



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ACI ÇİĞDEM (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum
baytopiorum* C.D.) EKSTRELERİNİN HeLa HÜCRELERİ
ÜZERİNE ANTI-TÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Özlem DAĞDEVİREN
Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobiyoloji Programı**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN**

Nisan, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ACI ÇİĞDEM (*Colchicum umbrosum* S. ve *Colchicum baytopiorum*
C.D.) EKSTRELERİNİN HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTI-
TÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Özlem DAĞDEVİREN
Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobiyoloji Programı**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN**

Nisan,2010

İSTANBUL

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 3495 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarımı yönlendiren, Tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli Tez danışmanım Sayın **Yard. Doç. Dr. Gül ÖZCAN ARICAN**'a en derin teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında gerekli laboratuvar imkanlarının sunulmasını sağlayan İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sevgili hocam Sayın **Prof. Dr. Yavuz ÇOTUK**'a, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın **Prof. Dr. Güler TEMİZKAN**'a, moleküler analizlerde ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın **Yard. Doç. Dr. Ercan ARICAN**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım bitki ekstralarının elde edilmesine ve kullanılmasına olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Neriman ÖZHATAY**'a ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Prof. Dr. Nurhayat SÜTLÜPİNAR**'a, Sayın **Dr. Sevda PIRILDAR**'a teşekkürlerimi iletirim.

Çalışmalarım sırasında samimi destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın **Sema ATAY**'a, arkadaşlarım **Özge ÖZGEN**'e ve **Ayhan ÇUHACI**'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu günlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili annem **Mahmure DAĞDEVİREN** ve sevgili babam **Mücellit DAĞDEVİREN**'e, sevgili kardeşlerim **Dr. Çiğdem DAĞDEVİREN** ve **Özcan DAĞDEVİREN**'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İstanbul, Nisan, 2010

Özlem DAĞDEVİREN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. APOPTOZ	5
2.1.1. Apoptoz Morfolojisi	6
2.1.2. Apoptoz Mekanizmaları	7
2.1.2.1. Kaspaz Kaskadlarının Başlatılması.....	8
2.1.2.2. Dış Ölüm Yolağı.....	9
2.1.2.3. İç Ölüm Yolağı.....	10
2.1.2.4. <i>bcl-2</i> Gen Ailesi Tarafından Apoptozun Düzenlenmesi.....	11
2.2. KANSER TEDAVİSİ.....	13
2.2.1. Kanser Tedavisinde Apoptozun Rolü	14
2.2.2. Bitkilerin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	16
2.3. <i>Colchicum</i> BİTKİSİNİN ÖZELLİKLERİ	16
2.3.1. Kolşisinin Kimyasal Yapısı	17
2.3.2. Kolşisinin Etki Mekanizması	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	21

3.1. HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KULLANILAN BESİ YERİNİN HAZIRLANMASI.....	22
3.2. HeLa HÜCRE SOYU.....	22
3.3. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMLERİ.....	23
3.4. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMLERİ.....	23
3.5. <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. VE <i>Colchicum umbrosum</i> S. BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI.....	23
3.6. <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. VE <i>Colchicum umbrosum</i> S. BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN UYGULANMASI	24
3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ.....	24
3.7.1. Sitotoksik Aktivite Tayini: Kolorimetrik MTT Yöntemi.....	24
3.7.2. Apoptotik İndeks.....	25
3.8. APOPTOZUN İNCELENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	25
3.8.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri.....	25
3.8.1.1. Faz-Kontrast Mikroskobu.....	25
3.8.1.2. Işık Mikroskobu.....	26
3.8.1.3. Floresan Mikroskop.....	26
3.8.2. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	27
3.8.2.1. Total RNA İzolasyonu.....	27
3.8.2.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi.....	28
3.8.3. Biyokimyasal Yöntemler	29
3.8.3.1. DNA İzolasyonu.....	29
3.8.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi.....	30
3.8.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ.....	32

4.1.1. Sitotoksik Aktivite Tayini: Kolorimetrik MTT Yöntemi.....	32
4.1.2. Apoptotik İndeks.....	39
4.1.3 Genel Değerlendirme	44
4.2. APOPTOZUN İNCELENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	45
4.2.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri.....	45
4.2.1.1. <i>Faz-Kontrast Mikroskobu.....</i>	<i>45</i>
4.2.1.2. <i>Işık Mikroskobu.....</i>	<i>49</i>
4.2.1.3. <i>Floresan Mikroskop.....</i>	<i>56</i>
4.2.2. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	60
4.2.2.1. <i>Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)</i>	
<i>Yöntemi.....</i>	<i>60</i>
4.2.3. Biyokimyasal Yöntemler	62
4.2.3.1. <i>Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi.....</i>	<i>62</i>
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	63
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	:Apoptozun morfolojisi	7
Şekil 2.2	:Apoptotik yollar	8
Şekil 2.3	: <i>bcl-2</i> gen ailesi homolojisi	12
Şekil 2.4	:Kolşisinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.5	:Mikrotübül yapısı	20
Şekil 2.6	:Kolşisinin mikrotübüllere bağlanması.....	20
Şekil 3.1	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitkisi (A: Genel Görünüm, B: Çiçek ve Yumrular)	21
Şekil 3.2	: <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkisi (A: Genel Görünüm, B: Yumru).....	22
Şekil 4.1	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri	34
Şekil 4.2	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3:0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.....	34
Şekil 4.3	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri	36
Şekil 4.4	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3:0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.....	36
Şekil 4.5	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri	38
Şekil 4.6	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3:0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.....	38
Şekil 4.7	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstraların ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.....	40

Şekil 4.8	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.....	42
Şekil 4.9	: <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.....	44
Şekil 4.10	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200)	46
Şekil 4.11	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	46
Şekil 4.12	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	47
Şekil 4.13	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	47
Şekil 4.14	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	48
Şekil 4.15	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).	48
Şekil 4.16	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre).....	50
Şekil 4.17	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitkisinden elde edilen ekstrelerin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)	50
Şekil 4.18	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre).....	51
Şekil 4.19	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitkisinden elde edilen ekstrelerin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)	51
Şekil 4.20	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre).....	52
Şekil 4.21	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitkisinden elde edilen ekstrelerin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)	52
Şekil 4.22	: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre)	53
Şekil 4.23	: HeLa hücre kültürlerinde <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. bitkisinden elde edilen ekstrelerin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)	53

- Şekil 4.24** : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre) 54
- Şekil 4.25** : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre) 54
- Şekil 4.26** : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre) 55
- Şekil 4.27** : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre) 55
- Şekil 4.28** : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre)..... 57
- Şekil 4.29** : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)..... 57
- Şekil 4.30** : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre)..... 58
- Şekil 4.31** : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Apoptotik Hücre)..... 58
- Şekil 4.32** : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre)..... 59
- Şekil 4.33** : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre, →: Apoptotik Hücre)..... 59
- Şekil 4.34** : *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda *bcl-2* gen ailesine ait *bax*, *bak*, *bid* genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml)..... 61
- Şekil 4.35** : *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda *bcl-2* gen ailesine ait *bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1*, *bfl-1* genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml)..... 61
- Şekil 4.36** : *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda HeLa hücrelerindeki genomik DNA içeren ve içermeyen nükleozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml) (G: genomik DNA içeren nükleozomal DNA, N: genomik DNA içermeyen nükleozomal DNA). 62

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: RT-PCR için kullanılan PCR cihazı program tablosu.....	28
Tablo 4.1	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 24 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.....	33
Tablo 4.2	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 48 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.....	35
Tablo 4.3	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 72 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.....	37
Tablo 4.4	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 24 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri	39
Tablo 4.5	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 48 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri	41
Tablo 4.6	: Kontrol ve <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D. ve <i>Colchicum umbrosum</i> S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 72 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri	43

SEMBOL LİSTESİ

AI	: apoptotik indeks
AMP	: adenzin monofosfat
APAF-1	: apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1
ATP	: adenzin trifosfat
BAD	: bcl-2 ilişkili ölüm organizatörü
BAK	: bcl-2 homolog antagonisti
BAX	: bcl-2 ilişkili x proteini
BCL-X	: bcl-2 homolog protein
BCL-XL	: ekstra büyük B-hücre lenfoması
BCL-2	: B-hücre lenfoması 2
BFL-1	: bcl-2 ilişkili protein A1
BH	: bcl-2 homoloji bölgesi
BH1	: bcl-2 homoloji bölgesi 1
BH2	: bcl-2 homoloji bölgesi 2
BH3	: bcl-2 homoloji bölgesi 3
BİD	: BH3 etkileşim bölgesi ölüm agonisti
BİK	: bcl-2 etkileşimli öldürücü protein
BOP	: sadece BH3 bölgesini içeren protein
DAPI	: 4'-6-diamidino-2-fenilindol
DD	: ölüm bölgesi
DED	: ölüm tetikleyici bölgeler
DISC	: ölüm tetikleyici sinyal kompleksi
DMEM	: dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: dimetilsülfoksit
DNA	: deoksiribonükleik asit
dNTP	: 2'-deoksinükleozid 5'-trifosfat
DR3	: ölüm reseptör 3
DR4	: ölüm reseptör 4
DR5	: ölüm reseptör 5
DR6	: ölüm reseptör 6
EDTA	: etilen diamin tetra asetik asit
FADD	: fas ilişkili ölüm bölgesi
FAS	: cd95, apo-1
FASL	: fas ligand
FBS	: fetal bovin serum
FTS	: fizyolojik tuzlu su
GTP	: guanozin trifosfat
HBSS	: dengelenmiş tuz solüsyonu
MCL-1	: miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini
MI	: mitotik indeks
MTT	: 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid

PBS	: fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu
PS	: fosfatidilserin
RNA	: ribonükleik asit
ROS	: reaktif oksijen türevleri
RT-PCR	: revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TAE	: tris-asetat-edta
T-BİD	: bid proteininin uçlarından kesilmiş şekli
TE	: tris-edta
TNF	: tümör nekroz faktör
TNFR	: tümör nekroz faktör reseptör
TNF-R1	: tümör nekroz faktör reseptör 1
TRAIL	: tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz teşvik edici ligand
TRAIL-R1	: tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz teşvik edici ligand reseptör 1
TRAIL-R2	: tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz teşvik edici ligand reseptör 2
UV	: ultraviyole

ÖZET

ACI ÇİĞDEM (*Colchicum umbrosum* S. VE *Colchicum baytopiorum* C.D.) EKSTRELERİNİN HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNE ANTI-TÜMÖRAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu tez çalışmasında, Acı Çiğdem (*Colchicum*) bitkisinden hazırlanan ekstrelerin insan serviks karsinomu kökenli HeLa hücre soyu üzerindeki anti-tümöral etkisi incelendi. Bu bağlamda Bolu (Abant)'da yetişen *Colchicum umbrosum* Steven (S.) ve Antalya (Termessos)'da yetişen *Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell (C.D.) bitkilerinin yumrularından elde edilen ekstrelerin 5 farklı konsantrasyonu (0.001, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat süresince HeLa hücreleri üzerine uygulanarak 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile öncelikle sitotoksik aktiviteleri incelendi. *Colchicum* cinsine ait 2 farklı tür ekstresinin HeLa hücrelerinde meydana getirdikleri sitotoksitenin uygulanan konsantrasyona bağlı olarak kontrole göre anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0,05). *Colchicum umbrosum* S. bitkisine ait ekstrenin 0.001 mg/ml konsantrasyonunun kontrole göre anlamlı sitotoksik etkisi ise sadece 72 saatte ortaya çıktı (p<0,01). Ayrıca, 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile apoptotik indeks değerleri belirlenerek maksimum apoptotik indeks değerleri *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstresinin 48 saat uygulanmasında saptandı.

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin en etkili 0.1 mg/ml'lik konsantrasyonunun 48 saat uygulandığı deney grubunda apoptoza özgü morfolojik değişimler faz-kontrast, ışık ve floresan mikroskopta gösterildi.

Apoptozun moleküler düzeyde saptanması amacıyla *bcl-2* gen ailesine üye *bax*, *bak*, *bik*, *mcl-1*, *bfl-1*, *bcl-2*, *bcl-x* genlerinin anlatım seviyeleri Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile araştırıldı. Ayrıca agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak apoptoza özgü DNA fragmentasyonu incelendi. *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin 0.1 mg/ml konsantrasyonunun HeLa hücrelerine 48 saat uygulandığı deney grubunda *mcl-1* ve *bcl-x* genlerinin anlatımlarında kontrole göre artış olduğu, *bax*, *bak*, *bik*, *bfl-1* genlerinin anlatımlarının yapıldığı, *bcl-2* gen anlatımının ise yapılmadığı saptandı.

Sonuç olarak değerlendirilen parametreler doğrultusunda, her iki ekstrenin de farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkiye sahip oldukları ve HeLa hücrelerinin *Colchicum* bitkisinin *baytopiorum* türüne karşı daha duyarlı olduğu belirlendi. Bu etki ile beraber *Colchicum baytopiorum* C.D. bitki ekstresinin en etkin konsantrasyonunun 0.1 mg/ml olduğu ve apoptoza yol açarak HeLa hücrelerinde anti-tümöral etki gösterdiği ilk kez bu çalışma ile ortaya kondu.

SUMMARY

RESEARCH OF ANTI-TUMORAL EFFECTS OF AUTUMN CROCUS (*Colchicum umbrosum* S. AND *Colchicum baytopiorum* C.D.) EXTRACTS ON HeLa CELLS

This thesis presents a research on the anti-tumoral effect of the Autumn Crocus (*Colchicum*) extracts on HeLa cell line originated from human cervical carcinoma. The HeLa cells have been treated with extracts taken from corms of *Colchicum umbrosum* Steven (S.) of Bolu (Abant) and *Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell (C.D.) of Antalya (Termessos). In this research, 5 different concentrations (0.001, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml) have been used at 24, 48 and 72 hours. The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method has been applied in order to observe the cytotoxic activities. Accordingly it has been determined that the cytotoxicity in HeLa cells, treated with the extracts from the two species of *Colchicum* plant is being increased in concentration compared to the control group ($p < 0,05$). The meaningful cytotoxic effect of the 0.001 mg/ml concentration extracted from *C.umbrosum* S. have been occurred in only 72 hours, compared to the control group ($p < 0,01$). Additionally, apoptotic index have been determined by 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) respectively. The maximum parameters of the apoptotic index have been detected in the application of the *C.baytopiorum* C.D. extract, in 48 hours.

The extract of *C.baytopiorum* C.D. has been treated with the most effective concentration of 0.1 mg/ml in the 48 hours experiment group. The morphological changes belong to the apoptosis have been shown through phase-contrast, light and the flouroscent microscopies.

In order to determine the apoptosis at the molecular level, the expression rates of the genes of the *bax*, *bak*, *bik*, *mcl-1*, *bfl-1*, *bcl-2*, *bcl-x* which are members of the *bcl-2* gene family, have been searched through the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method. In addition, the DNA fragmentation specific to apoptosis has also been examined using the agarose gel electrophoresis method. In the 48 hours experiment group of the HeLa cells that was treated with the 0.1 mg/ml concentration of the *C.baytopiorum* C.D. extract, an increasing have seen in expressions *mcl-1* and *bfl-1* genes compared to control group, there is some increase have been determined in the *bax*, *bak*, *bik* and *bfl-1* genes expressions, on the other hand no expression observed in the *bcl-2* genes.

Based on the evaluation of this parameters, different concentrations of the both extracts from the two *Colchicum* species have cytotoxic effects and it has been understood that HeLa cells are more sensitive to the species of *C.baytopiorum*. For the first time, this research proves that the most effective concentration of the *C.baytopiorum* C.D. extract is 0.1 mg/ml and it shows anti-tumoral effects by causing apoptosis.

1. GİRİŞ

Kanser, homeostatik geri bildirim mekanizmasının kontrolünden çıkmış olan somatik hücrelerin sürekli, klonal olarak çoğalması ile karakterize edilen ve normal dokuyu istila ederek öldürebilen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu hastalık, normal hücrelerin büyümeyi inhibe eden uyarılara cevapsızlık, büyüme uyarılarına karşı kendiliğinden oluşan yetmezlik, apoptoza karşı duyarsızlık, kontrolsüz hücre çoğalması, sürekli anjiogenez, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması süreçlerini kapsamaktadır (Evan ve Vousden, 2001; Mitchell ve Kumar, 2003).

Kanser tedavisi, kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, immünoterapi, gen tedavisi ve alternatif tedavi yöntemlerini içermektedir. Bunlar arasından en sık kullanılan yöntem kemoterapidir. Kanser kemoterapisinde amaç, tümör büyümesini engellemek ve öldürücü sitotoksik etki sağlamaktır. Bu bağlamda genellikle hücre replikasyonunun gerçekleşmesini sağlayan metabolik olayların engellenmesi hedeflenmektedir. Kemoterapötik ilaçlar, bölünen hücrelere direkt olarak etki göstermekle beraber, kan dolaşımına katılarak kanser hücrelerinin oluştukları yerlerde ve metastaz yaptıkları diğer dokularda ölmesini de sağlamaktadırlar. Böylece kemoterapötik ilaçlarla tedavi yöntemi, vücudun sadece belli bir bölgesine uygulanması açısından avantaj sağlamaktadır. Fakat kullanımda olan ilaçlar, kanser hücrelerine zarar vermekle birlikte çoğalmakta olan diğer normal hücreleri de etkilemektedirler. Bu nedenle tedavi aralıklı olarak uygulanmakta ve kanserli olmayan hücrelerin tekrar normal sayısına dönmesi sağlanmaktadır (Mycek ve diğ., 1998; Pırıldar, 2006).

