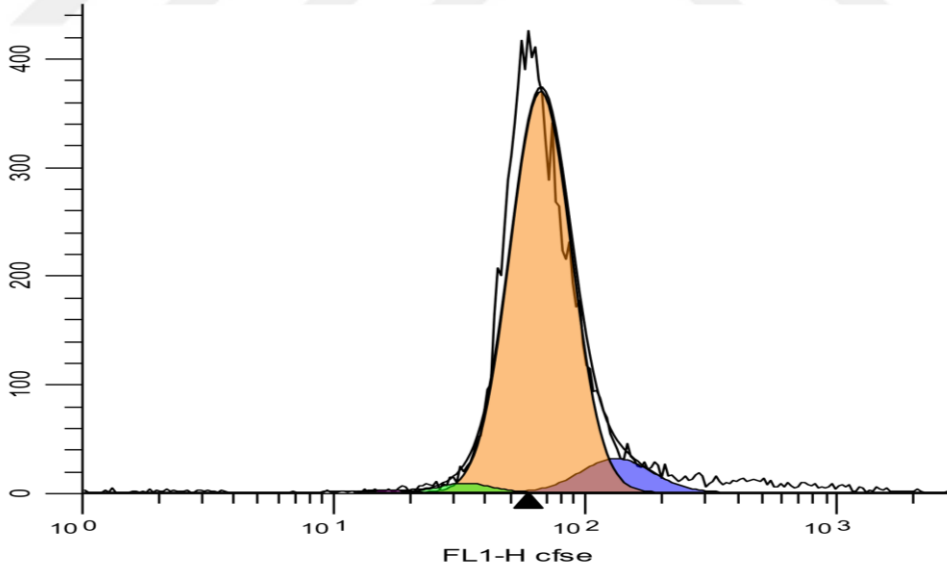
Şekil 4.17: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 0. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %99,44; Turuncu: 2. nesil, %0; Yeşil: 3. nesil %0; Pembe: 4. nesil %0).



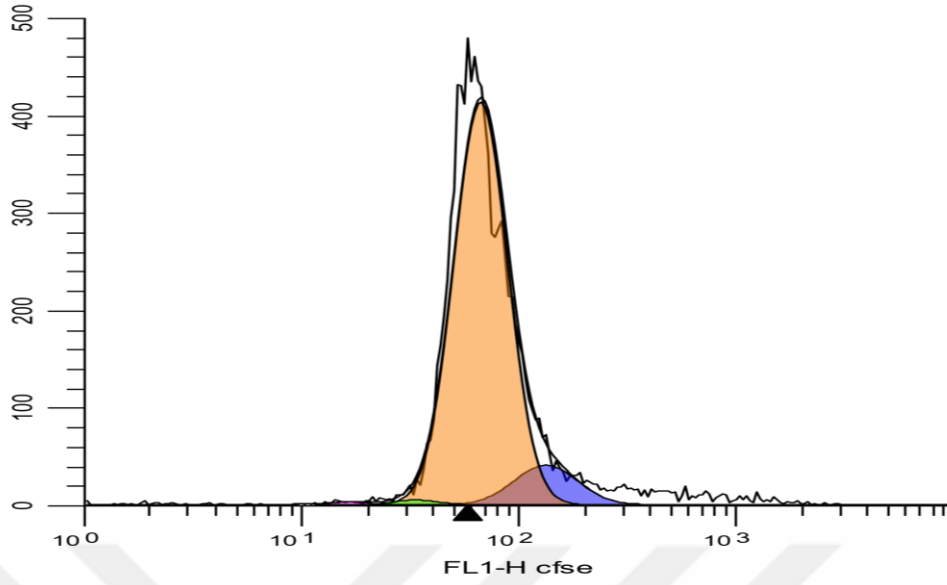
Şekil 4.18: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %5,83; Turuncu: 2. nesil, %83,30; Yeşil: 3. nesil %9,06; Pembe: 4. nesil %1,81).



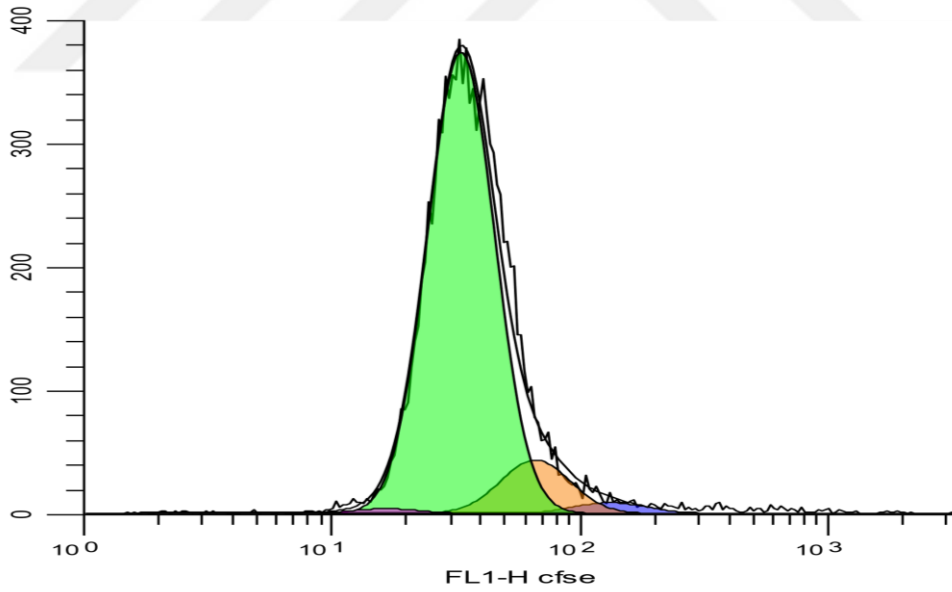
Şekil 4.19: 5 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermanningii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %8,12; Turuncu: 2. nesil, %89,98; Yeşil: 3. nesil, %2,23; Pembe: 4. nesil, %0,48).



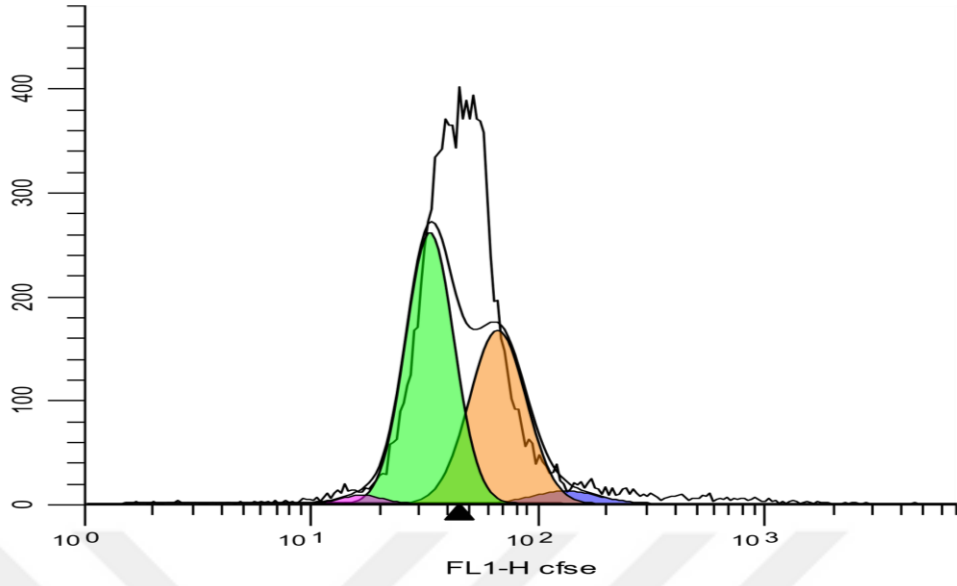
Şekil 4.20: 25 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermanningii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %8,72; Turuncu: 2. nesil, %89,28; Yeşil: 3. nesil %1,71; Pembe: 4. nesil %0,29).