Yeni anti-kanser ajanların araştırılması ve daha etkili ilaçların geliştirilmesi çalışmalarında, doğal ürünlerin önemli bir yeri vardır. *Liliaceae* (*Colchicaceae*) familyasına ait *Colchicum* cinsi bitkiden elde edilen kolşisin, doğal ürünler arasına girmektedir. Kemoterapide kullanılan bir anti-neoplastik ilaç olan kolşisin, kemoterapötiklerin, mitotik inhibitörler sınıfında yer almaktadır. Kolşisin, tübülün

polimerizasyon inhibitörü olarak anti-tümöral etki göstermektedir. Tübülün inhibisyonu ile mitokondrinin yapısında değişiklikler görülmekte, iğ iplikleri oluşumu baskılanmakta, kemotaktik faktörlerin salınımında azalma meydana gelerek, siklik AMP artışı görülmektedir. Mikrotübüllerin fonksiyonuna, *in vitro* ortamda zarar verecek olan ajanlar hücreyi mitoz aşamasında durdurmakta ve bunun sonucunda da hücre ölümü nekroz ya da apoptoz şeklinde gerçekleşmektedir (Pırıldar, 2006).

Apoptoz; çok hücreli organizmalardaki hücrelerin, normal gelişimin devamlılığını ve homeostaziyi sağlamak amacı ile patojen saldırılar ve abiyotik stresler başta olmak üzere çeşitli sebeplerle dışarıdan veya içeriden gelen uyarılara cevaben gerçekleştirdiği programlı hücre ölümüdür. Belirgin morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri kapsamaktadır. Apoptotik hücre, hacimde küçülme, nüklear kromatin fragmentasyonu ve kondensasyonu, sitoplazmik organellerin yoğunlaşması, endoplazmik retikulum hacminin değişmesi, plazma membranında girinti çıkıntılarının ve apoptotik cisimciklerin oluşması ile karakterize edilmektedir. Apoptoz, hasarlı ya da istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde, gelişimde ve homeostazinin korunmasında kritik rol oynamaktadır. Bu süreçteki bozukluk, kanser ve otoimmün bozukluklardan, nörodejeneratif hastalıklar ve iskemik hasarlara kadar çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Cohen, 1997; Chang ve Yang, 2000; Özören ve El-Deiry, 2000; Collazo ve diğ., 2006; Shimazu ve diğ., 2007) .

Apoptotik hücre ölümü, ilk olarak hücreye ölüm sinyalinin gitmesi, ardından hücre yapısında belirgin morfolojik değişikliklerin oluşması sonucunda hücrenin yok edilmesi şeklinde iki aşamada meydana gelmektedir (Cohen, 1997). Apoptoz, hücredeki sinyalleşme, büyüme faktörü eksikliği, granzim salınımı, özgül reseptör-ligand etkileşimleri, çeşitli stres faktörleri (kemoterapi, radyasyon vb.) ile teşvik edilmektedir. Daha sonra hücre ölüm süreci başlatılmaktadır. Bu süreçte, Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR) ailesi görev almaktadır. TNFR proteinlerinin oligomerizasyonu da başlatıcı kaspazları aktive ederek, hücreleri apoptoza götüren sürecin başlamasına neden olmaktadır. Daha sonra hücre infaz yolağına doğru gitmektedir. Bu süreçte bazı özgün proteinler rol oynamaktadır. Bunların etkileri sonucunda sinyaller, adaptör proteinler yardımı ile infaz mekanizmasına iletilmekte ve *bcl-2* ailesi proteinleri aracılığıyla mitokondrial geçirgenliği düzenlemektedirler. Dış mitokondrial zardaki geçirgenlik artışı sitokrom c salınmasına neden olmaktadır. Sitokrom c, sitozolde apoptoz proteaz

aktivasyon faktörüne (Apaf-1) bağlanmaktadır. Apaf-1 de adenozin trifosfat (ATP) varlığında oligomerleşerek pro-kaspaz-9 molekülüne bağlanmakta ve apoptozu oluşturmaktadır. Aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivasyonunda rol oynamaktadır. Bunlara karşın, mitokondrial zar da yer alan *bcl-2*, mitokondrial geçirgenlik artışını engelleyerek ve Apaf-1 vb. proteinleri stabil hale getirerek kaspazların aktive olmasını önlemektedir. Böylece apoptoz gerçekleşmemektedir. *bcl-2* ailesi üyelerinden *bax-xL* ve *bcl-2* anti-apoptotik rol oynarken, *bax*, *bad* ve *bak* apoptozu tetiklemektedir (Shi, 2003).

Apoptoz ile gerçekleşen ölümün ardından hücreler fagositoz ile yok edilmektedir. Fagositozun gerçekleşmesine yardımcı olan çeşitli moleküller bulunmaktadır. Bu süreç, iç sitoplazma yüzeyinde fosfatidilserinin (PS), dış yüzeye transloke olması ile gerçekleşmektedir. PS'nin zardaki değişikliği apoptozun erken evresinin gösterilmesini ve bu hücrenin fagositozunu sağlamaktadır (Mitchell ve Cotran, 2003).

Son yıllarda kanser tedavisinde, apoptozun gerçekleşmesini sağlayan ajanlar kullanılarak apoptozun moleküler mekanizmasının araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Buna ek olarak, kanser tedavisinde doğal ürünlerin kullanımının da büyük bir yere ve öneme sahip olmasından dolayı yapılan bu çalışmada *Colchicum umbrosum* Steven (S.) ve ülkemize endemik olan *Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell (C.D) bitkilerinden elde edilen ekstreler kullanılmıştır. Bu bitkilerden hazırlanan ekstreler, 5 farklı konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat süresince insan serviks karsinoması kökenli HeLa hücre kültürlerine uygulanmıştır. Kullanılan ekstrelerin anti-tümöral etkisi araştırılarak, bu etkinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca, ekstre uygulaması sonucunda oluşacak sitotoksikite kolorimetrik 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi ile araştırılarak *Colchicum* cinsinin farklı türlerinin *in vitro* sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması da hedeflenmiştir.

Ekstre uygulaması sonucunda ortaya çıkacak olan sitotoksitenin apoptoz ile olup olmadığının belirlenmesi amacıyla apoptozun morfolojik karakterleri; genel sitotoksikite için faz-kontrast mikroskopunda, giemsa boyası ve Feulgen metodu ile ışık mikroskopunda, 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile floresan mikroskopta gösterilmiştir. Ayrıca hücre kinetiği parametrelerinden Apoptotik İndeks (AI)

değerlendirilmiştir. Apoptoz sırasında meydana gelen DNA fragmentasyonu agaroz jel elektroforezi yöntemi ile, apoptozun kontrol mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynayan *bcl-2* gen ailesine üye pro-apoptotik (*bax*, *bak*, *bid*) ve anti-apoptotik (*bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1*, *bfl-1*) genlerin anlatımları, Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile incelenmiştir.

Çalışmamızda, bir türü ülkemize endemik olan *Colchicum* bitkilerine ait iki ekstrenin farklı konsantrasyonlarının HeLa hücrelerinde sitotoksik etkilerinin gösterilmesinin yanında meydana gelen apoptozun moleküler mekanizmasının düzenlenmesinde hangi moleküllerin rol oynadığının ortaya konulması da planlanmıştır. Bu bağlamda kanser tedavisinde büyük bir öneme sahip olan doğal ürünlerden elde edilen ilaç çalışmalarının teşvik edilmesine ve buna ek olarak ülkemize endemik bitkilerin bu alanda değerlendirilmesine katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. APOPTOZ

Çok hücreli organizmalarda, bir taraftan yeni hücreler sentezlenirken, diğer taraftan hücreler arası ilişkilerin gerektirdiği şekilde fonksiyonunu gerçekleştiremeyen ya da gereksinim duyulmayan hücreler, hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. Böylece organizmalar, hücre bölünmesi, hücre göçü ve programlanmış hücre ölümü ile hücre sayılarını, doku boyutlarının kontrol edilmesini ve hücrelerin homeostaziyi tehdit eden diğer hücrelerden kendilerini korumalarını sağlamaktadırlar (Hengartner, 2000; Öktem ve diğ., 2001; Yılmaz, 2005).

Apoptoz terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılarak canlı dokularda toplam hücre sayısını kontrol altında tutan programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Corazza ve diğ., 2009; Zhivotovsky ve Orrenius, 2009). Apoptoz, eski Yunanca'da kullanılan "apo-TEO-sis" kelimesinden kökenlenmektedir ve "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü ve hücre intiharı, apoptoz ile aynı anlamı taşımaktadır (Yılmaz, 2005).

Apoptoz, organogenezde (damak füzyonu sonrasında kalıntı epitel hücrelerin ortadan kaldırılması), gelişimsel involüsyonda (embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmakların arasındaki perdenin yok olması) ve implantasyonda gözlenen bir durumdur. Ayrıca homeostazinin sağlanmasında ve patolojik süreçte de rol oynamaktadır. Bunlar;

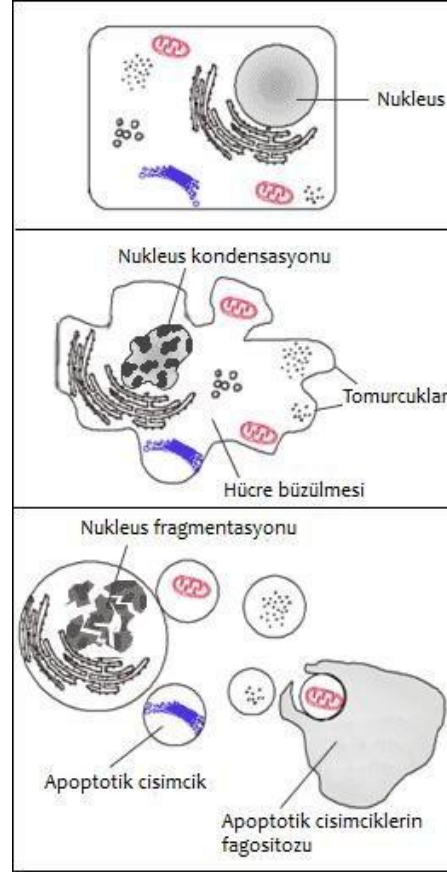
- 1- Timusta otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması, sitokin depleksiyonunun ardından B ve T lenfositlerin hücre ölümü gibi olayları içeren immün hücrelerin seçimi,
- 2- Yaşlanmış ya da fonksiyonunu kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması,
- 3- Menstürasyonda endometriyumun dökülmesi, emzirme sonrası meme dokusunun hormona bağımlı fizyolojik gerilemesi,

- 4- Sitotoksik kemoterapi, radyasyon, ısı, radyoterapi gibi çeşitli zehirleyici etkenlerin onarılamayan DNA hasarına neden olması sonucunda gerçekleşen hücre ölümü,
- 5- İnsan bağışıklık sistemi yetersizliğine neden olan virüs, Adenovirüs infeksiyonu vb. viral hastalıklarda meydana gelen hücre ölümleri gibi olayları kapsamaktadır (Öktem ve diğ., 2001; Mitchell ve Cotran, 2003).

2.1.1. Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz, genel olarak tek hücrede ya da hücre gruplarında meydana gelmektedir. Apoptoza giden hücrelerde kromatinde yoğunlaşma gözlenmekte ve nükleik asitlerde yıkılma meydana gelmektedir. DNA, endonükleazların aktivasyonu ile internükleozomal bölgelerden 180-200 baz çifti büyüklüğünde parçalara ayrılmaktadır. Bu apoptoza özgü bir durum olarak bilinmektedir. Apoptoz sırasında, yaklaşık olarak 300 000 kırılma meydana gelmesinden dolayı hücre onarımı gerçekleştirilememektedir. Hücre büzölmeye başlamakta, su kaybı gözlenen hücrenin yüzeyi şekilsizleşmektedir. Sitoplazmik tomurcuklar gelişerek apoptotik cisimlere parçalanmaktadırlar. Bu apoptotik cisimler, sitoplazma ve organellerin zarla çevrili keselerinden oluşmaktadır. Apoptoz sırasında organellerde de yıkım gerçekleşmektedir (Şekil 2.1) (Öktem ve diğ., 2001; Mitchell ve Cotran, 2003; Ma ve diğ., 2005).

Apoptozun en belirgin morfolojik özelliklerinden birisi de hücre zarının iç yüzeyinde yer alan PS'nin dış yüzeye çıkmasıdır. PS, apoptotik hücrelerin tanınması ve fagosite edilmesi için bir sinyaldir. Hücreler, morfolojilerinde meydana gelen değişimler sonucunda makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından tanınıp, parçalanarak yok edilmektedir (Collazo ve diğ., 2006; Ricci ve El-Deiry, 2007).



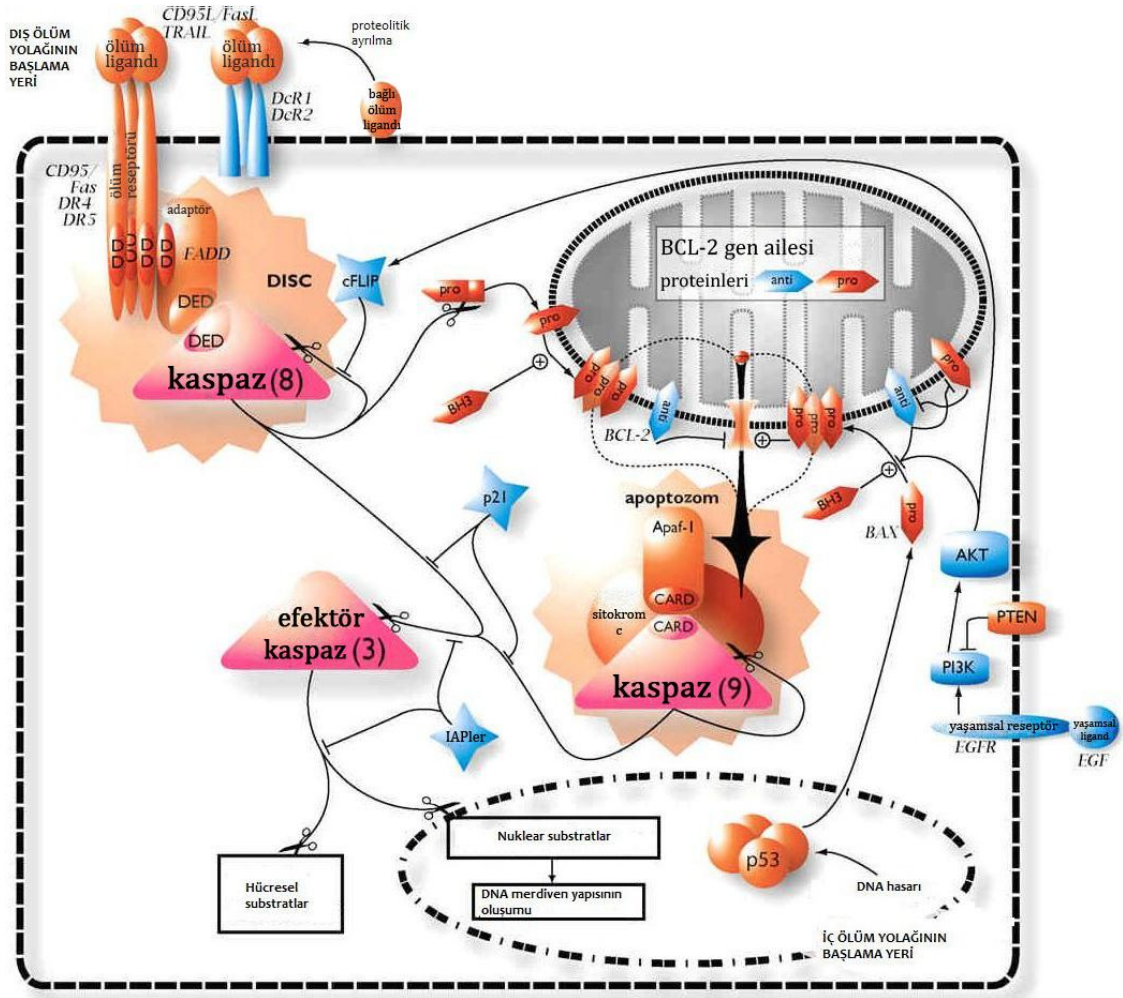
Şekil 2.1: Apoptozun morfolojisi (Anonim-a, 2010).

2.1.2. Apoptoz Mekanizmaları

Temel yaşam sinyallerinin alınmaması, engellenmesi ya da dış (ölüm reseptörü) veya iç (mitokondrial) ölüm yollarının doğrudan aktivasyonuna hücrenin cevabı apoptoz sürecini başlatmaktadır. Hem iç ölüm yolağında hem de dış ölüm yolağında ortak nokta, başlatıcı ve efektör kaspazları içermeleridir (Şekil 2.2) (Tang ve Kehrer, 2007).

Kaspazlar, kesim substratı olarak sisteini seçen sistein proteazlardır ve inaktif pro-enzimler olarak sentezlenmektedirler. Bazı özel durumlarda, kaspaz alt üniteleri birbirine bağlanmaktadır. Bu bağlanma, kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedir. (Cohen, 1997; Chang ve Yang, 2000) Pro-kaspazların aspartik asit moleküllerinin işlenmesi sonucunda aktivasyonu gerçekleşmektedir. Genellikle kaspazlar, kaskad şeklinde fonksiyon göstermektedirler. Bu kaskadın en üst basamağındaki kaspazları,

çeşitli kaspaz adaptörleri ile uyarılmaktadır. Bu olay apoptozda önemli yer tutmakta ve pro-apoptotik, anti-apoptotik proteinler tarafından kontrol edilmektedir. Kaspazlar bir kere aktive edildiklerinde birbirlerini aktifleştirmekte ve önemli hüresel proteinleri yıkarak apoptozu sebep olmaktadır (Chang ve Yang, 2000).



Şekil 2.2: Apoptotik yollar (Bögler ve Weller, 2002).

2.1.2.1. Kaspaz Kaskadlarının Başlatılması

Apoptotik sinyallere cevapta rol oynayan iki mekanizma bilinmektedir. Bu apoptotik sinyal yolları, başlatıcı kaspazlarının birbiri ardına aktivasyonu ile apoptotik sinyallere cevap vermektedirler (Kuan ve Kuida, 2003).

Apoptotik yollardan biri, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile olmaktadır. TNFR ailesinin üyeleri, ölüm reseptörleridir (Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6). Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik kısımları, ölüm bölgesi (DD) denilen bir aminoasit dizisi içermektedir (Igney ve Krammer, 2002; Tomatır, 2003). Fas reseptörün trimerizasyonunu takiben ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) meydana gelmektedir. Bu kompleksin bir merkez ögesi olan apoptotik adaptör molekül FADD, DD aracılığı ile protein-protein etkileşimleri boyunca Fas molekülüne katılmaktadır. DISC kompleksine bu katılanların ardından, FADD prokaspaz-8 ve/veya -10 gibi başlatıcı kaspazlara bağlanmaktadır. Bu da pro-kaspaz-8 ve/veya -10 proteinlerini uyarmaktadır. İç proteaz aktivitesiyle otokatalizin gerçekleşmesi neticesinde aktif kaspaz-8 ve/veya -10 meydana gelmektedir. Daha sonra kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazlar aktif hale gelerek kaspaz kaskadın başlamasına neden olmaktadır. Bu mekanizma, DD'leri içeren TNFR'nin diğer üyeleri tarafından da kullanılmaktadır (Kuan ve Kuida, 2003).

Kaspaz kaskad aktivasyonunu tetikleyen ikinci yolak da mitokondrial elektron taşıma zincirinin bir elemanı olan sitokrom c'dir. Apoptozun erken aşamasında, mitokondrinin zarları arasındaki alandan, sitozole sitokrom c salınmaktadır. Bu süreç *bcl-2* ailesi üyeleri tarafından düzenlenmektedir. Sitokrom c'nin salınmasından sonra hücre içi apoptozom kompleksinin oluşumu sağlanmaktadır. Bu kompleks, sitokrom c ile birlikte Apaf-1, ATP ve inaktif başlatıcı kaspaz olan pro-kaspaz-9'u içermektedir. Apoptozomun oluşması ile kaspaz-9 aktive edilmektedir. Daha sonra kaspaz-9, kaspaz-3, -6 ve -7 gibi efektör kaspazları aktive etmektedir. Bu kaspazlar, kaspaz aktivasyonunun proteolitik kaskad çoğalmasını başlatmaktadır (Evan ve Vousden, 2001; Igney ve Krammer, 2002; Kuan ve Kuida, 2003).

2.1.2.2. Dış Ölüm Yolağı

Apoptozun dış ölüm yolak mekanizması hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığı ile başlatılmaktadır (Longley ve Johnston, 2007). Bu ölüm reseptörleri, TNFR gen ailesindedir. TNFR gen ailesi başlatıcı kaspazlar ile etkileşerek hücre ölümüne öncülük eden kaspazları aktive etmektedir. Bu süreçte önce reseptörler, ligandlara bağlanmaktadır. En iyi tanımlanmış ölüm reseptörleri ve ligandları Fas, FasL, TNF-R1,

DR3, DR4 ve DR5'tir. Tümör nekroz faktör (TNF), TNF bağlantılı apoptoz teşvik edici ligand (TRAIL) ve FasL bir üçlü yapı oluşturmaktadır. Bu yapı ölüm reseptörlerini tanıyarak onlara bağlanmaktadır. FasL ve TRAIL bağlanmasından sonra DR4, DR5 ve Fas, DISC eklenmesiyle sonuçlanan değişimlere uğramaktadırlar. DISC ilk olarak Fas-FasL apoptotik sinyalde tanımlanmıştır. DR4, DR5 ve Fas, DD vasıtasıyla Fas-bağlantılı ölüm bölgesini (FADD) çalıştırmaktadır. FADD, ölüm tetikleyici bölgeleri (DED) etkileşimleriyle inaktif olan kaspaz-8'in çalışmasını sağlamaktadır. Önce kaspaz-8, DISC'te aktive olmaktadır. DISC'te kaspaz-8'in artışı, bunların otoproteolitik ayrılmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda aktif enzimden 2 alt ünite ayrılmaktadır. Tip I hücrelerde, kaspaz-8 kesilmekte ve kaspaz-3, -6, -7 aktive edilmektedir.

Tip II hücrelerde de, kaspaz-8 aracılığı ile pro-apoptotik *bcl-2* homologu olan *bid*'in kesimi yapılmaktadır. *bid*'in kesimiyle mitokondriden sitokrom c içeren faktörlerin salınması için *bax* ve *bak* uyarılmaktadır. Böylece mitokondrial apoptoz yolağı tetiklenmektedir (Ricci ve El-Deiry, 2007; Corazza ve diğ., 2009).

2.1.2.3. İç Ölüm Yolağı

Apoptozun iç ölüm yolağı, mitokondri aracılığı ile meydana gelmektedir. Bu sürecin işleminde üç yol etkili olmaktadır. Bunlar;

- 1- Reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretiminde artış olması,
- 2- Pro-apoptotik moleküllerin salınması ve
- 3- ATP üretiminde azalma olmasıdır.

İlk olarak mitokondrial zar potansiyelinin kaybı olmaktadır. Mitokondrial zar potansiyeli kaybolduğu zaman ATP sentezlenememekte ve ROS birikmeye başlamaktadır. Bu da apoptozun oluşmasına katkıda bulunmaktadır.

Mitokondriden apoptotik araçların salınması, iç yolakta kritik rol oynamaktadır. Salınan apoptotik faktörlerden en önemlilerinden birisi sitokrom c dir. Sitokrom c salınması, Apaf-1, pro-kaspaz-9 ve ATP içeren apoptozom denilen kompleksin

meydana gelmesini sağlamaktadır. Apoptozomun oluşumu, kaspaz-9'u aktive etmektedir. Kaspaz-9 aktivasyonunun ardından kaspaz-3 gibi alt takım (down-stream) efektör kaspazlara bağlanmaktadır (Tang ve Kehrer, 2007).

Mitokondrial apoptotik olayların kontrolü ve düzenlenişi *bcl-2* ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler tarafından yapılmaktadır (Frenzel ve diğ., 2009).

2.1.2.4. *bcl-2* Gen Ailesi Tarafından Apoptozun Düzenlenmesi

Mitokondrial geçirgenliğin kontrolü ve büyüme faktörü eksikliği, Ca^{+2} artışı, DNA hasarı gibi stres uyarılarına cevap olarak gerçekleşen iç mitokondrial apoptotik yolağın düzenlenmesi *bcl-2* gen ailesine ait proteinler tarafından yapılmaktadır (Lalier ve diğ., 2007; Frenzel ve diğ., 2009).

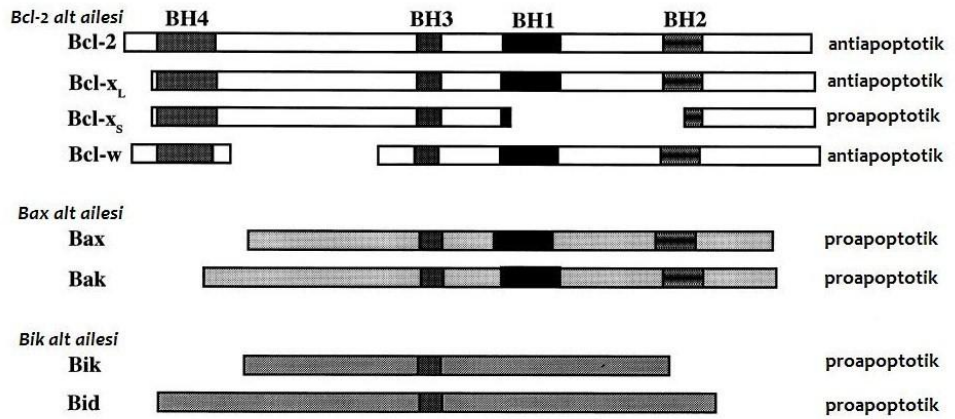
Fonksiyonlarına ve dizi homolojilerine göre *bcl-2* gen ailesi proteinleri, 3 gruba ayrılmaktadır. Grup I üyeleri anti-apoptotik etkiye sahipken, Grup II ve III üyeleri (pro-apoptotik) hücre ölümünü desteklemektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler heterodimerler meydana getirmektedir. Bu durum, *bcl-2* gen ailesi üyelerinin her birinin diğer bir çok farklı üyelerle etkileşim halinde olabilmesinden kaynaklanmaktadır (Tsujimoto, 1998; Hengartner, 2000).

Anti-apoptotik fonksiyona sahip *bcl-2* gen ailesinin üyeleri (*bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-w*, *mcl-1*) 4 *bcl-2* homoloji bölgesinden (BH 1-4) tamamını içermektedir. Pro-apoptotik proteinler ise bu homoloji bölgelerinden üçünü (BH1, BH2 ve BH3) ya da sadece BH3 bölgesini içermektedir. Pro-apoptotik proteinlerden *bax*, *bok* ve *bak* gibi *bax* alt ailesi üyeleri (çoklu-bölge proteinleri) BH1-3 şeklinde homoloji gösterirken, *bid*, *bim*, *bmf*, *Puma*, *Noxa*, *bik* ve *bad* gibi sadece BH3 bölgesini içeren proteinlerin (BOP'lar) alt sınıfındakiler yalnız BH3 şeklinde homoloji dizisini paylaşmaktadırlar (Şekil 2.3) (Lalier ve diğ., 2007; Levine ve diğ., 2008; Marzo ve Naval, 2008; Frenzel ve diğ., 2009; Peng ve diğ., 2009).

BOP'lar, pro-apoptotik etkilerini 2 farklı mekanizmada gerçekleştirmektedirler. *bad* ve *Noxa* gibi bazı BOP'lar, *bcl-2* ve *bcl-xL* ile *bad*, *mcl-1* ile *Noxa* olacak şekilde

anti-apoptotik proteinlerle etkileşmektedirler ve bunları, BH3 ya da çoklu-bölge proteinlerinden ayırarak mitokondrial zar geçirgenliğini değiştirmektedirler. *t-bid* (*bid* proteininin uçlardan kesilmiş şekli) gibi diğer BOP'lar ise, mitokondrial zar geçirgenliğini başlatmak için ya mitokondrial zarlara *bax*'ın geçişini uyararak ya da *bak* üzerine bölgesel etki ederek, çoklu-bölge proteinlerini aktive etmektedirler (Levine ve diğ., 2008).

BOP'lar ve anti-apoptotik proteinler, sağlıklı hücrelerde sitozolde yer alan *bax* ve dış mitokondrial zara birleşik olan *bak* proteinlerinin aktivasyonunu ve bunların mitokondri dış zarında oligomerleşmesini, zıt etki göstererek düzenlemektedirler (Lalier ve diğ., 2007; Levine ve diğ., 2008). Anti-apoptotik proteinler, pro-apoptotik moleküllerin mitokondriye hareket etmelerini engellemektedirler. Ayrıca mitokondride bulunan anti-apoptotik proteinler, apoptozu başlatan olaylardan biri olan mitokondrial zar geçirgenliğine karşı bu organelleri korumaktadırlar. Bunu, BOP'lar tarafından nötralize olana kadar *bax* ve/veya *bak* proteinlerinin aktivasyonunu önleyerek gerçekleştirmektedirler. Mitokondrial dış zar geçirgenliğine öncülük eden olay sitokrom c gibi apoptotik faktörlerin salınmasıdır. Sitokrom c salınması ile apoptozom oluşarak kaspaz kaskad aktivasyonu gerçekleşmektedir. Ölüm reseptörlerinin harekete geçmesi sonucunda *bid* proteininin *t-bid* şekline gelmesiyle kaspaz-8 tarafından mitokondrial apoptoz yolağı başlatılmaktadır. Böylece *bid* iç ve dış ölüm yolağı arasında bir köprü oluşturmaktadır (Tang ve Kehrer, 2007; Levine ve diğ., 2008; Frenzel ve diğ., 2009).



Şekil 2.3: *bcl-2* gen ailesinin homolojisi (Tsujimoto, 1998).

2.2. KANSER TEDAVİSİ

Kanser, uzun zaman süreci içinde mutasyonların etkisiyle hücrel mekanizmalarda genetik materyalin hasarı sonucunda, normal büyüme kontrollerinin ortadan kalkması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Normal dokularda hücre ölümü ve çoğalması arasındaki dengeyi sağlayan homeostatik kontrol mekanizmasının hasar görmesi neticesinde tümör gelişimi gözlenmektedir (Evan ve Vousden, 2001; Sitorus ve diğ., 2009). Tümörler değişken ve heterojendir. Normal dokulardan farklı olarak bölünme yeteneklerine sahiptirler. Tümörlerin, benign ve malign olarak isimlendirilen 2 çeşidi bulunmaktadır (Evan ve Vousden, 2001; Mitchell ve Kumar, 2003).

Benign tümörler, kaynaklandıkları normal hücelere çok benzemekte ve normal hücelere oranla fonksiyonel yeteneğinin daha fazla kalması olarak tanımlanan iyi diferansiye hücelerden meydana gelmektedir. Bu çeşit tümörlerde mutasyon az görülmektedir. Benign tümörlerin çoğu yavaş büyüme özelliğine sahiptirler ve metastaz yetenekleri yoktur.

Malign tümörler ise, iyi diferansiye hücelerden, tamamen diferansiyasyon kaybı olan hüceler arasında değişim gösteren parankim hücre diferansiyasyonu ile tanımlanmaktadır. Genellikle mutasyonlar fazla görülmektedir. Metastaz yapma yeteneğine sahiptirler. Malign tümörler, kanser olarak tanımlanmaktadır (Mitchell ve Kumar, 2003).

Kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler, immunoterapi, gen tedavisi ve alternatif tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntemlerden birisi sitotoksik kemoterapi olarak bilinmektedir. Kemoterapi amaçlı kullanılmakta olan sitotoksik maddeler, bölünme evresindeki bir hücreyi, durağan fazdaki bir hücreye oranla daha fazla etkilemektedir. Bu nedenle sitotoksik etkinin saptanması büyük önem taşımaktadır.

Kemoterapötik ilaçlar etki mekanizmaları ve kimyasal yapılarına göre; anti-bakteriyal, anti-malaryal, anti-helmintik, anti-neoplastik, anti-viral, anti-amibik ve anti-riketziyal ilaçlar olarak sınıflandırılmaktadır. Anti-neoplastik ilaçlar, DNA sentezine etki ederek

hücre siklusunu durduran ya da hücreyi apoptoza götüren sitotoksik kemoterapötikler ile beraber hormon ve hormon antagonistleriyle moleküler hedefe yönelik yöntemleri de kapsamaktadır. Anti-neoplastik ajanlar, DNA'nın yapısını bozarak apoptoza teşvik eden alkilleyici ajanlar; nükleik asit sentezinde rol oynayan yapılara benzer olmaları ile hatalı replikasyona neden olan anti-metabolitler; androjen antagonistleri, aromataz inhibitörleri, kortikosteroid, östrojen antagonisti, çeşitli hormonlar ve hormon antagonistleri; moleküler hedefe yönelik ilaçlar; biyolojik yanıt modülatörleri ve doğal bileşikler olarak gruplandırılmaktadır (Mycek ve diğ.,1998).

2.2.1. Kanser Tedavisinde Apoptozun Rolü

Apoptoza neden olan anti-kanser ilaç fikri 1970'lerin başında ortaya çıkmıştır. Klinikte kullanılan tüm kemoterapötik ilaçların temelinde malign tümörlerde apoptozun uyarılması yatmaktadır (Zhivotovsky ve Orrenius, 2009). Kanser tedavilerinde, tümörlerin yok edilmesinde apoptotik yollara ihtiyaç duyulmaktadır. Geliştirilen bazı ajanlar ile tümör hücrelerinde, apoptoza duyarlılık arttırılmaktadır (O'Connor ve diğ., 2003).

TNF protein ailesi, *bcl-2* gen ailesi proteinleri, kaspazlar ve DNA fragmentasyonu faktörleri gibi çeşitli biyolojik belirteçler apoptozda rol oynamaktadır. Bunlarla yapılan çalışmalar, kimyasallara karşı geliştirilen direnç hakkında önemli bilgi edinilmesini sağlaması açısından önem taşımaktadır (Muñoz-Gámez ve diğ., 2005).

Özel hücre yüzey ölüm reseptörlerine bağlanarak apoptozu tetikleyen TNF protein ailesine üye TRAIL proteinleri anti-kanserojen terapötik yeteneğine sahiptir. TRAIL'in, kanser hücrelerini seçici öldürme yeteneğine sahip, güçlü bir ilaç olabileceği umut edilmektedir. TNF ve FasL gibi toksik etki göstermemektedir. Bu protein, tümörlerde apoptozu uyarırken normal dokular üzerine etki etmemektedir (O'Connor ve diğ., 2003). Ayrıca, ana etkilerini mitokondri stabilizasyonu olarak gösteren *bcl-2* ya da *bcl-xL*'nin aşırı anlatımından kaynaklanan kanser hücrelerinin kemoterapiye dayanıklı olduğu durumlarda bile TRAIL'in apoptozu uyarabildiği düşünülmektedir (Evan ve Vousden, 2001; O'Connor ve diğ., 2003).

Apoptozun engellenmesi ile ilişkili genler ve proteinler, tümör oluşumunda rol oynamaktadırlar. Apoptozu engelleyen *bcl-2* mutasyonları tümör hücrelerinin kemoterapi veya radyoterapiye hassasiyetini etkilemektedir. Ayrıca, bir çok tümörde anti-apoptotik *bcl-2* proteinlerinin miktarı fazladır. Bunlar pro-apoptotik moleküllerle (aktif kaspaz-3 ve -7 gibi) bir arada bulunmaktadır. *bcl-2* gen ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik fonksiyona sahip proteinlerden oluşmaktadır ve bunlar belirli bir dengede bulunmaktadır. *bcl-2*'nin aşırı anlatımı sonucunda hücre gelişimi yavaşlayabilmekte, hücre ölümü gerçekleşebilmekte ve anti-apoptotik fonksiyonlar durdurulabilmektedir (Zhivotovsky ve Orrenius, 2009).

bcl-2 gen ailesine üye *bax*, çeşitli uyarılara cevap olarak apoptozu tetiklemektedir ve bu gende oluşan mutasyonlar, bazı kanserlerde tanımlanmıştır. Kolorektal kanser hücrelerinde *bax*'ın bulunmayışı, çeşitli ilaçlara apoptotik cevabı ortadan kaldırmaktadır (O'Connor ve diğ., 2003).