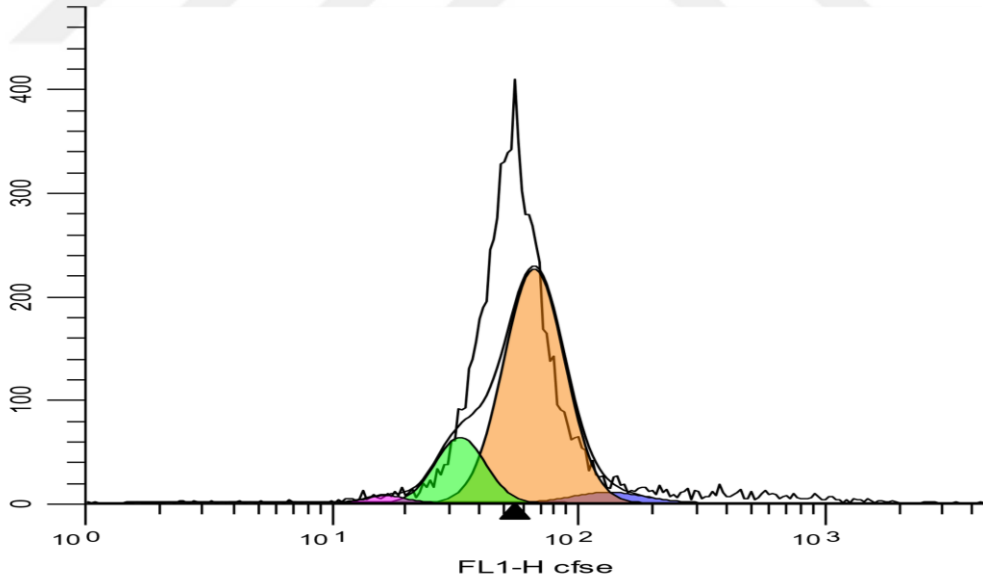
Şekil 4.21: 100 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermanningii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 24. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %10,15; Turuncu: 2. nesil, %88,62; Yeşil: 3. nesil %0,83; Pembe: 4. nesil %0,21).



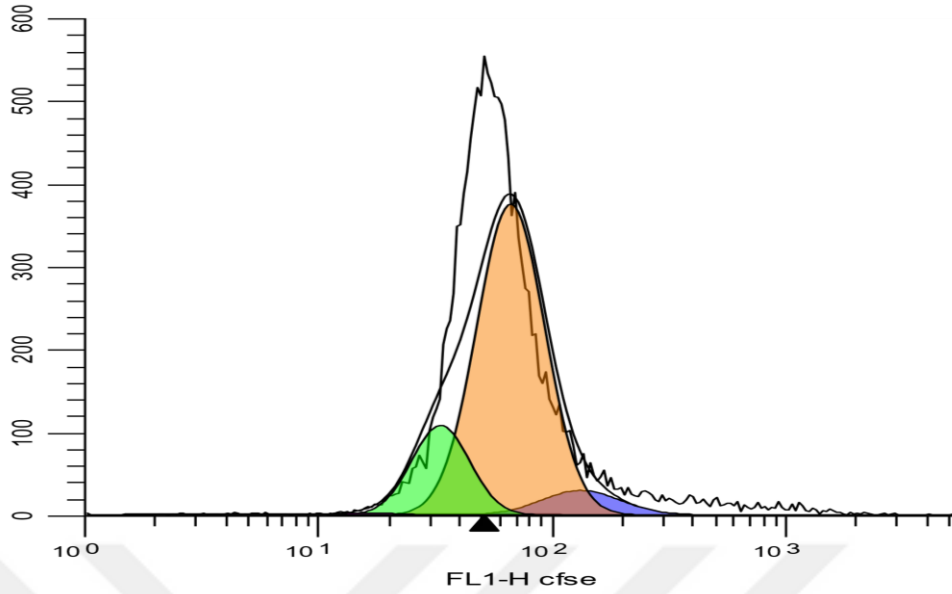
Şekil 4.22: Ekstre uygulanmayan (kontrol) ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %2,19; Turuncu: 2. nesil, %10,34; Yeşil: 3. nesil %86,62; Pembe: 4. nesil %0,85).



Şekil 4.23: 5 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermannii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %3,38; Turuncu: 2. nesil, %40,73; Yeşil: 3. nesil %54,49; Pembe: 4. nesil %0,79).



Şekil 4.24: 25 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermannii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %4,09; Turuncu: 2. nesil, %76,75; Yeşil: 3. nesil %17,67; Pembe: 4. nesil %0,49).



Şekil 4.25: 100 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermannii* uygulanan ve CFSE ile boyanan HeLa hücrelerinin 48. saat Akan Hücre Ölçer verilerinin Modfit programı analiz sonuçları (Mavi: 1. nesil, %6,73; Turuncu: 2. nesil, %74,65; Yeşil: 3. nesil %18,28; Mor: 4. nesil %0,34).

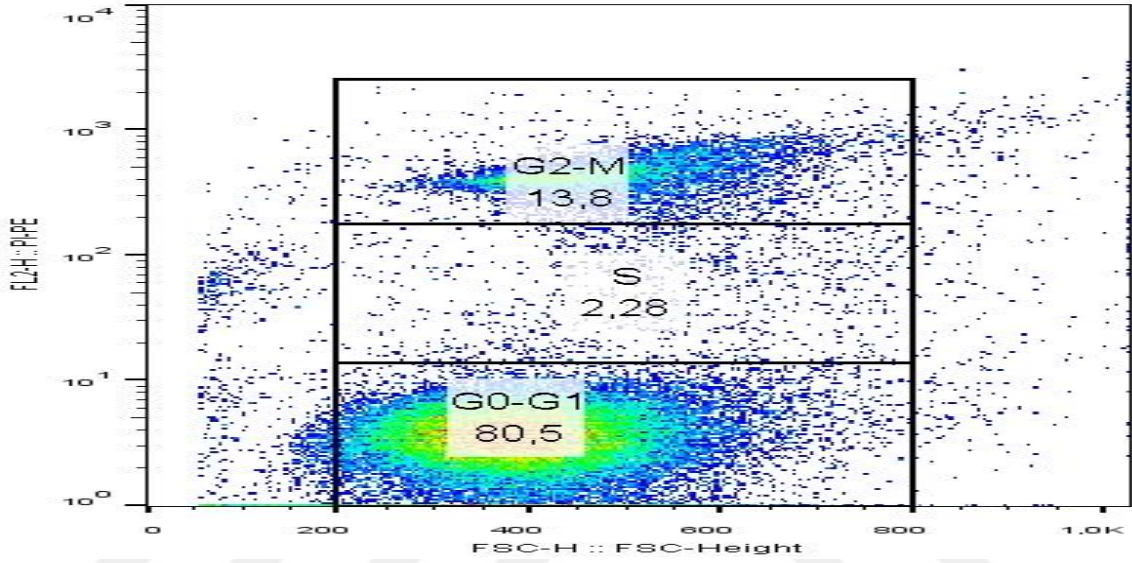
Tablo 4.11: *Centaurea hermannii* bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin CFSE boyama ile elde edilen BI (bölünme indeksi) değerleri.

Zaman(Saat)	<i>Centaurea hermannii</i> Konsantrasyonu (µg/mL)	BI
0	Kontrol	-
24	Kontrol	2,00
24	5	1,87
24	25	1,83
24	100	1,55
48	Kontrol	3,43
48	5	2,66
48	25	2,12
48	100	2,05

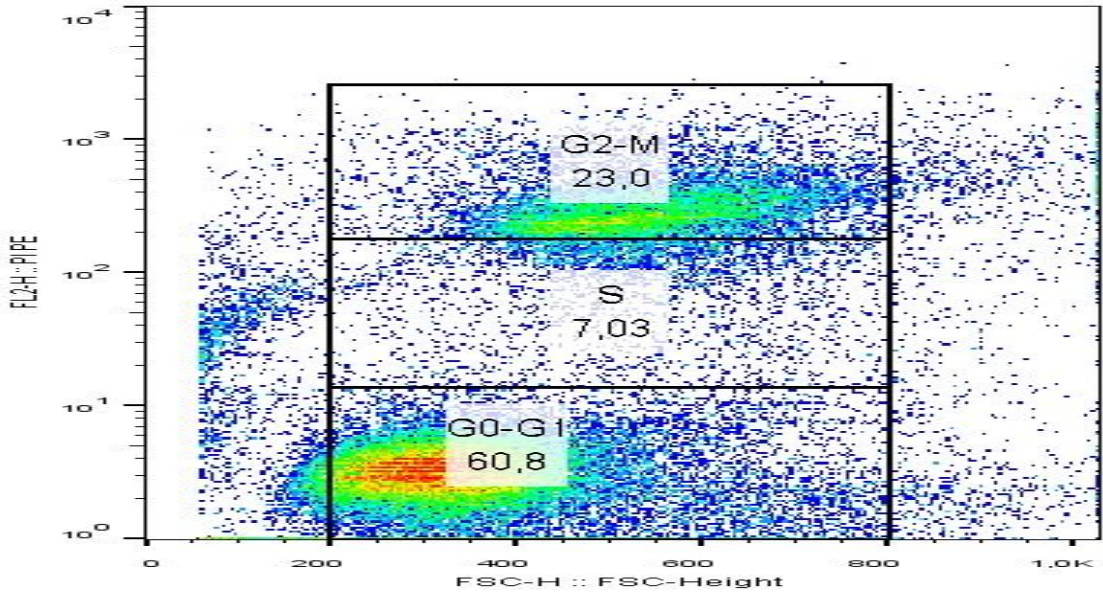
Centaurea hermannii bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin CFSE boyama ile elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde bölünme indeksinin 48. saatte 2'den (kontrol grubu) konsantrasyon artışına paralel olarak 1,55'e düştüğü, 48. saatte ise 3,43'den konsantrasyon artışına paralel olarak 2,05'e düştüğü görülmektedir.

4.4. PROPİDİUM İYODÜR (PI) BOYAMA İLE HÜCRE SİKLUSU ANALİZİ

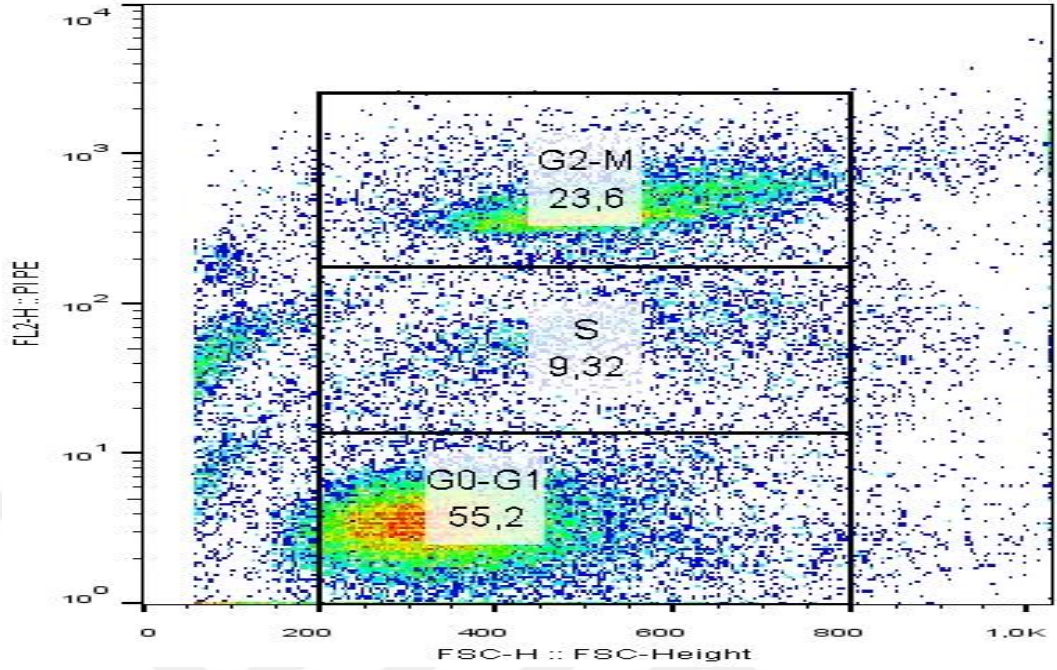
Centaurea hermanningii ekstresinin HeLa hücrelerinin hücre siklusunun hangi basamağına etki ettiğini belirlemek amacıyla yapılan PI boyama sonucunda elde edilen verilerin, FlowJo programı ile yapılan analiz sonuçları Şekil 4.26-29'da, bu sonuçlara göre hazırlanan karşılaştırma tablosu Tablo 4.12'de verilmektedir.



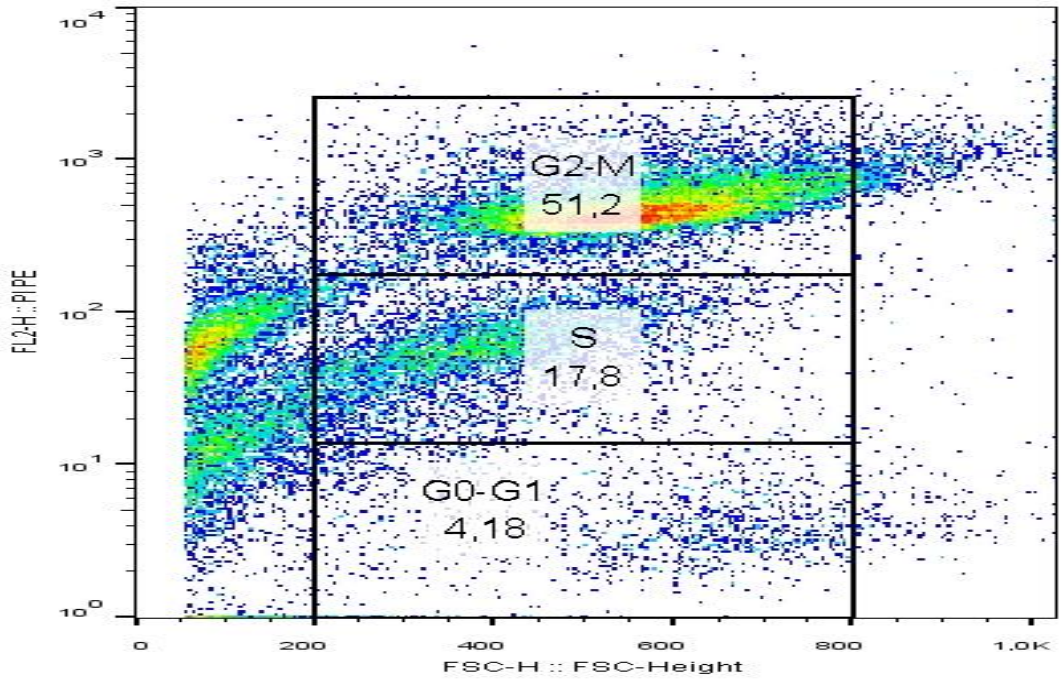
Şekil 4.26: Ekstre uygulanmayan (kontrol) HeLa hücrelerine ait 48. saat hücre siklusu verileri.