Apaf-1, kaspaz-9 ve mitokondrial yollar gibi bileşenler onkogenlerin baskılanmasında büyük öneme sahiptir. Örneğin; Melanomda, Apaf-1 sentezleyen gen etkisiz hale gelmiştir ve bu nedenle apoptoz engellenmiştir (Chang ve Yang, 2000; Ma ve diğ., 2005).

Yapılan son çalışmalarda *bcl-2* ve *bcl-xL* nin anti-apoptotik rollerinin, kaspazların katalitik aktiviteleri üzerinden gerçekleştirildiği ortaya konulmuştur. Örneğin; kaspaz-3 ve -7'nin üzerine negatif düzenleyici olarak etki edip apoptozu engellemektedirler (Cohen, 1997).

Kaspaz-8, FasL aracılığı ile apoptozu başlatabilir fakat FasL, ultraviyole (UV) gibi dış streslere gereksinim duymaktadır (Chang ve Yang, 2000).

Onkogenlerin, tümör baskılayıcıların ve apoptotik düzenleyicilerin anlaşılması ile kanser tedavisinin etkileri artmaktadır. Apoptoz mekanizmasının çözülmesi ile kansere karşı tedavi yöntemleri geliştirmede, etkin sitotoksik ajanların sentezinde ve radyasyon tedavisinde avantajlar sağlanacaktır. Tedavi, tümörler üzerine uygulanacak moleküler parmak izi ile daha başarılı hale gelecektir (Öktem ve diğ., 2001).

2.2.2. Bitkilerin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Bitki alemi yaklaşık 400 000 bitki türü içermektedir. Uzun yıllardan beri çeşitli hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkiler önemli rol oynamaktadır. Doğal ürünleri içeren bitkiler ile yapılan çalışmalar, yeni ve daha etkili anti-kanser ajanların bulunmasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Tıbbi bitkilerin kullanımında son yıllarda artış görülmektedir. Amerika’da kullanılan kanser ilaçlarının %62’si doğal maddelerden ya da doğal maddeler türevlendirilerek yapılmıştır (Bungu ve diğ., 2006; Pırıldar, 2006; Karagöz ve diğ., 2007).

Çeşitli bitkilerden hazırlanan ekstraların anti-kanserojen etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Örneğin; *Tulbaghia violacea* (yabani sarımsak), özofagus kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla beraber HeLa hücrelerinde kaspaz-3 bağımlı apoptotik yolağı teşvik etmektedir. Ayrıca, bu tez çalışmasında kullandığımız *Colchicum* türlerinin de kolşisinin dahil olduğu çeşitli alkaloidleri içermesi nedeni ile tedavi amacıyla kullanımı yaygındır. Hodgkin lenfoma ve kronik lenfoit lösemi vs. hastalıkların tedavisinde olumlu etkilediği bildirilmiştir (Bungu ve diğ., 2006; Pırıldar, 2006).

2.3. *Colchicum* BİTKİSİNİN ÖZELLİKLERİ

Colchicaceae (*Liliaceae*) familyasına ait *Colchicum* cinsi ilk olarak Dioscorides tarafından tanımlanmış ve “kolchicon” ismi verilmiştir. Daha sonra bu isim Linne tarafından “*Colchicum*” olarak değiştirilmiştir.

Hermodactyl, Sürinjan ile aynı anlamı taşıyan *Colchicum* kelimesi Doğu Karadeniz, Kafkasya, Batum Yöresi anlamına gelen “Colchis”den türemiştir (Pırıldar, 2006).

Colchicum bitkisinin M.S. 6. y.y.’den itibaren modern tedavide kullanımı, Anton Stoerck’in *Colchicum autumnale* türünden elde ettiği ekstreyi gut tedavisinde kullanması ile başlamıştır (Dumontet ve Sikic, 1999; Pırıldar, 2006).

1820’de Pelletier ve Caventou, “Kolşisin”i izole etmişlerdir. Ana halkası benzosikloheptanotropenol olan alkaloit yapıdaki kolşisinin, bitki ve hayvanlarda hücre

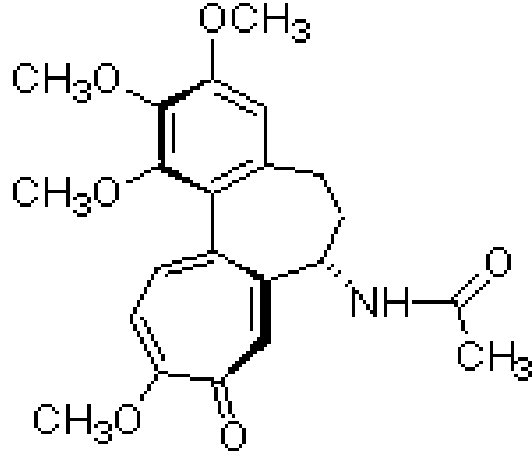
bölünmesi üzerine etkisi olduğu ise Eigsti ve Dustin tarafından bulunmuştur (Pırıldar, 2006). Mikrotübül toplanmasını engelleyen anti-mitotik bir ajan olan Kolşisin, metafazda hücre bölünmesini engelleme yeteneğine sahip olması nedeni ile anti-tümöral ve anti-kanserojen etki göstermektedir. Ayrıca anti-enflamatuvar etkisi de bulunmaktadır (Combeau ve diğ., 2000; Dumontet ve Sikic, 1999; Pırıldar, 2006).

Ülkemizde 41 *Colchicum* türü (15'i endemik) bulunmaktadır ve bunların bir çoğu, tedavide kullanılan tropolon alkaloidlerinin en önemli kaynağı olan güz çiğdemine (*Colchicum autumnale*) yakın miktarda tropolon alkaloidleri içermektedir (Pırıldar, 2006). Çalışmada kullandığımız ekstreler de *Colchicum umbrosum* S. ve ülkemize endemik olan *Colchicum baytopiorum* C.D. türlerinden hazırlanmıştır.

2.3.1. Kolşisinin Kimyasal Yapısı

1945 yılında Dewar tarafından mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül dengesini bozan ajanlardan olan kolşisinin yapısı belirlenmiştir (Jordan ve Wilson, 2004; Pırıldar, 2006). Kapalı formülü “N-5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo (a) heptalen-7-il-(S)-asetamid”tir. Kolşisinin A halkası ve 5, 6, 7 ve 12 nolu karbon atomu fenil alanin ve sinnamik asitten oluşmuştur. Asetamido grubu asetik asitten, tropolon halkası ise tirozinden türevlenmiştir (Pırıldar, 2006).

Kolşisinin yapısal formülü Şekil 2.4’te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Kolşisinin kimyasal yapısı (Anonim-b, 2009).

2.3.2. Kolşisinin Etki Mekanizması

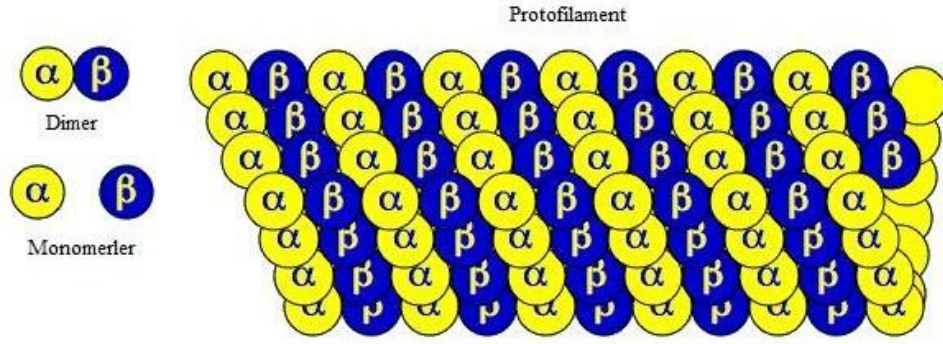
Mikrofilamentlerin en önemli ögesi olan mikrotübüller, ip gibi ince uzun ve tüp şeklinde protein polimerlerinden oluşmaktadır. Bunlar, hücre bölünmesi sırasında kromozom çiftlerinin eşit şekilde paylaşılmasından sorumlu olan mitotik iğın oluşmasında ve kaybolmasında gereklidir (Jordan ve Wilson, 2004; Arora ve diğ., 2009). Ayrıca, mikrotübüller gelişimde, hücre şeklinin oluşumunda, vesiküllerin taşınmasında, hücre hareketlerinde ve sinyalizasyonunda, hücre şeklinin korunmasında rol oynamaktadırlar (Combeau ve diğ., 2000; Jordan ve Wilson, 2004).

Mikrotübüller 100 000 dalton ağırlığında, α - ve β - tübülün peptid dimerlerinin polimerleridir (Şekil 2.5) (Bhalla, 2003; Jordan ve Wilson, 2004). α - ve β - tübülün dimer polimerizasyonu (-) uçtan (+) uca doğru hızlıca meydana gelmektedir (Şekil 2.5). Bu polarite, mikrotübülün büyümesi sırasında oluşmaktadır. Mikrotübülün (+) ucu, kimyasal enerjiyi mekanik iş biçimine dönüştürmektedir. Mikrotübül hareketi için gerekli olan enerji guanozin trifosfatın (GTP) hidrolizi ile sağlanmaktadır. GTP hidrolizini α - tübülün başlatmaktadır. Mikrotübül uçlarının yapısı ve bunların hareketlerinin kontrolü, mitoz esnasında mitotik iğın yapımı ve fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (Bhalla, 2003).

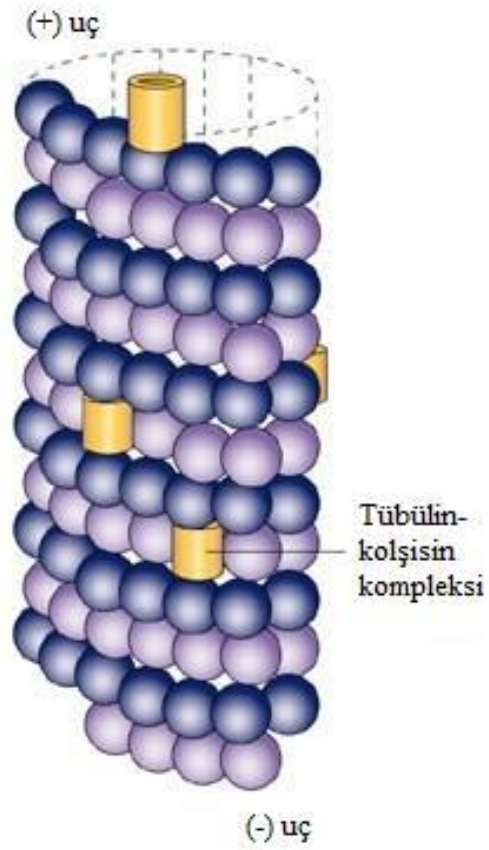
Ökaryotik hücrelerin mikrotübül sistemi, mitoz ve hücre bölünmesinde önemli olması nedeni ile anti-kanser terapötik ajanların geliştirilmesinde hedef olarak kullanılmaktadır (Jordan ve Wilson, 2004; Arora ve diğ., 2009). Bu anti-mitotik ajanlar, mikrotübül oluşumunu engelleyen (vinka alkaloidleri, kolşisin vs.) ve teşvik eden (taksoidler ve epotilon) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kolşisin mikrotübül oluşumunu engelleyen anti-mitotik bir ajan olmasına rağmen, çok toksik olması nedeni ile onkolojide kullanılmamaktadır (Combeau ve diğ., 2000). Fakat bazı türevleri anti-tümöral olarak kullanılabilir. Örneğin, kronik miyeloid lösemi, deri kanseri ve malign lenfoma tedavisinde kolşisin türevlerinden biri olan demekolsin kullanılmaktadır. Ayrıca kolşisin türevlerinden N-deasetilkolşisin ve trimetil kolşisinik asit de kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Kolşisin bazı durumlarda kanser tedavisinde etkili olabilmektedir. Gutlu hastalarda kanser tedavisi için radyoterapi ile beraber kolşisin de verilmiştir ve olumlu etki gözlenmiştir. Meme kanseri olan hastalarda radyoterapi ve cerrahi girişim uygulanmıştır. Ardından kolşisin uygulaması yapılmıştır ve kolşisin almamış olan hastalara oranla daha iyi durumda oldukları izlenmiştir (Pırıldar, 2006).

Tübülünde GTPaz aktivitesini başlatan kolşisin, mikrotübül hareketini etkilemeden önce mikrotübüller üzerine olan etkisini, ilk olarak çözünebilir tübüline bağlanarak göstermektedir (Combeau ve diğ., 2000; Dumontet ve Sikic, 1999). Çözünebilir tübüline bağlanmanın ardından tübülünde değişimler başlamaktadır. Daha sonra tübül-kolşisin kompleksi oluşmaktadır ve mikrotübül yapısının içinde kopolimerize olmaktadır (Şekil 2.6). Böylece mikrotübül hareketliliğini baskılamaktadır. Mikrotübül hareketinin kararlılığı, duyarlı tümör hücrelerinde ve mitozda hücre siklusunu engellenmesi ile ilişkilidir. Bunun sonucunda apoptoz ile hücre ölümü gerçekleşmektedir (Jordan ve Wilson, 2004).

Kolşisin uygulaması yapılması sonucunda nöronal hücre ölümünün apoptoz yolu ile gerçekleştiği bulunmuştur (Gorman ve diğ., 1999).



Şekil 2.5: Mikrotübül yapısı (Anonim-c, 2010).



Şekil 2.6: Kolşisinin mikrotübüllere bağlanması (Jordan ve Wilson, 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Antalya-Termessos bölgesinden 05.07.2005 (ISTE: 81438) tarihinde toplanan *Colchicum baytopiorum* C.D. ve Bolu-Abant bölgesinden 25.06.2008 (ISTE:85333) tarihinde Bolu-Abant yöresinden toplanan *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinin yumru kısımları ayrılarak dilimlendi (Şekil 3.1-2). Daha sonra 60 °C'lik etüvde kurutularak toz haline getirilen bitkisel materyaller saf metanol ile perkole edildi. Elde edilen metanol ekstreleri, rotavaporda 30-35 °C'de yoğunlaştırıldı ve liyofilize edildi. Bu bitkilere ait ekstreler, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan liyofilize edilmiş şekilde temin edildi. *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden hazırlanan ekstreler farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, çalışmada kullanılan tümöral hücre soyu üzerine uygulandı.



Şekil 3.1: : *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisi (A: Genel Görünüm, Fotoğraf: O. Dinç Düşen, 2004, B: Çiçek ve Yumrular, Fotoğraf: N. Sütülpınar, 2005).



Şekil 3.2: : *Colchicum umbrosum* S. bitkisi (A: Genel Görünüm, Anonim-d, 2010, B: Yumru, Fotoğraf: N. Sütülpınar, 2005).

3.1. HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KULLANILAN BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

Minimum Essential Medium (DMEM, Sigma) distile suda çözündürülerek içerisine 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulagay) ile 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer) eklendikten sonra 0,22 µm olan steril filtreden (Millipore) geçirildi. Hazırlanmış olan stok besiyeri, +4 °C’de saklandı.

3.2. HeLa HÜCRE SOYU

Deneyleerde kullanılan tümöral hücre soyu , laboratuvarımıza Tokyo Teknoloji Enstitüsü tarafından temin edilmiş olan insan serviks karsinoması kökenli HeLa hücreleridir. Bu hücre kültürleri için kullanılmış olan DMEM’e %10 Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco Lab.) eklendi ve pH’sı %4,4 lük NaHCO₃ ile 7,2’ye ayarlandı. HeLa hücreleri 25 cm²’lik steril kültür kaplarında, %5 CO₂ ve %95 hava karışımında 37 °C’de haftada iki kez düzenli pasajları yapılarak inkübe edildi.

3.3. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMLERİ

HeLa hücreleri yetiştirilmiş oldukları kültür kaplarında tek tabaka haline geldiklerinde pasaj işlemi yapıldı. Hücreler, Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) ile yıkanarak buldukları yüzeyden kaldırılmaları amacı ile 6 ml %0,25'lik tripsin ile 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra süspansiyon edilen hücreler, santrifüj tüpüne alındı ve tripsinin inaktive edilmesi amacı ile üzerine 2 ml besiyeri ilave edildi. 500 xg'de 3 dakika santrifüj edilerek pasajı yapılacak olan hücrelerin çökmesi sağlandı. Bu işlemden sonra çökelmiş olan hücrelerin üzerindeki süpernatant kısım uzaklaştırılarak kuyucuk başına deney planına uygun şekilde hücre sayıları hesaplanıp sulandırma yapılarak ekim işlemi gerçekleştirildi (Freshney, 2000).

3.4. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMLERİ

Hücrelerin ekim işlemleri, sitotoksikite deneyi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 150 000 hücre/ml; AI belirlenmesi için 24 kuyucuklu kültür kaplarına 150 000 hücre/ml (lamelli ve lamelsiz); moleküler analiz için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 150 000 hücre/ml olacak şekilde yapıldı. Hücrelerin ekim işlemlerinin gerçekleştirilmesinin ardından pH 7,2'de, %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde 37 °C'de, 24 saat bekletilerek inkübasyon gerçekleştirildi.