Şekil 4.27: 5 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermanningii* uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.



Şekil 4.28: 25 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermannii* uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.



Şekil 4.29: 100 µg/mL konsantrasyonda *Centaurea hermannii* uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.

Tablo 4.12: *Centaurea hermannii* bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin 48. saat hücre siklusu verileri.

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
Kontrol	%80,5	%2,28	%13,8
5	%60,8	%7,03	%23,0
25	%55,2	%9,32	%23,6
100	%4,18	%17,8	%51,2

Centaurea hermannii bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin 48. saat PI boyama ile elde edilen Akan Hücre Ölçer verilerinin FlowJo programı ile hücre siklusu analiz değerleri incelendiğinde, kontrol grubunun yapılan analizleri sonucu popülasyonun %80,5'inin G₀-G₁ fazında %2,22'lik kısmının S fazında ve %13,8'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Spontan olarak meydana gelen parçalanmaların ise %4 civarında olduğu hesaplanmıştır. IC₅₀ konsantrasyonunda (25 $\mu\text{g/mL}$), popülasyonun %55,2'si G₀-G₁ fazında %9,32'lik kısmının S fazında ve %23,6'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %11,89'dir. 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ise, popülasyonun %4,18'i G₀-G₁ fazında, %17,8'i S fazında, %51,2'si ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %16,82'dir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, kanser en çok ölüme neden olan hastalıklar arasında 2. sırada yer almaktadır. Her yıl, 14 milyon yeni vaka ve 8,2 milyon kanserle ilişkili ölüm meydana gelmektedir. Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) 2013 yılı verilerine göre, kanserin Amerika'ya yıllık tedavi maliyeti 124 milyar doların üzerindedir. 2020 yılında ise bu rakamın 157 milyar dolar seviyesine çıkacağı tahmin edilmektedir [7]. Yine aynı şekilde NIH'in verilerine göre, bir kişiye yaşam süresince %38,4 olasılıkla kanser teşhisi konacaktır [8].

Kansere karşı olan mücadelede günümüzde kullanılan mevcut yaklaşımların yetersizliği ve bu tedaviler yüzünden oluşan yan etkiler yeni tedavi yaklaşımları ve farklı moleküllerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır [87; 88; 89]. Günümüzde kullanılan kemoterapi ajanlarının büyük kısmı doğal ürünlerin yarı sentetik formlarından oluşmaktadır [90]. Bu doğal ürünler içinde, bitkisel metabolitler çok önemli bir orana sahiptir [91]. Kansere karşı olan savaşta yeni moleküllerin keşfi ve yeni yaklaşımların geliştirilebilmesi için bu bitkisel metabolitler doğal bir havuz oluşturmaktadır [92].

Sitotoksik yeni bitkisel moleküllerin keşfedilebilmesinin en genel basamağı ise bitkilerden elde edilen ekstrelerin hücre hatları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve sitotoksik etki gösteren ekstrelerin içeriklerinin aydınlatılmasıdır [93].

Kanser hücreleri üzerinde toksik etki gösteren ekstrelerin, transforme normal hücre hatlarına olan etkilerinin aydınlatılması ve bitkisel ekstrelerin kanser ve transforme normal hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin farklılıklarının gösterilmesi de diğer bir önemli noktadır. Günümüzde klinikte kullanılan kemoterapi ajanlarının normal hücreler üzerinde de ciddi toksik etkileri olduğu düşünüldüğünde, transforme normal hücrelere sitotoksik etkisi düşük, kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi yüksek ekstrelerin keşfi yeni yaklaşımlar geliştirmek için hayati bir öneme sahiptir [94].

Çalışmamızda, 3 tanesi Türkiye'ye endemik olan toplam 8 bitki metanol ekstresinin normal transforme hücre hattı (Vero) ve serviks kanser hücre hattı (HeLa) üzerindeki sitotoksik etkilerini mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi (MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-II)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA) DP Sistemi ile hücre indeksi değerlerinin belirlenmesi, hücre çoğalmasını takip eden Karboksi Floresein

Suksinimidil Ester (CFSE) boyama yöntemi ve DNA miktarını ölçen propidium iyodür (PI) boyama yöntemi ile ortaya koyarak bitkilerin antikanser aktivite potansiyellerini değerlendirmeyi hedefledik.

MTT analiz sonuçları incelendiğinde çalışılan 8 bitkiden *Crataegus orientalis* ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonuna kadar uygulanan değerlerinin HeLa ve Vero hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi saptanmazken, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonları Vero hücrelerinde proliferatif etki gösterirken, HeLa hücrelerinde hafif sitotoksik etki gösterdiği (Tablo 4.1), *Crataegus monogyna* ekstresinin ise 100 µg/mL konsantrasyondan itibaren Vero hücre hattında konsantrasyon artışına paralel olarak mitotik aktivite ortaya çıkarken HeLa hücre hattında ise konsantrasyon artışına paralel olarak dikkat çekici sitotoksik aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır (Tablo 4.4).

Centaurea hermannii ekstresinin 500 µg/mL konsantrasyonuna kadar uygulanan değerleri incelendiğinde, Vero hücrelerine kıyasla HeLa hücreleri üzerinde çok daha yüksek sitotoksik etkisi olduğu ve çalışılan bitkiler içerisinde en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip bitki ekstresi olduğu (Tablo 4.3), *Plantago lanceolata* ekstresinin de Vero hücrelerine göre HeLa hücreleri üzerinde konsantrasyon artışına paralel olarak orta düzeyde sitotoksik etki gösterdiği ortaya çıkmaktadır (Tablo 4.7). MTT analiz sonucuna göre HeLa hücrelerine karşı en dikkat çekici sitotoksik etkinliği ortaya koymuş olan *C. hermannii* bitki ekstresinin sitotoksik etkinliği bir diğer yöntem olan xCELLigence RTCA yöntemi ile de ortaya konulmuştur (Şekil 4.13-16). Ortaya çıkan sonuçlar MTT sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. *C. hermannii* bitki ekstresinin MTT yöntemi ile belirlenen IC₅₀ değeri Vero için 399,8 µg/mL iken HeLa için 29,44 µg/mL, xCELLigence yöntemi ile belirlenen IC₅₀ değeri Vero için 364,98 µg/mL iken HeLa için 28,91 µg/mL olarak ortaya çıkmıştır.

Günümüzde, kullanım onayı almış ajanların etkinliğini ortaya koyan en önemli parametrelerden bir tanesi yüksek SI değeri olarak kabul edilmektedir (SI değeri ≥ 2 'den büyük olan ajanların etkin ve potansiyel antikanserojen aday olabileceği kabul edilmektedir). MTT yöntemi ile belirlenen, IC₅₀ değerleri kullanılarak oluşturulan SI değerleri göz önüne alındığında (Tablo 4.9) en yüksek SI değerinin (11,88) *C. hermannii* bitki ekstresi, daha sonra *P. lanceolata* bitki ekstresi (4,3) olduğu ortaya çıkmaktadır. *C. orientalis* ve *C. monogyna*'ya ait SI değerleri hesaplanamamakla birlikte, özellikle *C. monogyna* bitki ekstresinin normal transforme hücre hattı olan Vero hücrelerinde mitotik aktivite gösterirken, kanser hücre hattı olan HeLa

hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermesi bitkinin potansiyel antikanserojen moleküller taşıyabileceği fikrini desteklemektedir. Bu bitkilerle ile yapılan çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar ve/veya fraksiyonlama çalışmaları sonrasında çok daha etkin sonuçların çıkabileceği beklenebilir.

xCELLigence RTCA yöntemi ile belirlenen *C. hermannii* ekstresine ait SI değeri (12,62) (Tablo 4.10) daha önce MTT analizi ile belirlediğimiz SI değeri ile (11,88) uyumlu olduğu görülmektedir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde *Centaurea* genusuna ait çok sayıda bitkinin sitotoksik aktiviteleri ile ilgili çalışmalara rastlanmaktadır. *C. bruguierana* türüne ait metanol ekstresi ile yapılan bir çalışmada, kolon kanseri ve meme kanseri hücre hatları kullanılmış ve çeşitli fraksiyonların yüksek SI değerleri gösterdiği bulunmuştur [95]. *C. albonitens* türü ile yapılan çalışmada ise, bu bitkinin metanol ekstresinin, hematolojik kanserler üzerindeki sitotoksik etkileri sağlıklı periferik kan hücreleri ile kıyaslanarak gösterilmiştir [96]. *C. cyanus* türü ile yapılan çalışmada ise, bu türe ait ekstrenin fenolik içeriği aydınlatılmış ve çeşitli kanser hücreleri üzerindeki düşük sitotoksik etkileri gösterilmiştir [97]. *C. hermannii* ekstresine ait literatürde biyolojik aktiviteye ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda ortaya çıkan HeLa hücreleri için yüksek SI değeri önemli ve özgün bir bulgu olarak değerlendirilmektedir.

Daha önceden yapılan çalışmalar açıkça göstermektedir ki, klinikte yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanlarından olan Aktinomisin D'nin SI değeri 13,5 olarak hesaplanmıştır [98]. Bir diğer kemoterapi ajanı olan Cisplatin'in SI değeri ise 2,8 civarında hesaplanmıştır [99].

SI değerinin yanı sıra, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre, Kanser hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda sadece IC₅₀ değeri 30 µg/mL konsantrasyondan düşük olan bitkisel ekstrelerin ilaç geliştirme çalışmaları için daha uygun olduğu bildirilmektedir.

Yüksek SI değerine (~12) ve düşük IC₅₀ değerine (~29) sahip olan *C. hermannii* ekstresinin geleneksel kemoterapotik ilaçların toksik yan etkileri ve sınırlı etkinlikleri göz önüne alındığında yeni ve etkin doğal ajanlar için önemli bir kaynak olacağı beklenebilir.

Birçok yayında, MTT testinin sınırlayıcı etkileri ele alınmış olup bu etkilerin elimine edilebilmesi için farklı metotlarla birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir [100; 101]. Bu

amaçla *C. hermannii* ekstresinin, MTT analiz sonucu oluşan sitotoksik etkilerini doğrulayabilmek için hücrelere ait mikroskop görüntüleri (Şekil 4.18-19) incelendiğinde IC₅₀ konsantrasyonunda ekstrenin 48. saat sonundaki HeLa ve Vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

MTT testi ve mikroskopik incelemeyi doğrulamak amacıyla 3. bir yöntem olan ve son yıllarda popüleritesi artan, hücreleri gerçek zamanlı olarak analiz etmeye yarayan xCelligence RTCA yönteminden faydalanıldı. Bu yöntemin ekstrenin içindeki bileşiklerden MTT yöntemi gibi etkilenmemesi, arka plan ölçümünü kuyuların kendi içinde ve gerçek zamanlı kinetik ölçüm yapması yöntemin avantajları olarak gözükmektedir [102; 103; 104]. Kuvvetli bir antioksidan olan Vitamin E ve Vitamin A üzerine yapılan çalışmalarda, Vitamin E'nin MTT'yi formazana indirgediği ve hatalı pozitif sonuçlar verebileceği ileri sürülmektedir [105; 106]. Bunu destekler şekilde çeşitli antioksidan moleküllerin MTT'yi indirgediği başka çalışmalar da yer almaktadır [107].

Kuvvetli antioksidan içeriğe sahip bitki ekstrelerinin MTT testi sonuçlarında yüksek canlılık oranı verdirme olasılığı düşünüldüğünde, *Crataegus orientalis* ve *C. monogyna* ekstrelerinin sahip olduğu mitotik aktiviteyi aydınlatılabilmek için sonraki çalışmalarda bu ekstrelerin antioksidan aktivitelerine bakılması veya farklı bir sitotoksik analiz yöntemi ile değerlendirilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Çıkan sonuçlara göre, muhtemel yüksek antioksidan aktivite gösteren ekstreler için MTT'den daha uygun bir canlılık testi yapılması veya 2. bir testle doğrulanmasının gerekliliğini göstermektedir. Bu sebeple, xCELLigence RTCA yöntemi kullanılarak *C. hermannii* bitki ekstresi ile yapılan ve sitotoksik etkinliğini ortaya koyan çalışmaların MTT analiz sonuçları ile de uyumlu olması *C. hermannii* bitki ekstresinin MTT testiyle ölçülebilen sitotoksik aktivitesinin antioksidan aktiviteden kaynaklanmadığını düşündürmektedir.