3.5. *Colchicum baytopiorum* C.D. VE *Colchicum umbrosum* S. BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Deneilerde kullanılan *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinin yumrularından hazırlanmış olan ekstraların konsantrasyonları, daha önce yapılmış olan çalışmalar referans alınarak belirlendi (Pırıldar, 2006; Karagöz ve diğ., 2007). Kurutulmuş olarak temin edilen ekstralar serumsuz DMEM'de çözündürülerek, steril filtreden geçirildi ve stok solüsyon elde edildi. Hazırlanmış olan stok solüsyon %10 FBS içeren steril DMEM ile sulandırılarak her iki tür ekstresi için de 5 farklı konsantrasyon (1: 0.001, 2: 0.05, 3: 0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) hazırlandı. *Colchicum baytopiorum* C.D. için konsantrasyonlar sırasıyla B1, B2, B3, B4 ve B5, *Colchicum umbrosum* S. için U1, U2, U3, U4 ve U5 olarak sınıflandırıldı.

3.6. *Colchicum baytopiorum* C.D. VE *Colchicum umbrosum* S. BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN UYGULANMASI

Kültür kaplarına ekimi yapılmış olan hücrelerin 24 saatlik inkübasyonunun ardından, hazırlanan 5 farklı konsantrasyondaki ekstreler hücrelere uygulandı. Kontrol grubunda ekstre içermeyen DMEM kullanıldı.

Her bir ekstre için 5 farklı konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi olmak üzere 3 farklı deney grubu oluşturuldu. Bu sürelerin sonunda besiyeri uzaklaştırılarak belirlenen parametreler doğrultusunda analizler gerçekleştirildi.

3.7. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

3.7.1. Sitotoksik Aktivite Tayini: Kolorimetrik MTT Yöntemi

Kullanılan *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin 5 farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda HeLa hücrelerinde meydana gelen sitotoksik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlendi.

96 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelerin üzerindeki besiyeri, belirlenen deney süreleri sonunda uzaklaştırıldı. Kültür kaplarındaki bütün kuyucuklara 40 µl MTT eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde ışık almayacak şekilde inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuğa 160 µl Dimetil Sulfoksit (DMSO) eklenerek çalkalayıcı etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan formazan kristallerinin 1 saatlik inkübasyon süresinde çözünmesinin ardından oluşturulan deney gruplarının absorbans değerleri, 690 nm dalga boyu referans alınarak 570 nm'de spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirildi (µQuant, Bio-Tek Instruments INC.) (Mossman, 1983).

3.7.2. Apoptotik İndeks

AI preparatları için hazırlanacak olan lamalar etanol:HCl (1:1 v/v) karışımında 24 saat boyunca +4 °C'de bekletildi. Daha sonra etanol:HCl karışımının uzaklaştırılması amacıyla 24 saat akarsu altında bırakıldı. Bu sürenin bitiminde distile su içerisine alınan lamalar +4 °C'de preparat yapımı için bekletildi.

Hücreler, *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulanma süreleri sonunda, tripsin ile muamele edildi. Yüzeiden kaldırılan hücreler steril santrifüj tüplerine alınarak 500 xg hızda 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatantın uzaklaştırılmasının ardından metanol:FTS (1:1 v/v) ile hücrelerin fiksasyonları yapıldı ve 500 xg hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1 ml metanol eklenerek pipetaj yapıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonlarından 200 µl alınarak, daha önceden temizlenmiş olan lamaların üzerine tüm yüzeyi kaplayacak şekilde ekim yapıldı ve lamalar kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar DAPI ile boyandı. 20 dakika boyunca ışık görmeyen bir ortamda, boyama kabında DAPI'de bekletilen preparatlar daha sonra 20 dakika fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde tutularak yıkandı. Yıkama işlemleri tamamlanmış olan preparatlarda floresan mikroskopta 364 eksitasyon 454 nm emisyon (λ_{ex} 364 nm; λ_{em} 454 nm) dalga boyunda normal nukleuslu ve apoptotik nukleuslu hücrelerin sayımı yapıldı. Her deney grubu için en az 30 alanda yaklaşık 100 hücre olacak şekilde sayımı gerçekleştirilen hücrelerin her bir alandaki apoptotik hücrelerin toplam hücrelere olan yüzde oranları hesaplandı (İlgar ve Özcan Arıcan, 2009). Tüm deney grupları için sayılan 30 alana ait yüzdelerin ortalamaları alınarak AI belirlendi.

3.8. APOPTOZUN İNCELENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

3.8.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

3.8.1.1. Faz-Kontrast Mikroskopu

Colchicum baytopiorum C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin, belirlenen farklı konsantrasyonlarının uygulanmış olduğu HeLa hücrelerinde meydana gelen değişimler 24, 48 ve 72 saat deney sürelerinin sonunda x20'lik

objektifte faz-kontrast mikroskobu ile incelendi. Deney gruplarındaki hücrelerde apoptoza özgü oluşan morfolojik değişimler ve genel sitotoksosite belirlendi.

3.8.1.2. Işık Mikroskobu

HeLa hücrelerinin, apoptoz sırasında meydana gelen morfolojik değişimlerini gözlemlemek amacı ile 24, 48 ve 72 saat deney sürelerinde hazırlanan preparatlara Giemsa boyama yapıldı ve Feulgen metodu uygulandı.

Belirlenen süreler ve konsantrasyonlar doğrultusunda hazırlanmış olan deney gruplarının preparatları Carnoy fiksatif ile fikse edildi. Daha sonra fiksasyonu yapılan preparatlara, Giemsa boyama yapıldı. Preparatlar 8 dakika Giemsa'da bekletildi. Bu sürenin sonunda saf su ile boya uzaklaştırılarak preparatlar kurumaya bırakıldı. Boyanmış olan preparatlar, hücrelerde meydana gelen apoptoza özgü olan morfolojik değişimleri saptamak için ışık mikroskobunda x100'lük objektif altında incelendi. Ayrıca apoptotik hücre morfolojisinin gösterilmesi için Feulgen metodu ile boyanmış olan preparatlar da x100'lük objektifte ışık mikroskobunda gözlemlendi.

3.8.1.3. Floresan Mikroskop

24 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi yapılan hücrelere, belirlenen konsantrasyonlarda *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin uygulanmasının ardından belirlenen süreler sonunda toplanan hücrelerin metanol:FTS (1:1 v/v) ile fiksasyonu yapıldı.

Etanol:HCl (1:1 v/v) karışımı ile temizlenmesinin ardından +4 °C de, saf suda bekletilen lamalar, kurumaya bırakılmadan ıslak şekilde alınarak üzerine fikse edilmiş hücrelerden 100 µl konarak preparat yapıldı. Hazırlanan preparatlar kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Ekstre uygulanmış hücrelerde meydana gelen nuklear morfolojik değişimlerin saptanması için DAPI kullanıldı. Belirlenen süre boyunca DAPI'de bekletilen hücreler PBS ile yıkandı. PBS içerinden alınan lamalar floresan mikroskopta (λ_{ex} 364 nm; λ_{em} 454 nm) incelendi. Normal ve apoptotik nukleus içeren hücreler belirlendi (İlgar ve Özcan Arıcan, 2009).

3.8.2. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

3.8.2.1. Total RNA İzolasyonu

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin 0,1 mg/ml (B3) konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerin, 48 saat süre sonunda total RNA izolasyon kiti (PureLink Micro-to-Midi Total RNA Isolation Kit Invitrogen, Kat. No. 12183-018) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA'lar, *bcl-2* gen ailesine üye pro-apoptotik (*bax*, *bak*, *bid*) ve anti-apoptotik (*bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1*, *bfl-1*) olmak üzere 7 genin anlatımlarının belirlenmesi için Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yönteminde kullanıldı. Her bir deney grubu için 12 kuyucuklu kültür kaplarına 150 000 hücre/ml olacak şekilde kuyucuk başına toplam 2 ml ekim yapıldı. Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstre uygulanmış olan deney gruplarındaki hücreler, 48 saat deney süresinin ardından tripsin ile kaldırılarak steril santrifüj tüplerine alındı. 500 xg hızda 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. 0,3 ml RNA lizis solüsyonu pellet üzerine konuldu. Pellet tamamen dağılana kadar yüksek hızda vorteksenerek homojenizasyon gerçekleştirildi. Her bir tüpe 0,3 ml %70'lik etanol (1:1 v/v) konularak vorteks edildi. Toplama tüplerinin içerisine yerleştirilmiş olan RNA dönüş kartuşlarının üzerlerine hazırlanan hücre süspansiyonları eklendi. Oda sıcaklığında 12000 xg'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüplerinde bulunan kısım uzaklaştırılarak kartuş toplama tüplerine tekrar konuldu. Dönüş kartuş üzerine 700 µl Yıkama Tamponu I eklendi. 12000 xg'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve tekrar 700 µl Yıkama tamponu I eklendi ve bu aşama tekrar edildi. Dönüş kartuş, toplama tüpünden alınarak yıkama tüpü içerisine konuldu. Dönüş kartuş üzerine 500 µl etanol ile hazırlanmış olan Yıkama Tamponu II eklendi ve 12000 xg'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Yıkama tüpüne akan kısım uzaklaştırıldı. Dönüş kartuş yıkama tüpüne geri alındı ve bu aşama tekrarlandı. Membranın kuruması için dönüş kartuş 12000 xg'de 5 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı ile birlikte toplama tüpü atıldı. Dönüş kartuş, RNA toplama tüpünün içerisine yerleştirildi. Membrandaki RNA'nın yıkanması için 100 µl RNaz içermeyen su, dönüş kartuşa eklendi ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 1 dakikalık inkübasyon süresinin ardından dönüş kartuş alınarak 12000 xg'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Dönüş kartuş, toplama tüpünün içerisinden çıkartılarak

uzaklaştırıldı. Toplama tüpündeki total RNA örneklerinin miktarını belirlemek için 200 kez sulandırılmış total RNA'ların spektrofotometrede (Cintra 20, GBC) 260 nm dalga boyunda ölçümleri yapıldı (Bargou ve diğ., 1996, Benito ve diğ., 1996).

$$\text{RNA Miktarı } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{Absorbans değeri } (\text{OD}_{260}) \times \text{sulandırma miktarı} \times 40$$

formülü kullanılarak, izole edilen total RNA'ların yoğunlukları hesaplandı.

3.8.2.2. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi

Her deney grubu ve apoptozun belirlenmesinde rol oynayan *bcl-2* gen ailesi için her bir PCR tüpünün içerisine 21 μl RNaz içermeyen su eklendi. Bu karışımın üzerine tek basamaklı RT-PCR kitinin (The SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit Invitrogen, Kat. No. 10928-042) içerisinden çıkan 2x Reaksiyon karışımından (her dNTP'den 0.4 mM MSO_4) 25 μl , RT/Platinum™ Taq Mix'ten de 2 μl konuldu. Daha sonra tüpe, 1 μl *bcl-2* gen ailesine üye (*mcl-1*, *bfl-1*, *bcl-2*, *bcl-x*, *bax*, *bik* ve *bak*) primerler (ApoPrimer Set; [Bcl-2 family], TAKARA, Kat. No. 6623) ve daha önceden izole edilen her bir deney grubuna ait total RNA'dan 1'er μl ilave edildi. Eklenen tüm elemanların karışması için PCR tüpleri 15 saniye santrifüj edildi (Bargou ve diğ., 1996, Benito ve diğ., 1996).

Örnekler, Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde programlanarak PCR cihazına (TC412, Techne) yerleştirildi. Program bitiminde PCR ürünlerini içeren tüpler cihazdan alınarak etidyum bromid içeren agaroz jelde yürütüldü ve UVışık altında gözlemlendi.

Tablo 3.1: RT-PCR için hazırlanan PCR cihazı program tablosu.

cDNA Sentezi ve Ön Denatürasyon	PCR Amplifikasyonu	Son Uzatma
1 döngü	40 döngü:	1 döngü
55°C'de 30 dakika	Denatürasyon- 94°C'de 15 saniye	68°C'de 5 dakika
94°C'de 2 dakika	Bağlanma- 60°C'de 30 saniye	
	Uzatma- 68°C'de 1 dakika	

3.8.3. Biyokimyasal Yöntemler

3.8.3.1. DNA izolasyonu

Apoptoza özgül olan nükleozomal fragmentasyonu gözlemek amacıyla *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstre kullanılarak hazırlanan B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki ve kontrol grubundaki hücrelerden, genomik DNA içeren ve içermeyen nükleozomal DNA izole edildi. Bunun için DNA izolasyon kiti (*Apoptotic-LADDER*TM Kit G-Biosciences, Kat. No. 786-209) kullanıldı. 48 saat deney süresi sonunda deney ve kontrol grubuna ait yaklaşık 2 500 000 hücre tripsin ile yüzeyden kaldırıldı. Daha sonra bu hücreler santrifüj tüplerine alınarak 500 xg hızda 5 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin üzerindeki DMEM ve tripsin içeren supernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml PBS pelletin üzerine eklenerek pipetaj yapıldı. Hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Hücrelerin çökmesi için 15000 xg hızda 15 saniye santrifüj yapıldı. Pellet üzerindeki supernatant döküldü. Çökeltinin üzerine 150 µl nükleozomal tampon eklenip pipetajla homojenize edildi. Genomik DNA içeren nükleozomal DNA elde etmek için 50 µl DNA açıcı tampon ve 10 µl proteinaz K (*Longlife*TM Proteinaz K) eklendi. Tüp birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı. Ardından 55 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. 150 µl çöktürme tamponu eklenerek 15000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine 500 µl etanol eklenerek -20 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 15000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılarak 35 °C'de inkübasyona bırakılarak örneğin kuruması sağlandı. Örneğin kurumasının ardından çökelti üzerine 30 µl TE tamponu eklenerek homojenize edildi. DNA örneği hidrate olduktan sonra agaroz jele yüklenerek gözlemi yapıldı. Genomik DNA içermeyen nükleozomal DNA elde etmek için ise genomik DNA içeren nükleozomal DNA izole edilirken yapılan basamaklar, 50 µl DNA açıcı tamponun eklendiği kısma gelene kadar aynı şekilde yapıldı. En son 150 µl nükleozomal tamponun eklenmesinin ardından örnek +4 °C'de 15000 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atılmayarak başka bir steril ependorf içinde toplandı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Tüpün içerisine toplanmış olan supernatantın üzerine 30 µl DNA açıcı tampon ile birlikte 10 µl proteinaz K (*Longlife*TM Proteinaz K) konuldu. 55 °C'deki su banyosuna konularak 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde alınan tüplerin içerisine 150 µl çökeltme tamponu ilave edildi ve 15000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant steril bir ependorf içerisine

alınarak üzerine 500 µl saf etanol eklendi. Karışım 1 saat süresince -20 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ependorf 15000 xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant uzaklaştırıldı. Etanolün uzaklaştırılması amacıyla kısa süreli olmak üzere tekrar santrifüj edildi. 35°C'ye ayarlanmış olan inkübatörde kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelletin çözünmesi için 30 µl TE tamponu eklenip 15 dakika 35 °C'de bekletildi. Hücrelerden kazanılmış DNA içeriği, agaroz jelde yürütülerek incelendi (Özcan Arıcan ve diğ., 2008).

3.8.3.2. Agaroz Jel Elektrofrez Yöntemi

DNA için %1.8'lik agaroz jel kullanıldı. Bu amaçla 1,35 gr agaroz ve 75 ml 1x TAE (Tris-Askorbik Asit-EDTA) tamponu karıştırıldı ve mikrodalga fırında ısıtıldı. 60 °C'ye soğuduktan sonra jele etidyum bromür eklendi (jel hacminin %0.01'i kadar) ve hava kabarcığı olmayacak şekilde jel kasetine dökülerek polimerize olması beklendi. Jel donduktan sonra elektroforez tankına alınarak üzerine jeli geçecek miktarda 1x TAE tamponu eklendi. Her bir DNA'dan 10'ar µl alındı. Üzerlerine 6x boyama tamponundan 4'er µl eklenerek pipetaj yapıldı ve jel kuyucuklarına yüklendi. Oluşan bantların boyutlarının belirlenmesi için 1,5 kb'lık DNA belirteci kullanıldı. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra voltajı 90 V'a ayarlanmış olan güç kaynağına elektroforez tankı bağlanarak 40 dakika bekletildi. Bantların açılmasının ardından UV ışığı altında jelde yürüme boyutları incelendi.

İzole edilmiş olan RT-PCR ürünleri de agaroz jel elektroforezinde gösterildi. RT-PCR ürünleri için ise %2'lik agaroz jel hazırlandı. 2 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 1x TAE tamponu eklendi. Bu aşamadan sonra, DNA örnekleri için kullanılan agaroz jelin hazırlanmasında ve örneklerin yüklenmesinde yapılan işlemlerin aynısı uygulandı. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankı, güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağının voltajı 75 V'a ayarlandı ve 1 saatin sonunda jel tanktan çıkartılarak UV transillüminatörde jelin görüntülenmesi yapıldı.

3.8.4. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm deney gruplarında uygulanan doz ve zamana göre saptanan çoğalma hızı, AI ve kaspaz aktivasyon analizi değerleri kontrole ve birbirlerine göre değerlendirildi. Bu amaçla tüm deney gruplarından saptanan değerlere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrole göre anlamlılıkları DUNNETT'S testi ile, grupların birbirleri ile olan anlamlılıkları ise t-testi ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlılık seviyesi temel alındı (GraphPad Prism version 4.00, GraphPad Software, San Diego California USA).

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE KİNETİĞİ PARAMETRELERİ

4.1.1. Sitotoksik Aktivite Tayini: Kolorimetrik MTT Yöntemi

24, 48 ve 72 saat deney süreleri boyunca HeLa hücre kültürlerine uygulanan *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin 0.001, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış 5 farklı konsantrasyonunun sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney grupları ile kontrol grubunun ortalama absorbans değerleri ölçüldü. Bu değerlendirmenin ardından yapılan istatistiksel analizlerde tüm deney gruplarının kontrole göre anlamlılığına bakıldı.

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin 24 saat süresince uygulanan deney gruplarının absorbans değerleri sırası ile B1 için $188,7 \times 10^{-3}$, B2 için $198,6 \times 10^{-3}$, B3 için $156,4 \times 10^{-3}$, B4 için $200,8 \times 10^{-3}$, B5 için $205,6 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarının absorbans değerleri sırası ile U1 için $270,2 \times 10^{-3}$, U2 için $187,9 \times 10^{-3}$, U3 için $218,6 \times 10^{-3}$, U4 için $139,9 \times 10^{-3}$ ve U5 için $205,6 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.1). Ardından yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu ile *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin uygulandığı tüm deney grupları arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$). *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin U2, U3, U4 ve U5 konsantrasyonlarının uygulandığı deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 4.1).

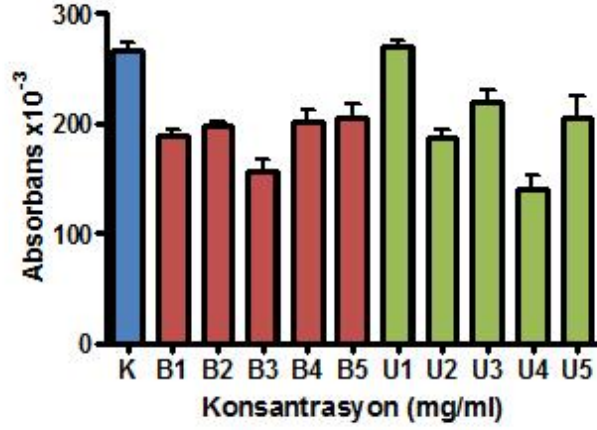
Tablo 4.1: Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S.bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 24 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)
Kontrol	266,4 x 10 ⁻³
B1	188,7 x 10 ^{-3*}
B2	198,6 x 10 ^{-3**}
B3	156,4 x 10 ^{-3**}
B4	200,8 x 10 ^{-3**}
B5	205,6 x 10 ^{-3**}
U1	270,2 x 10 ⁻³
U2	187,9 x 10 ^{-3**}
U3	218,6 x 10 ^{-3*}
U4	139,9 x 10 ^{-3**}
U5	205,6 x 10 ^{-3**}

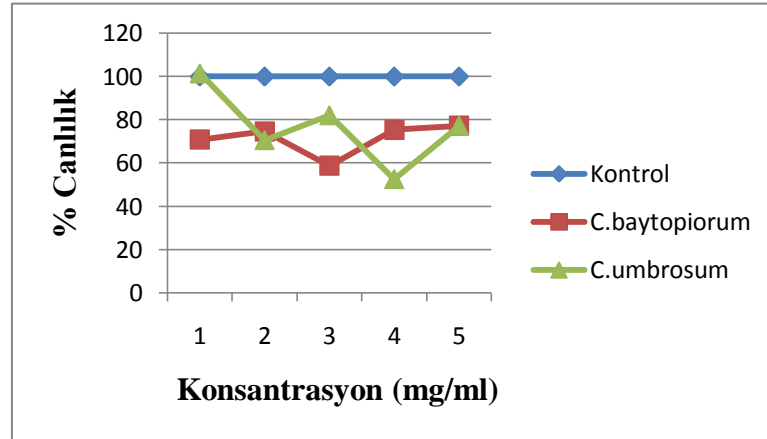
p < 0,05 : * (kontrole göre anlamlılık)

p < 0,01 : **

24 saat deney süresinin sonunda sitotoksik aktivite değerleri Şekil 4.1’de gösterildiği gibi saptanan deney gruplarının % canlılık değerleri, kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplandı ve her bir deney grubu buna göre oranlandı. *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin uygulandığı deney gruplarının % canlılık değerleri sırası ile B1 için %70, B2 için %74, B3 için %58, B4 için %73, B5 için %77 olarak tespit edildi. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarında % canlılık değerleri ise sırası ile U1 için % 101, U2 için %70, U3 için %82, U4 için %52 ve U5 için %77 olarak belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 : *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.



Şekil 4.2 : *Colchicum baytopiorum* C.D ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3: 0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin 48 saat süresince uygulanan deney gruplarının absorbans değerleri sırası ile B1 için $87,4 \times 10^{-3}$, B2 için $72,1 \times 10^{-3}$, B3 için $62,8 \times 10^{-3}$, B4 için $79,8 \times 10^{-3}$, B5 için $61,8 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarının absorbans değerleri sırası ile U1 için $302,8 \times 10^{-3}$, U2 için $86,9 \times 10^{-3}$,

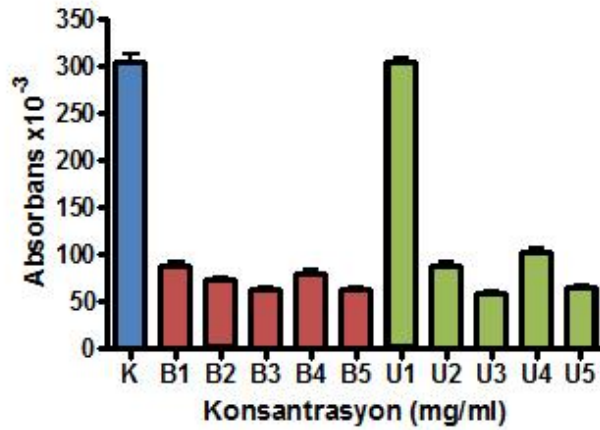
U3 için $58,1 \times 10^{-3}$, U4 için $101,4 \times 10^{-3}$ ve U5 için $64,6 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.2). Ardından yapılan istatistiksel analizlerde *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı U1 deney grubu hariç diğer tüm deney grupları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 : Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 48 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.

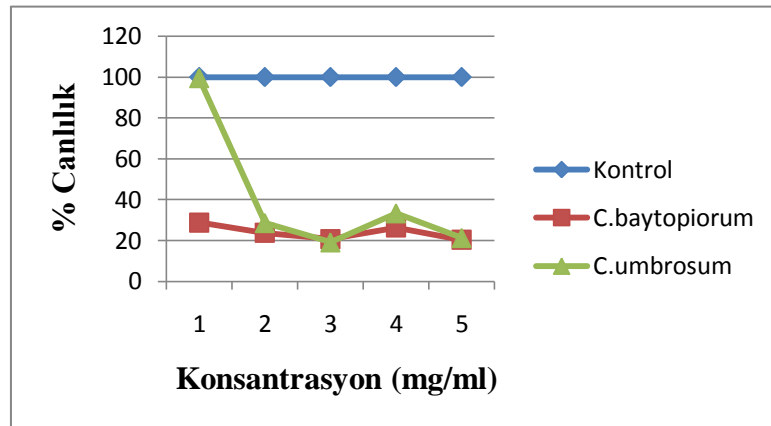
Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)
Kontrol	$304,2 \times 10^{-3}$
B1	$87,4 \times 10^{-3**}$
B2	$72,1 \times 10^{-3**}$
B3	$62,8 \times 10^{-3**}$
B4	$79,8 \times 10^{-3**}$
B5	$61,8 \times 10^{-3**}$
U1	$302,8 \times 10^{-3}$
U2	$86,9 \times 10^{-3**}$
U3	$58,1 \times 10^{-3**}$
U4	$101,4 \times 10^{-3**}$
U5	$64,6 \times 10^{-3**}$

$p < 0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)

48 saat deney süresinin sonunda sitotoksik aktivite değerleri Şekil 4.3'te gösterildiği gibi saptandı. *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin uygulandığı deney gruplarının % canlılık değerleri sırası ile B1 için %28, B2 için %23, B3 için %20, B4 için %26, B5 için %20 olarak tesbit edildi. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarında % canlılık değerleri sırası ile U1 için %99, U2 için %28, U3 için %19, U4 için %33 ve U5 için %21 olarak belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3: *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.



Şekil 4.4 : *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3: 0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin 72 saat süresince uygulanan deney gruplarında absorbans değerleri sırası ile B1 için $73,7 \times 10^{-3}$, B2 için 94×10^{-3} , B3 için $133,3 \times 10^{-3}$, B4 için $85,6 \times 10^{-3}$, B5 için $70,7 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarında absorbans değerleri sırası ile U1 için $308,1 \times 10^{-3}$, U2 için $99,6 \times 10^{-3}$,

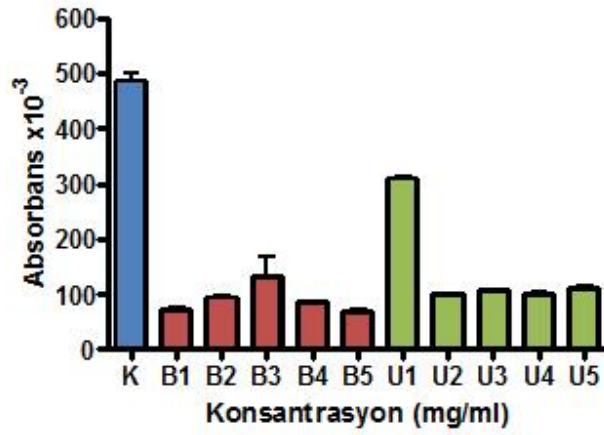
U3 için $106,6 \times 10^{-3}$, U4 için $99,3 \times 10^{-3}$ ve U5 için $112,2 \times 10^{-3}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.3) (Şekil 4.5). Daha sonra yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu ile tüm deney grupları arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 : Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 72 saat sonunda ölçülen absorbans değerleri.

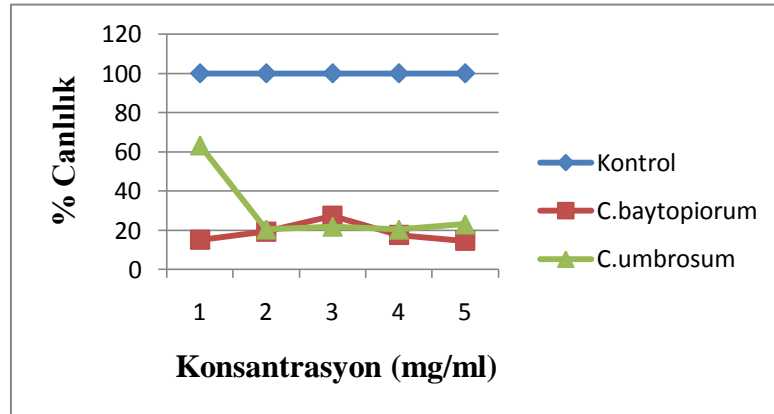
Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570 – 690 nm)
Kontrol	$486,4 \times 10^{-3}$
B1	$73,7 \times 10^{-3**}$
B2	$94,0 \times 10^{-3**}$
B3	$133,3 \times 10^{-3**}$
B4	$85,6 \times 10^{-3**}$
B5	$70,7 \times 10^{-3**}$
U1	$308,1 \times 10^{-3**}$
U2	$99,6 \times 10^{-3**}$
U3	$106,6 \times 10^{-3**}$
U4	$99,3 \times 10^{-3**}$
U5	$112,2 \times 10^{-3**}$

$p < 0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)

72 saat deney süresinin sonunda sitotoksik aktivite değerleri Şekil 4.5'te gösterildiği gibi saptandı. *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrelerin uygulandığı deney gruplarının % canlılık değerleri sırası ile B1 için %15, B2 için %19, B3 için %27, B4 için %17, B5 için %14 olarak tespit edildi. *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı deney gruplarında % canlılık değerleri sırası ile U1 için %63, U2 için %20, U3 için %21, U4 için %20 ve U5 için %23 olarak belirlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat süresinde tespit edilen sitotoksik aktivite değerleri.



Şekil 4.6 : *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda (1: 0.001, 2: 0.05, 3: 0.1, 4: 0.5, 5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat deney süresinin sonunda % canlılık değerleri.

4.1.2. Apoptotik İndeks

Colchicum baytopiorum C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin 0.001, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan 5 farklı konsantrasyonunun HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisinin araştırılması amacıyla 24, 48 ve 72 saat süresince AI değerleri saptanarak istatistiksel değerlendirilmeleri yapıldı (Tablo 4.4-6).

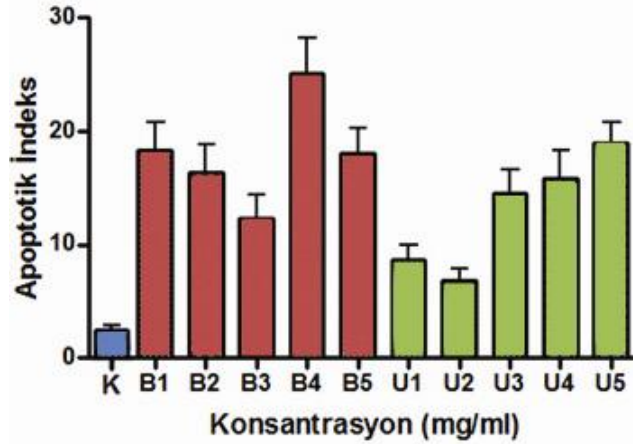
24 saat deney süresince, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin uygulandığı B1, B2, B4 ve B5 deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,01$). *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden hazırlanan ekstrenin uygulandığı U3, U4 ve U5 deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlılık tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrilerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 24 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri.

Deney Grupları	Apoptotik İndeks Değerleri
Kontrol	2,30
B1	18,30**
B2	16,40**
B3	12,37
B4	25,12**
B5	18,02**
U1	8,66
U2	6,78
U3	14,49**
U4	15,88**
U5	18,91**

$p < 0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)

24 saat deney süresi sonundaki AI değerleri, kontrol grubu için %2.3, *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstreleri uygulanmış deney gruplarında B1 için %18.3, B2 için %16.4, B3 için %12.37, B4 için %25.12, B5 için %18.02, *Colchicum umbrosum* S. ekstreleri uygulanmış deney gruplarında U1 için %8.66, U2 için %6.78, U3 için %14.49, U4 için %15.88, U5 için %18.91 olarak hesaplandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 24 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.

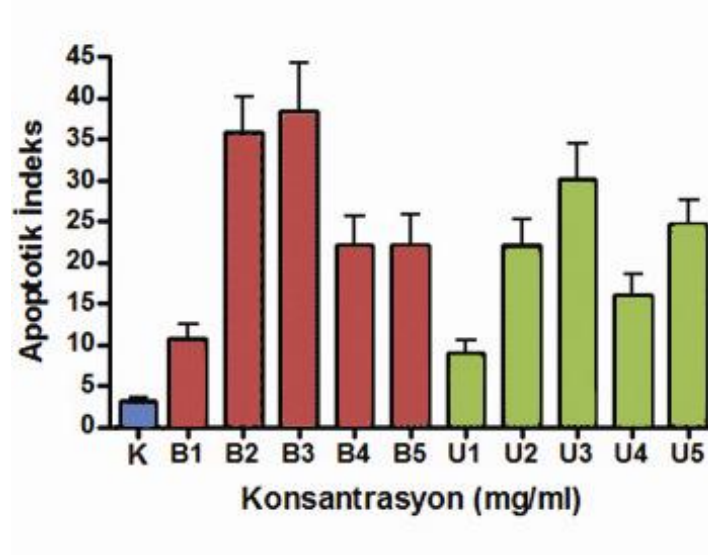
48 saat deney süresince, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstreinin uygulandığı B2, B3, B4 ve B5 deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,01$). *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden hazırlanan ekstreinin uygulandığı U2, U3 ve U5 deney grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlılık tespit edildi ($p < 0,01$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 48 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri.

Deney Grupları	Apoptotik İndeks Değerleri
Kontrol	2,84
B1	10,67
B2	35,91**
B3	38,38**
B4	22,04**
B5	22,03**
U1	8,90
U2	22,05**
U3	30,19**
U4	16,01
U5	23,58**

p < 0,01 : ** (kontrole göre anlamlılık)

48 saat deney süresi sonundaki AI değerleri, kontrol grubu için %2.84, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin uygulandığı deney gruplarında B1 için %10.67, B2 için %35.91, B3 için %38.38, B4 için %22.04, B5 için %22.03, *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden elde edilen ekstrenin uygulandığı deney gruplarında U1 için %8.9, U2 için %22.05, U3 için %30.19, U4 için %16.01, U5 için %23.58 olarak hesaplandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 48 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.

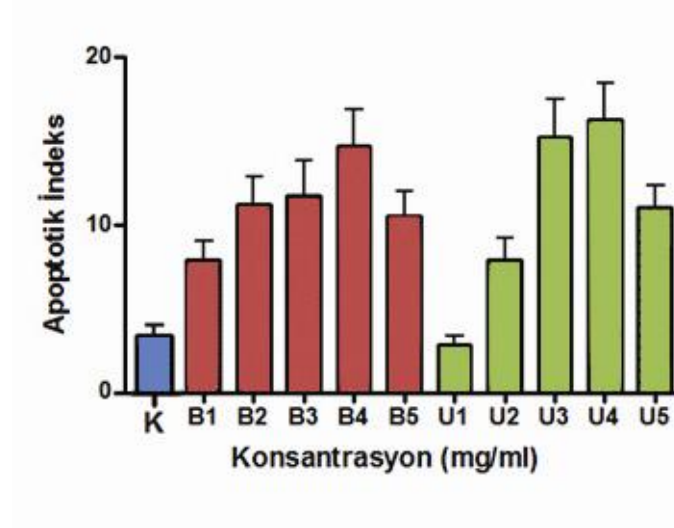
72 saat deney süresince, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin uygulandığı B2, B3, B4 ve B5 deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkların $p < 0,01$ seviyesinde anlamlı olduğu belirlendi. *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden elde edilen ekstrenin uygulandığı U3, U4 ve U5 deney gruplarının kontrole göre aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,01$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Kontrol ve *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerden hazırlanan deney gruplarının (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) 72 saat sonunda hesaplanan apoptotik indeks değerleri.