Sitotoksik etkiyi belirledikten sonra *C. hermannii* bitki ekstresinin hücrelerin ikilenme sürelerini nasıl etkilediğini ortaya koymak amacıyla CFSE yöntemi tercih edilmiştir [108; 109; 110]. 0. 24. ve 48. saatte yapılan ölçümler ve yapılan karşılaştırmalara göre elde edilen sonuçlar (Şekil 4.17-25), bu verilerden elde edilen bölünme indeksi (BI) verileri (Tablo 4.11) incelendiğinde *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) HeLa hücrelerinin CFSE boyama ile elde edilen sonuçları bölünme indeksinin 48. saatte 2'den (kontrol grubu) konsantrasyon artışına paralel olarak 1,55'e düştüğü, 48. saatte ise 3,43'den

konsantrasyon artışına paralel olarak 2,05'e düştüğü görülmektedir. Bu veriler ışığında, 48. saatte kontrol grubunun ikilenme zamanı 20,99 saat iken *C. hermannii* bitki ekstresinin 25 µg/mL konsantrasyonunun da ise 33,96 saat olarak hesaplanmıştır. *C. hermannii* bitki ekstresinin, HeLa hücrelerinin ikilenme zamanını anlamlı olarak arttırması MTT ve xCELLigence yöntemleri ile ortaya konan sitotoksik etkisini doğrulayan bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

C. hermannii bitki ekstresinin hücrelerin ikilenme süresini arttırıcı yönlerdeki etkileri sebebiyle hücre siklusuna olan etkileri ve siklusu hangi basamakta durdurduğunun ortaya konması amacıyla, PI boyama yöntemi kullanıldı. Apoptotik ve nekrotik hücreleri dışlayabilmek için şekiller histogram değil, skatergram olarak verilmiştir ve boyutu küçük olan yapılar analize alınmamıştır. PI boyama sonucu, hücre içerisindeki DNA miktarı hücrelerin siklusun hangi fazında olduğu ile doğrudan orantılıdır [111; 112; 113]. Bu yöntem sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde (Şekil 4.26-29) kontrol grubunun yapılan analizleri sonucu popülasyonun %80,5'inin G₀-G₁ fazında %2,22'lik kısmının S fazında ve %13,8'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Spontan olarak meydana gelen parçalanmaların ise %4 civarında olduğu hesaplanmıştır. *C. hermannii* bitki ekstresinin 25 µg/mL konsantrasyonunda ise, popülasyonun %55,2'si G₀-G₁ fazında %9,2'lik kısmının S fazında ve %23,6'lik kısmının ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %11,89'dir. 100 µg/mL konsantrasyonda ise, popülasyonun %4,18'i G₀-G₁ fazında, %17,8'i S fazında, %51,2'si ise G₂-M fazında olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin parçalanması ile oluşan küçük boyutlu parçaların oranı ise %16,82'dir. Bu sonuçlar, *C. hermannii* bitki ekstresinin hücre döngüsünü büyük oranda özellikle G₂-M ve S basamaklarında durdurduğunu göstermektedir. *C. hermannii* bitki ekstresinin kompleks bir molekül karışımı olduğu göz önüne alındığında, bu ekstrenin etkilerini hem DNA sentezini yavaşlattığını hem de hücreleri G₂-M fazında kontrol noktasında durdurduğunu düşündürmektedir [114; 115]. *C. hermannii* bitki ekstresinin, HeLa hücre popülasyonunun hücre siklus dağılımlarını anlamlı ölçüde değiştirmesi MTT, xCELLigence ve CFSE yöntemleri ile ortaya konan etkilerini doğrulayan bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

3'ü Türkiye'ye endemik 8 metanolik bitki ekstresinin potansiyel antikanser aktivitesinin ortaya konması amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda endemik bir tür olan *C. hermannii* bitkisinin güçlü ve ümit vaat eden bir antikanserojen aday olabileceği ortaya konulmuştur. Bundan

sonraki çalışmalarda, *C. hermannii* bitki ekstresinin aktiviteden sorumlu molekül ve/veya moleküllerin aydınlatılması ve bu moleküllerin etki mekanizmalarının ortaya konması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1]. Manjusha, C., 2015, Medicinal plants with potential antiarthritic activity, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4 (2), 147-179.
- [2]. Turker, A. ve Koyluoglu, H., 2012, Biological activities of some endemic plants in Turkey *Romanian Biotechnological Letters*, 17 (1), 6949-6961.
- [3]. Salehi, A., Kariminik, A. ve Hasanabadi, Z., 2013, Antibacterial activity of methanol extracts of 4 plants used in traditional herbal medicine of Kerman, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 7 (12), 911-914.
- [4]. Ponni, V., Thenmozhi, S. ve Rajan, S., 2009, Screening of bioactive potentials and phytochemical nature of *Solanum trilobatum* extracts, *Journal of Basic Applied Biology*, 4 (4) 134-139.
- [5]. Taylor, P., 2013, Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines, *Phytotherapy Research*, 27 (4), 530-539.
- [6]. World Health Organization, 2014, *World Cancer Report*, World Health Organization Lyon.
- [7]. Mariotto B., 2010, Projections of the Cost of Cancer Care in the United States: 2010-2020, *Journal of the National Cancer Institute*, 103 (2), 117-128.
- [8]. National Institute of Health, 2018, *Cancer statistic*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>, [Ziyartet tarihi: 28 Haziran 2018].
- [9]. National Institute of Environmental Health Sciences, 2003, *Cancer and the environment*, National Institute of Health, Washington.
- [10]. National Library of Medicine, 2017, *Cervical Cancer*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0021883>, [Ziyaret Tarihi: 28 Haziran 2018].
- [11]. World Health Organization, 2014, *WHO Classification of Tumours*, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- [12]. Jaenisch, Rudolf ve Bird, Adrian, 2003, Epigenetic regulation of gene expression:how to genome integrates instrinsic and environmental signals, *Nature Genetics Supplement*, 33, 245-254.
- [13]. Lichtenstein, P., 2000, Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland, *The New England Journal of Medicine*, 343 (2), 78-85.
- [14]. Yokota, J., 1986, Alterations of myc, myb, and rasHa proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation, 231 (4735) *Science*, 261-265.

- [15]. Slamon, D., 1987, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, 235 (4785), 177-182.
- [16]. Slamon, D., 1989, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science*, 244 (4905), 707-712.
- [17]. Croce, C. M., 2008, Oncogenes and Cancer, *The New England Journal of Medicine*, 358, 502-511.
- [18]. Bos, J. L., 1989, ras Oncogenes in Human Cancer: A Review, *American Association for Cancer Research*, 49 (17), 4682-4689.
- [19]. Knudson, A. G., 1985, Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes, *Cancer Research*, 45(4), 1437-1443.
- [20]. Miyashita, T., Reed, J. C., 1995, Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene, *Cell*, 80 (2), 293-299.
- [21]. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. C., 1991, p53 mutations in human cancers, *Science*, 253 (5015), 49-53.
- [22]. Miki, Y., 1994, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science*, 266 (5182), 66-71.
- [23]. Hakem, R., 1996, The Tumor Suppressor Gene Brca1 Is Required for Embryonic Cellular Proliferation in the Mouse, *Cell*, 85 (7), 1009-1023.
- [24]. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., 2018, Cancer Statistics, 2018, *A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (1), 7-30.
- [25]. Jemal, A., 2017, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival, *J Natl Cancer Inst*, 124 (13), 1-22.
- [26]. National Cancer Institute, 2018, *Types of Cancer Treatment*, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>, [Ziyaret Tarihi: 06 Temmuz 2018].
- [27]. Coates, A., 1983, On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy, *European Journal of Cancer*, 19 (2), 203-208.
- [28]. National Cancer Institute, 2018, *Cervical Cancer Treatment Health Professional Version*. https://www.cancer.gov/types/cervical/hp/cervical-treatment-pdq#link/_703. [Ziyaret Tarihi: 5 Temmuz 2018].
- [29]. Polat, R., Cakilcioglu, U., Satil, F., 2013, Traditional use of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 148 (3) 951-963.
- [30]. Sagnia, B., 2014, Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extrates from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscia fulva* Medicinal Plants Collected in Cameroon, *Plos One*, 9 (10), 1-10.

- [31]. Turker, A. U., Yildirim, A. B., 2013, Evaluation of Antibacterial and Antitumor Activities of Some Turkish Endemic Plants, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (6), 1003-1010.
- [32]. Raja, R. D. A., 2011, Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4 (5), 375-378.
- [33]. Zarinah, Z., 2014, Antioxidant, antimicrobial activity and in-vitro cytotoxicity screening study of Pili nut oil, *International Food Research Journal*, 21 (1), 309-316.
- [34]. Mann, A., Ifarajimi O.R., Adewoye A.T., Ukam C., Udem E.E., Okorie II, Sakpe M.S., Ibrahim D.R., Yahaya Y.A., Kabir A.Y., Ogbadoyi E.O., 2011, In vivo antitrypanosomal effects of some ethnomedicinal plants from Nupeland of North Central Nigeria, *Journal of Traditional Complementary Alternative Medicine*, 8 (1), 15-21.
- [35]. Uddin, S., Grice, I., Tiralongo, E., 2009, Cytotoxic effects of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-7.
- [36]. Baytop, T., 1999, *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- [37]. Baytop, T., 1984, *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul: İ.Ü. Yayınları.
- [38]. Demirezer, Ö., 2007, *Tedavide Kullanılan Bitkiler*. Ankara: Medikal & Nobel Kitapevi.
- [39]. Dönmez, A. A., 2004, The Genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with Special Reference to Hybridisation and Biodiversity in Turkey, 28 (1) *Turk J Bot*, 28(1) 29-37.
- [40]. Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman B.P., Warber, S., Bolling S., Chang C.S., 2003, Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress, *J Agr Food Chem*, 51 (14), 3973-3976.
- [41]. Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Cogan, U., Bomzon, A., 2005, Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel, *J Ethnopharmacol*, 1 (3), 153-161.
- [42]. Tadic, V., Dobric, S., Markovic, G., Sofija, M., Tanja, S., 2008, Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radicalscavenging and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract, *J Agr Food Chem*, 56 (17), 7700-7709.
- [43]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Crataegus orientalis*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/foto-graf-galerisi/view-photo/5337/23794.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [44]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Crataegus monogyna*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/foto-graf-galerisi/view-photo/5336/23769.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [45]. Nature Mobile, 2018, *Crataegus pontica*, <https://www.naturemobile.org/en/species/10751/crataegus-pontica>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].

- [46]. Sen, A., Turan, S. O., Bitis, L., 2017, Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*, *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 541-546.
- [47]. Davis, PH. , 1975, *Flora of Turkey and the East Aegean Island*, Edinburgh, Edinburgh University Press.
- [48]. Guner A., Ozhatay N., Ekim T., Baser K., 2000, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh, Edinburgh University Press.
- [49]. Tuzlacı, E., İsbilen, D., Bulut, G., 2010, Turkish folk medicinal plants, *Marmara Pharm J.*, 1 (14), 47-52.
- [50]. TÜBİVES, 2018, *Centaurea kilaea*, <http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&taxid=5365>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [51]. Sevil Ö., Sema S., Gülaçtı T., 1994, Sesquiterpene lactones from *Centaurea hermannii*, *Phytochemistry*, 35 (2), 435-438.
- [52]. Taşar, N., Gedik, O., & Kıran, Y., 2014, *Centaurea* L. Cinsine ait 4 Taksonun Morfolojik ve Anatomik Yönden Araştırılması, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 26 (2), 79-87.
- [53]. Pushplata, C., Yadunath, J., & Ashish, J., 2017, Protective effect of ethanol extract of *Centaurea behen* linn in carbon tetra chloride-induced hepatitis in rats, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (8), 8197-200.
- [54]. Chougule, P., Pawar, R., Limaye, D., Joshi, Y., Kadam, V., 2012, In-Vitro Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Centaurea behen*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2 (4), 106-110.
- [55]. Esmaeili, A., Mousavi, Z., Shokrollahi, M., 2013, Antioxidant Activity and Isolation of Luteoline from *Centaurea behen* L. Grown in Iran, *Journal of Chemistry*, 1-5.
- [56]. Uysal, I., Celik, S., Oldacay, M., 2005, Antibacterial activity of *Centaurea* species having ethnobotanical features, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (12), 1812-1813.
- [57]. Bahraminejad, S., 2012, In vitro and In vivo antifungal activities of Iranian plant species against *Pythium aphanidermatum*, *Annals of Biological Research*, 3 (5), 2134-2143.
- [58]. Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S., Iranshahi, M., 2017, Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo, *Natural Product Research*, 32 (12), 1436-1440.
- [59]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Centaurea kilaea*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/1036/3700.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [60]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Centaurea hermannii*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/1031/3672.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].

- [61]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Centaurea behen*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/1009/3516.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [62]. Güvenç, A., Duman, H., 2005, Morphology and anatomy of *Kitaibelia balansae* (Malvaceae), with notes on chorology in Turkey, *Biologia*, 60 (4), 1-4.
- [63]. Yıldırım, F., 2015, *Kitaibelia Balansae* Bitkisinde Bulunan Uçucu Yağların ve Biyolojik Aktif Bileşiklerin Araştırılması, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- [64]. Yıldırım, F., Memis, Y., Ozturk, A., Caliskan, Z., Savran, A., Abdullah, M., 2017, Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the Extracts of *Kitaibelia balansae* Species, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 3, 809-819.
- [65]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Kitaibelia balansae*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/fotoğraf-galerisi/view-photo/4284/19681.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [66]. Beara, I., Lesjak, M., Orcic, D., Simin, D., Dukic, N., 2012, Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L., *Food Science and Technology*, 47 (1), 64-70.
- [67]. Samuelsen, A., 2000, The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 71 (1-2), 1-21.
- [68]. Rumbal, N., Keogh, G., Miller, J., Claydon, R., 1997, Grassland Lancelot Plantain (*Plantago lanceolata* L.), *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 40 (3), 373-377.
- [69]. Fons, F., Gargadennec, A., Gueiffier, A., Andary, C., 1998, Effects of cinnamic acid on polyphenol production in *Plantago lanceolata*, *Phytochemistry*, 56 (2), 697-702.
- [70]. Fler, H., Verspohl, E., 2007, Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds, *Phytomedicine*, 42 (1) 409-415.
- [71]. Jankovi, T., Zduni, G., Beara, I., Balog, K., Pljevljakusic, D., Stesevic, D., Savikin, K., 2012, Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species, *Biochemical Systematics and Ecology*, *Biochemical Systematics*, 42 (2012), 69-74.
- [72]. Gálvez, M., Martín-Cordero, C., López-Lázaro, M., Cortés, F., Ayuso, M., 2003, Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines, *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 125-130.
- [73]. Dalar, A., Türker, M., Konczak, I., 2012, Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey, *Journal of Herbal Medicine*, 2 (2), 42-51.
- [74]. Biringaninea, G., Vrayb, B., Vercruyseb, V., Vanhaelen-Fastréa, R., Vanhaelena, M., Dueza, P., 2005, Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook.f. induce nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by interferon- γ -activated macrophages, *Nitric Oxide*, 12 (1), 1-8.