Deney Grupları	Apoptotik İndeks Değerleri
Kontrol	2,92
B1	7,89
B2	11,19**
B3	11,76**
B4	14,72**
B5	10,50**
U1	2,82
U2	7,91
U3	15,22**
U4	16,23**
U5	11,00**

p < 0,01 : ** (kontrole göre anlamlılık)

72 saat deney süresi sonundaki AI değerleri, kontrol grubu için %2.92, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin uygulandığı deney gruplarında B1 için %7.89, B2 için %11.19, B3 için %11.76, B4 için %14.72, B5 için %10,5, *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden hazırlanan ekstrenin uygulandığı deney gruplarında U1 için %2.82, U2 için %7.91, U3 için %15.22, U4 için %16.23, U5 için %11 olarak saptandı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: *Colchicum baytopiorum* C.D. ve *Colchicum umbrosum* S. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin ayrı konsantrasyonlarda (B1 ve U1: 0.001, B2 ve U2: 0.05, B3 ve U3: 0.1, B4 ve U4: 0.5, B5 ve U5: 1 mg/ml) uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde 72 saat sonunda saptanan apoptotik indeks değerleri.

4.1.3. Genel Değerlendirme

Deneşlerimizde kullanılan HeLa hücre soylarına iki bitki ekstresinin 5 farklı konsantrasyonunun uygulanması sonucunda, *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin uygulanan tüm konsantrasyonlarının ve *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden hazırlanan ekstrenin ise 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/ml konsantrasyonlarının sitotoksik etkisinin uygulamanın ilk saatinden itibaren (24 saat) ortaya çıktığı görüldü. Ortaya çıkan bu sitotoksik etki uygulama süresine bağılı olarak arttı.

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin 48 saat uygulandığı deney grubunda en yüksek AI değeri B3 (0.1 mg/ml) konsantrasyonunda saptandı.

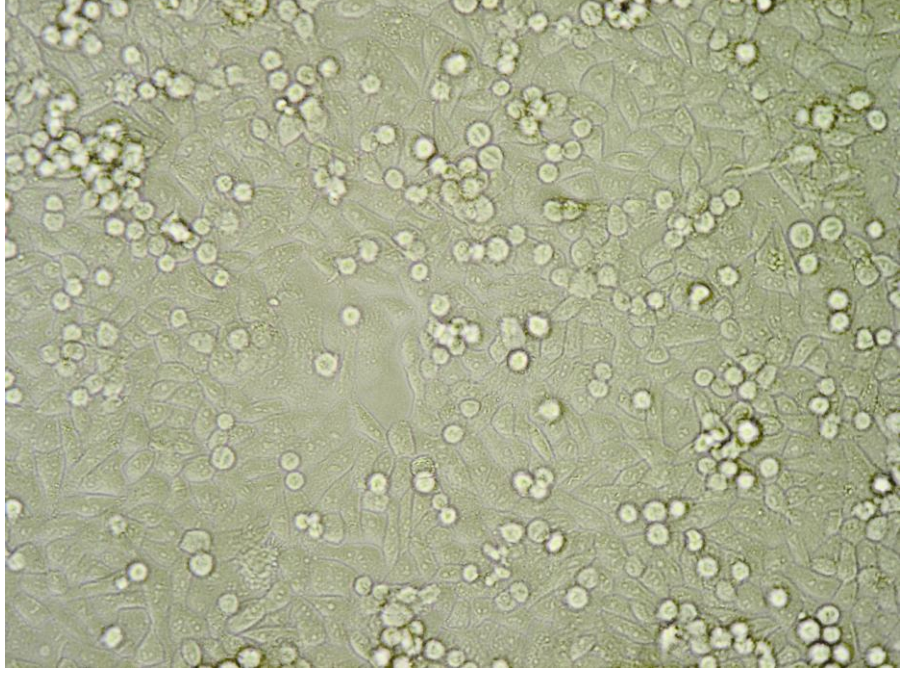
Ayrıca değerlendirilen parametreler ışığında *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstresinin *Colchicum umbrosum* S. ekstresine göre HeLa hücrelerinde daha etkin olduğu sonucuna varıldı.

4.2. APOPTOZUN İNCELENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

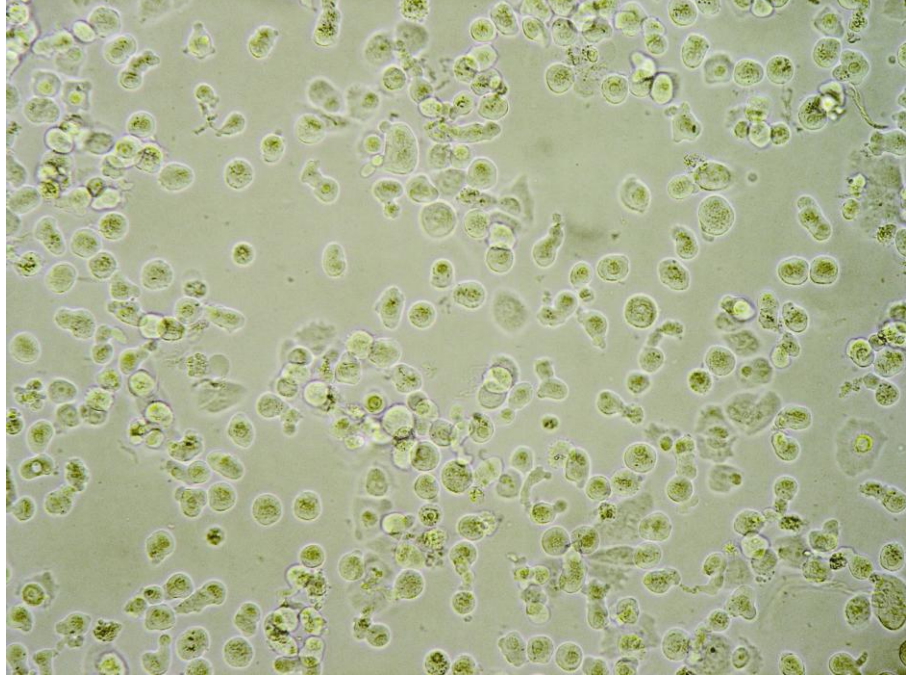
4.2.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

4.2.1.1. Faz-Kontrast Mikroskobu

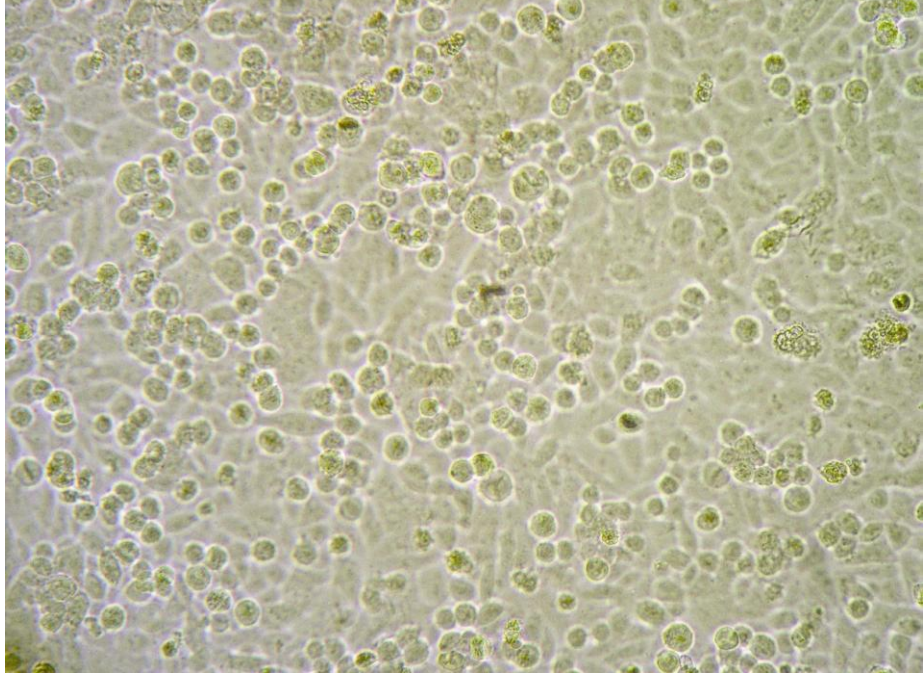
Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin sitotoksisite ve AI değerleri göz önünde bulundurularak en etkili olan konsantrasyonunun B3 (0,1 mg/ml) olduğu saptandıktan sonra B3 deney grubunun uygulandığı HeLa hücre kültürlerinde faz-kontrast mikroskobu ile morfolojik olarak apoptotik karakterler gözlemlendi. 24, 48 ve 72 saat deney süresinin sonunda HeLa hücre kültürlerinde meydana gelen sitotoksik etkinin uygulanan konsantrasyon ve saate bağlı olarak arttığı görüldü (Şekil 4.10-15).



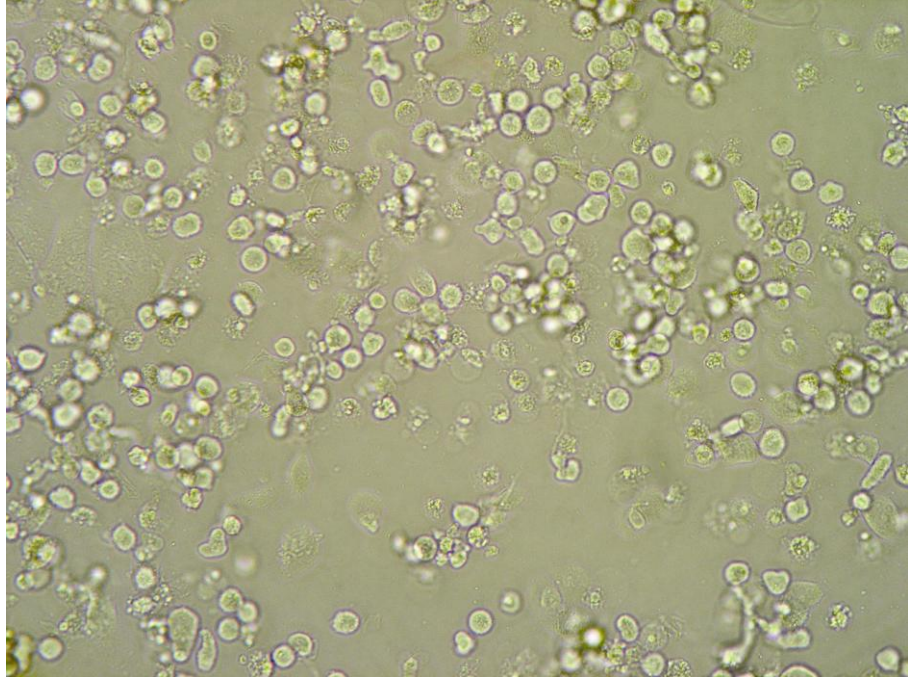
Şekil 4.10: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



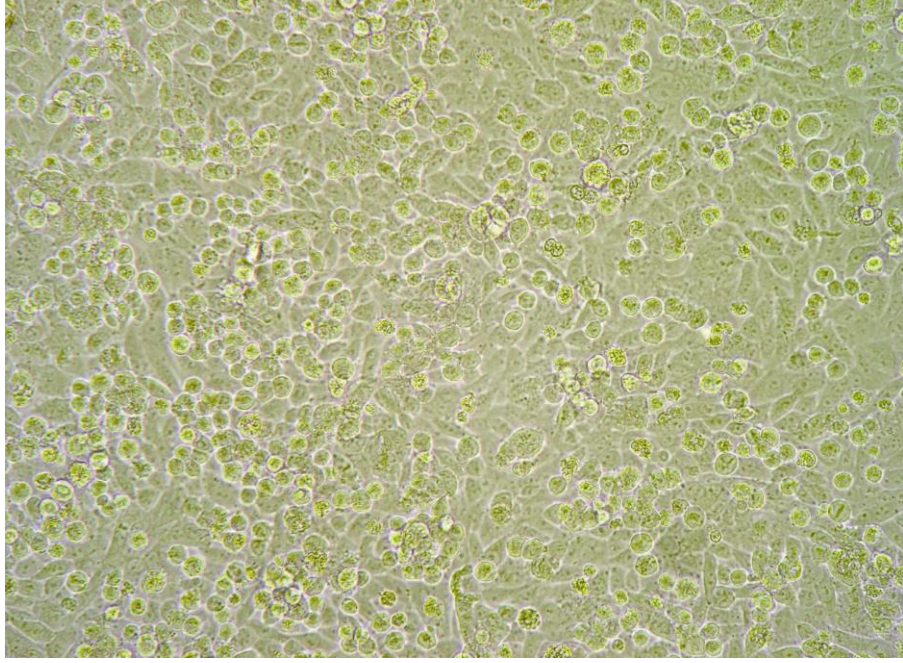
Şekil 4.11: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



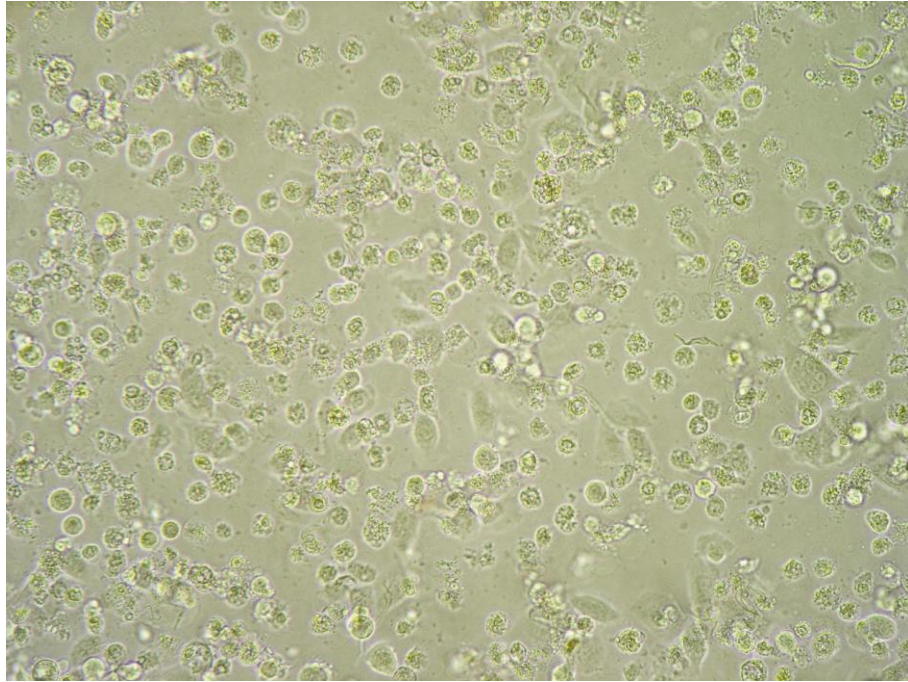
Şekil 4.12: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



Şekil 4.13: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



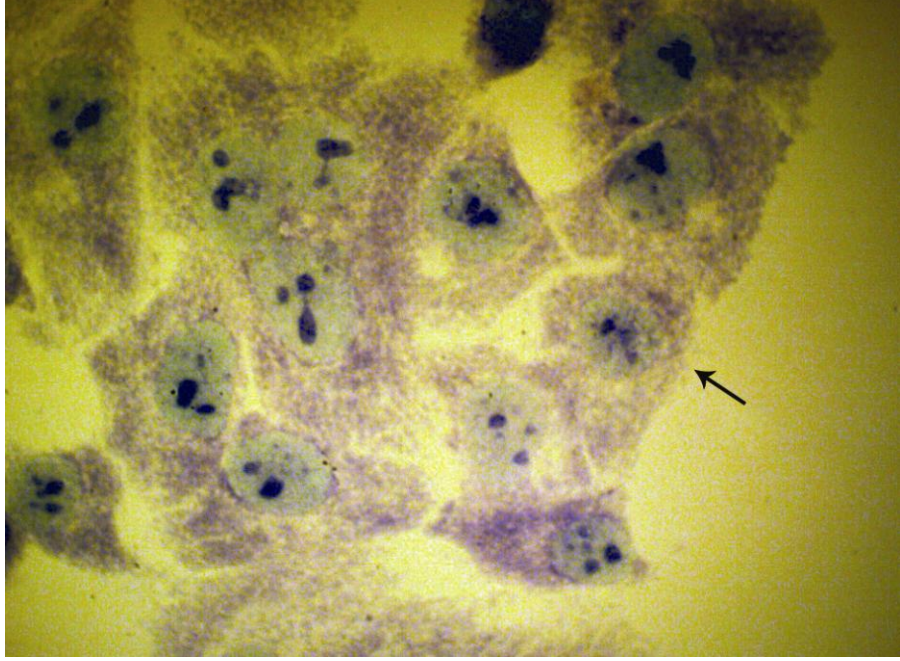
Şekil 4.14: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).



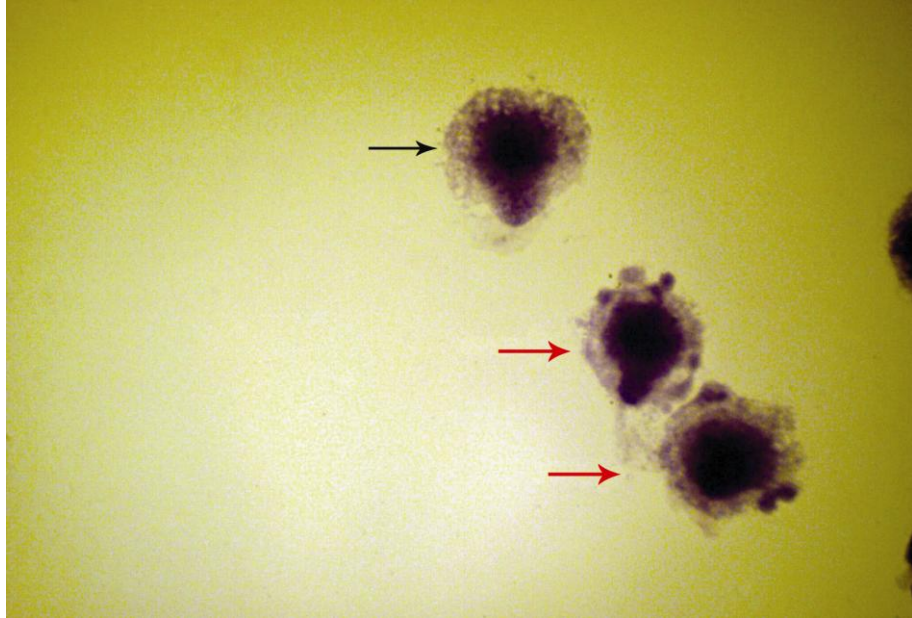
Şekil 4.15: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitki ekstresinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda faz-kontrast mikroskobu görüntüsü (x200).

4.2.1.2. Işıık Mikroskobu

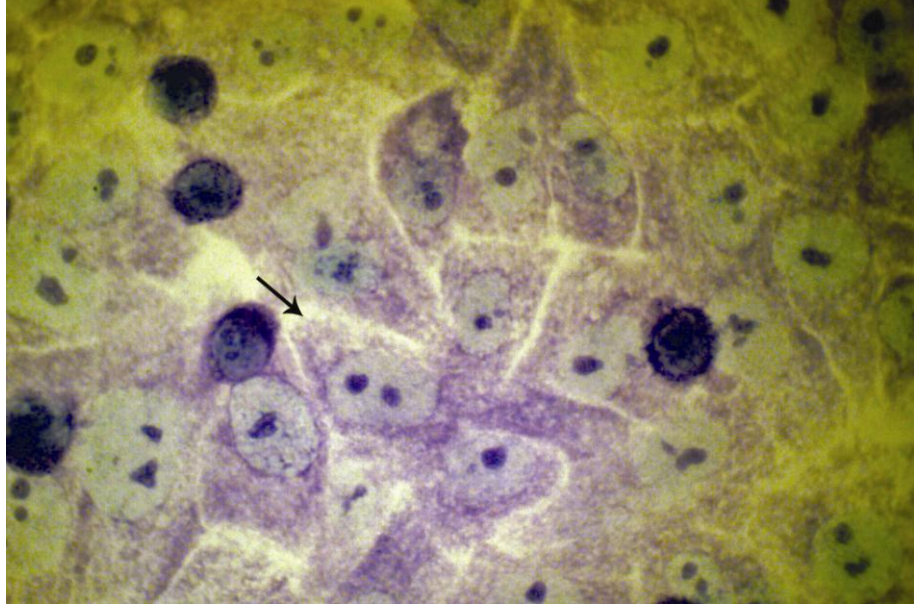
Colchicum baytopiorum C.D. Brickell bitkisinden hazırlanan ekstrenin B3 (0,1 mg/ml) konsantrasyonunun HeLa hücre soyları üzerine uygulandıktan sonra belirlenen deney süreleri sonunda Feulgen metodu ve Giemsa boyama yapılan hücrelerde, apoptoza özgü olan hücre membranının etrafında oluşan tomurcuklanma ve hücre organelleri ile birlikte kromatin parçalarını da içeren apoptotik cisimcikler ışık mikroskobu kullanılarak gösterildi ve fotoğrafları çekildi (Şekil:4.16-27).



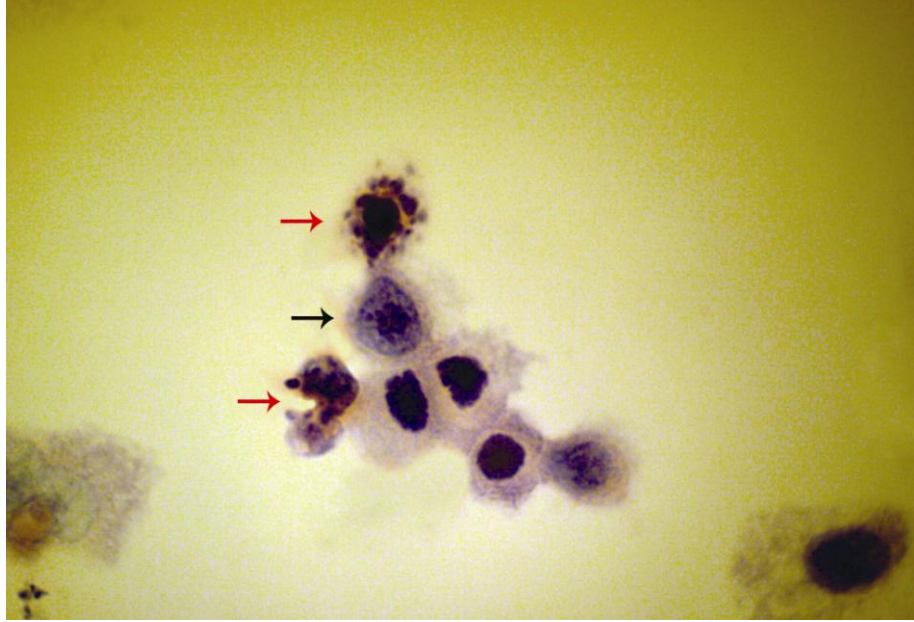
Şekil 4.16: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre).



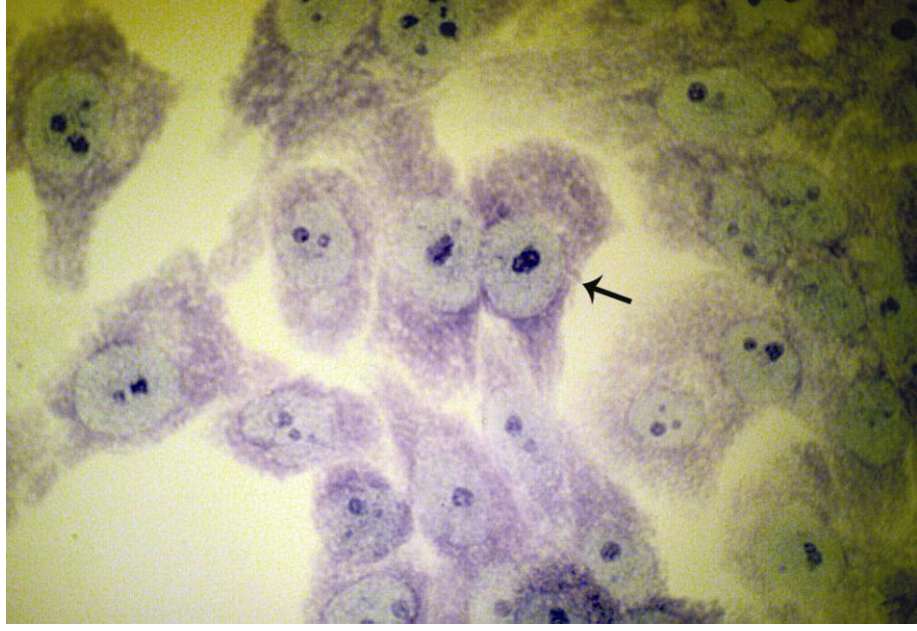
Şekil 4.17: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



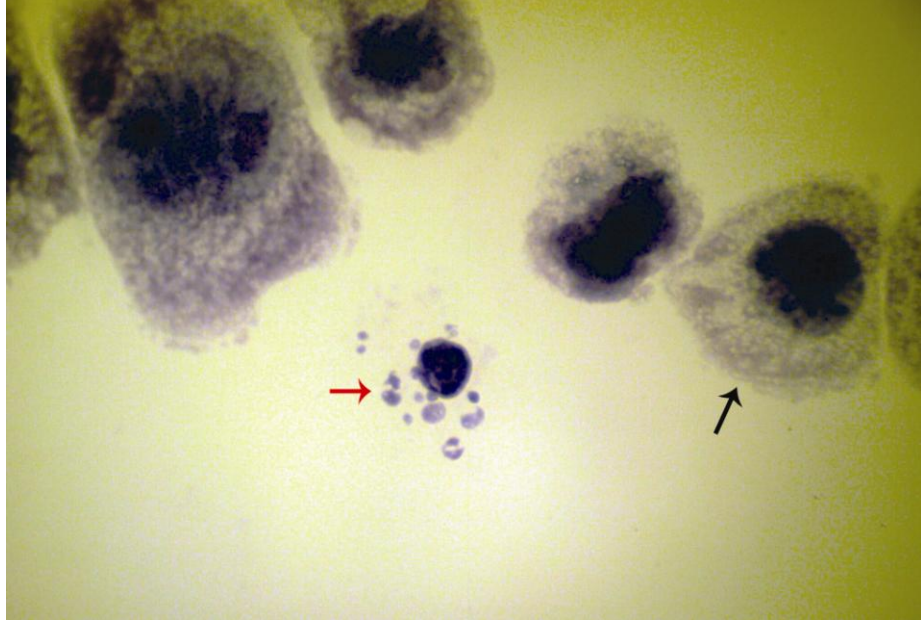
Şekil 4.18: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre).



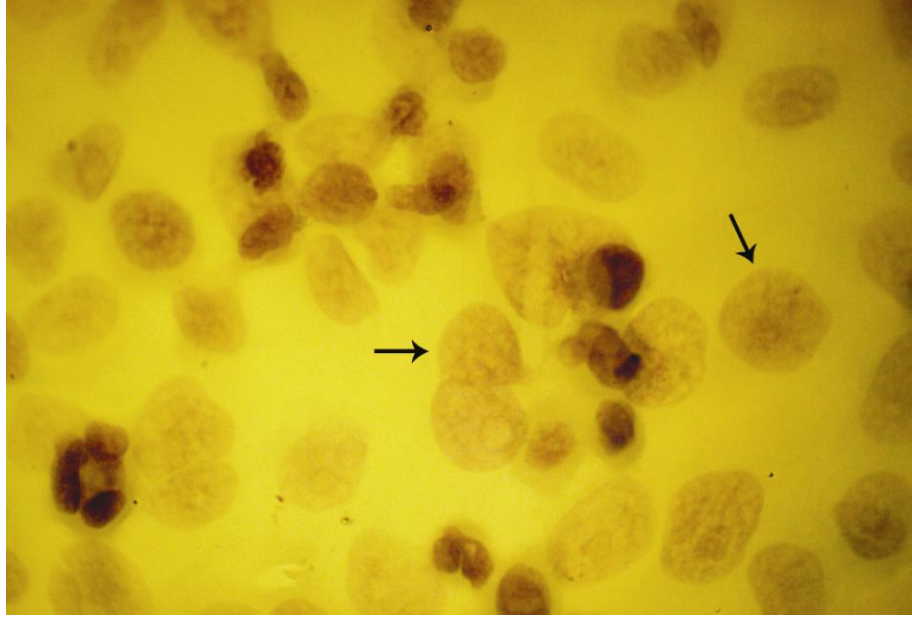
Şekil 4.19: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



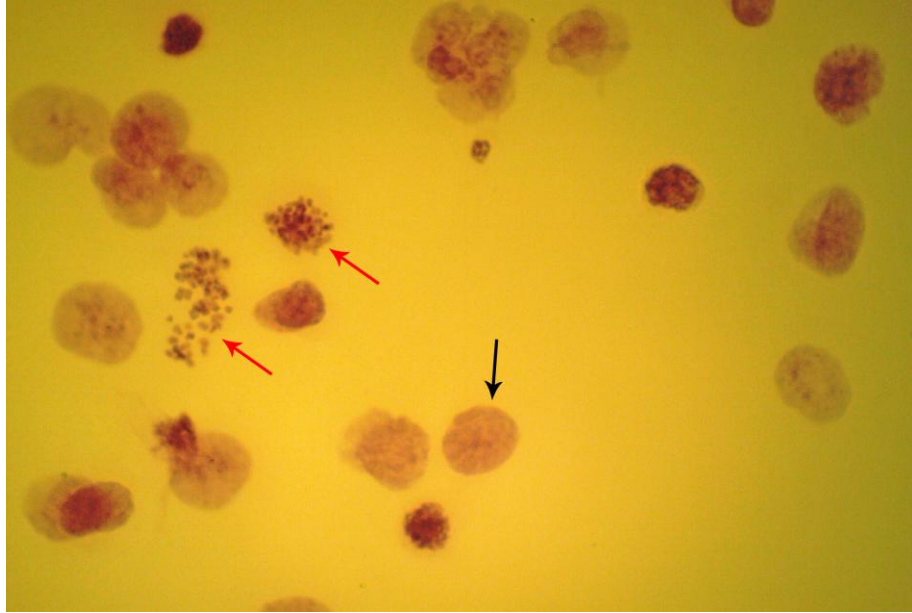
Şekil 4.20: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre).



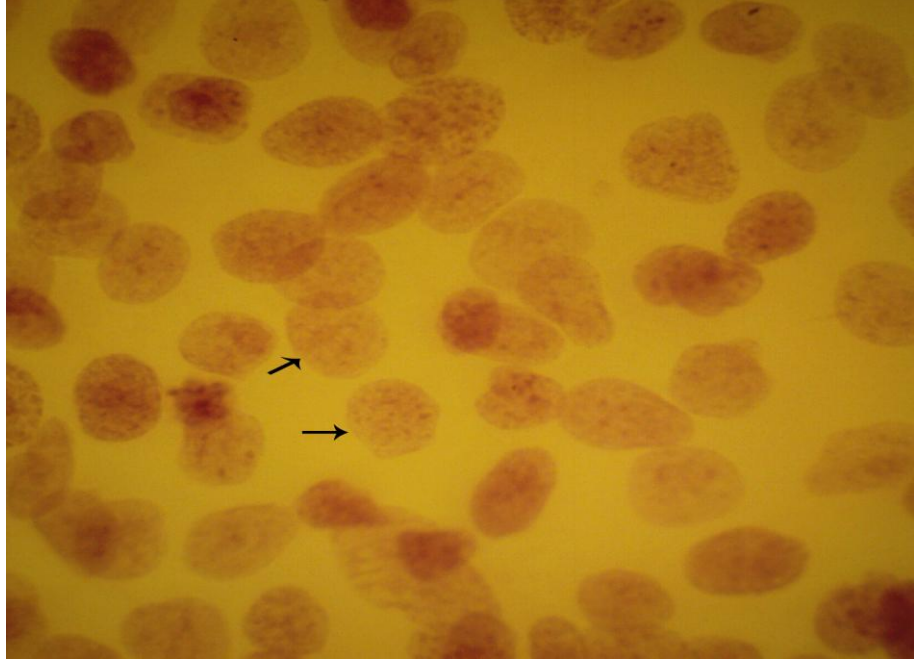
Şekil 4.21: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Giemsa) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



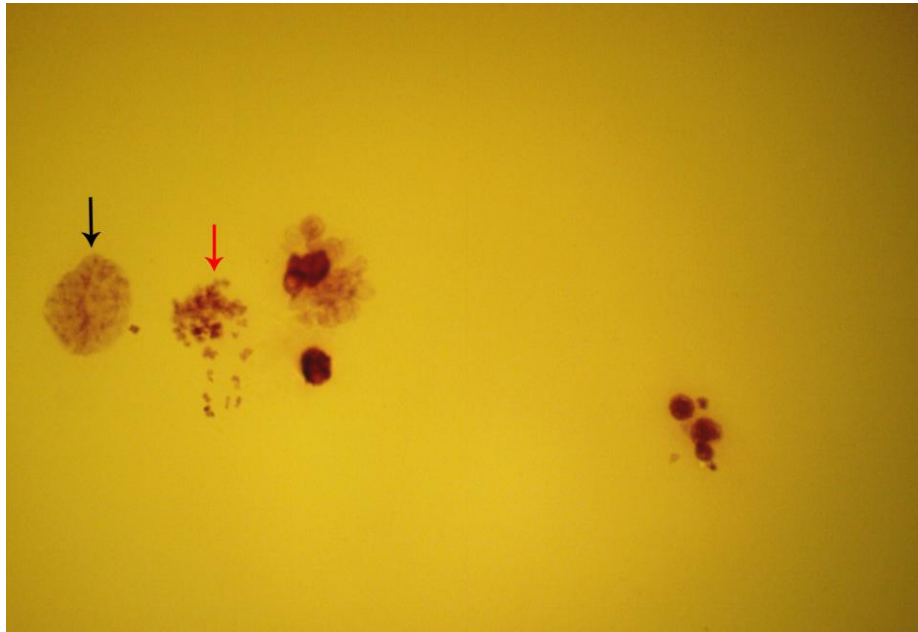
Şekil 4.22: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre).



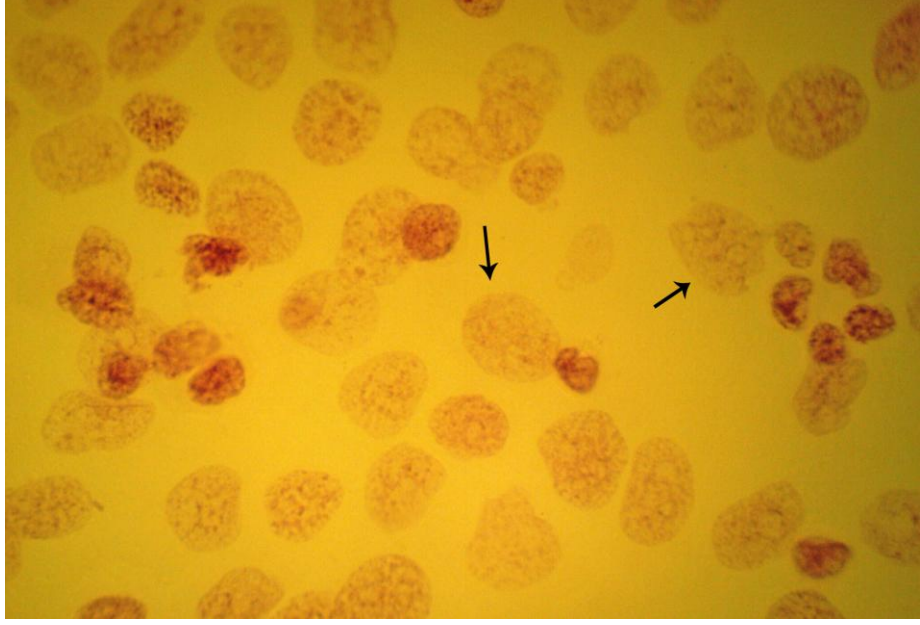
Şekil 4.23: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstreinin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



Şekil 4.24: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre).



Şekil 4.25: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