- [75]. Türkiye Bitkileri, 2018, *Plantago lanceolata*, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/foto-graf-galerisi/view-photo/4284/19681.html>, [Ziyaret tarihi: 1 Temmuz 2018].
- [76]. Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- [77]. Ke, N., Wang, X., Xu, X., & Abassi, Y.A., 2011, The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free, *Methods in Molecular Biology*, 740, 33-43.
- [78]. Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C.P., Mez, E.D., Graham, E.S., 2015, Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time, *Biosensors*, 5 (2), 199-222.
- [79]. Duan, G., Tang, Q., Yan, H., Xie, L., Wang, Y., Zheng, X. E., Zou, X., 2017, A Strategy to Delay the Development of Cisplatin Resistance by Maintaining a Certain Amount of Cisplatin-Sensitive Cells, *Scientific Reports*, 7 (1), 432-445.
- [80]. Lyons, A., 2000, Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution, *Journal of Immunological Methods*, 243 (1-2) 147-154.
- [81]. Banks, H., Sutton, K. L., Thompson, W. C., Bocharov, G., Doumic, M., Schenkel, T., Meyerhans, A., 2012, A New Model for the Estimation of Cell Proliferation Dynamics Using CFSE Data, *Journal of Immunological Methods*, 373 (1-2), 143-160.
- [82]. Luzyanina, T., Roose, D., Schenkel, T., Sester, M., Ehl, S., Meyerhans, A., Bocharov, G., 2007, Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data, *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4 (26), 26-40.
- [83]. Lyons, A. B., Parish, C. R., 1994, Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 171 (1), 131-137.
- [84]. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M., Grignani, F., Riccardi, C., 1991, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 139 (2), 271-279.
- [85]. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Bino, G. D., Gorczyca, W., Hotz, M., Traganos, F., 1992, Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry, *Cytometry*, 13 (8), 795-808.
- [86]. Merluzzi, S., Frossi, B., Gri, G., Paruss, S., Tripodo, C., Pucill, C., 2010, Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation, *Blood*, 115 (14), 2810-2819.
- [87]. Ohnishi, S., Takeda, H., 2015, Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects, *Front Pharmacol.*, 6 (14), 6-14.
- [88]. Gewirtz, D., Bristol, M., Yalowich, J., 2010, Toxicity issues in cancer drug development, *Curr Opin Investig Drugs*, 11 (6), 612-616.

- [89]. Alfarouk, K. O., Stock, C.-M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Rauch, C., 2015, Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp, *Cancer Cell Int.*, 15 (71) 71-83.
- [90]. Cragg, G. M., Newman, D. J., 2001, Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium, *Pharmaceutical Biology*, 39 (1), 8-17.
- [91]. Balunas, M. J., Kinghorn, A. D., 2005, Drug discovery from medicinal plants, *Life Sciences*, 78 (5), 431-441.
- [92]. Demain, A. L., Vaishnav, P., 2011, Natural products for cancer chemotherapy, *Microb Biotechnol*, 4 (6), 687-699.
- [93]. Suffness, M., Pezzuto, J., 1990, Assays related to cancer drug discovery, *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, 6, 71-133.
- [94]. Chari, R. V., 2007, Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs, *Accounts of Chemical Research*, 41 (1), 98-107.
- [95]. Ostad, S. N., Rajabi, A., Khademi, R., Farjadmand, F., Eftekhari, M., Hadjiakhoondi, A., Khanavi, M., 2016, Cytotoxic Potential of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana*: The MTT Assay, *Acta Medica Iranica*, 54 (9), 583-589.
- [96]. Bahmani, F., Esmaeili, S., Bashash, D., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P., Gharehbaghian, A., 2018, *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis, *Biomed Pharmacother*, 99 (2018), 598-607
- [97]. Escher, G. B., Santos, J. S., Rosso, N. D., Marques, M. B., Azevedo, L., Carmo, M. A., S.Sant'Ana, A., 2018, Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract, *Food and Chemical Toxicology*, 118 (2018), 439-453.
- [98]. Berrington, D., Lall, N., 2012, Anticancer Activity of Certain Herbs and Spices on the Cervical Epithelial Carcinoma (HeLa) Cell Line, *eCAM*, 2012 (564927).
- [99]. Calderón-Montaño, J. M., Martínez-Sánchez, S. M., Burgos-Morón, E., Guillén-Mancina, E., Jiménez-Alonso, J. J., 2018, Screening for Selective Anticancer Activity of Plants from Grazalema Natural Park, Spain, *Natural Product Research*, 1-5.
- [100]. Piwen W., 2010, Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenol, *Plos One*, 5 (4), 1-9.
- [101]. Valérian, B., Moustapha, O., Anh, N., Caroline, S., Pierre, D., 2014, Methods Applied to the In Vitro Primary Toxicology Testing of Natural Products: State of the Art, Strengths, and Limits, *Planta Medica*, 80 (14), 1210-1216.
- [102]. Şener, L. T., Dinç, G. A., Albeniz, I., 2017, iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines, *Experimental And Therapeutic Medicine*, 14 (3), 1866-1870.

- [103]. Özdemir, A., Ark, M., 2013, xCELLigence Real Time Cell Analysis System: A New Method for Cell Proliferation and Cytotoxicity, *Niche*, 153(2), 7-9.
- [104]. Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Muñoz-Capó, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J. C., Besalduch, J., 2014, xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies, *OncoTargets and Therapy*, 2014 (7), 985-994.
- [105]. Lim, S.W., Loh, H.-S., Ting, K.-N., Bradshaw, T. D., Allaudin, Z. N., 2015, Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells, *Tropical Life Sciences Research*, 26 (1), 111-120.
- [106]. Chakrabarti, R., Kundu, S., Kumar, S., Chakrabarti, R., 2000, Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C, *J. Cell. Biochem*, 80 (1), 133-138.
- [107]. Natarajan, M., Mohan, S., Herman, T., 2000, Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide cytotoxicity assay, *Cancer Detect. Prev*, 24 (5), 405-414.
- [108]. Luzyanina, T., Mrusek, S., Edwards, J. T., Roose, D., Ehl, S., 2006, Computational analysis of CFSE proliferation assay, *Mathematics Subject Classification*, 54 (1), 1-35.
- [109]. Becker, K., Ghule, P., Therrien, J., Lian, J., Stein, J., Wijnen, A., Stein, G., 2006, Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells is Supported by a Shortened G₁ Cell Cycle Phase, *Journal Of Cellular Physiology*, 209 (3), 883-893.
- [110]. Beck, O., Topp, M.S., Koehl, U., Roilides, E., Simitsopoulou, M., Hanisch, M., Latge, J.P., 2017, Generation of highly purified and functionally active human TH₁ cells against, *Blood*, 107 (6), 2562-2569.
- [111]. Krishan, A., 1975, Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining, *The Journal Of Cell Biology*, 66 (1), 188-193.
- [112]. Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.D., 1976, Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide, *The Journal Of Cell Biology*, 71 (1), 172-181.
- [113]. Awang, N., Aziz, Z.A., Kamaludin, N. F., Chan, K.M., 2014, Cytotoxicity and mode of cell death induced by Triphenyltin (IV), *Journal of Biological Sciences*, 14 (2), 84-93.
- [114]. Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T., 2011, Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line, *Chinese Medicine*, 6 (1), 39-47.
- [115]. Oliveiraa, P.F., Alves, J.M., Damascenoa, J.L., Oliveiraa, R.A., Dias, H.J., Crotti, A.E., Tavares, D.C., 2015, Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25 (2), 183-188.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Utku GÜNEŞ
Doğum Yeri	Denizli
Doğum Tarihi	17.03.1988
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0554 731 01 93
E-Posta Adresi	utkugunes@istanbul.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	04.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Fakültesi
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı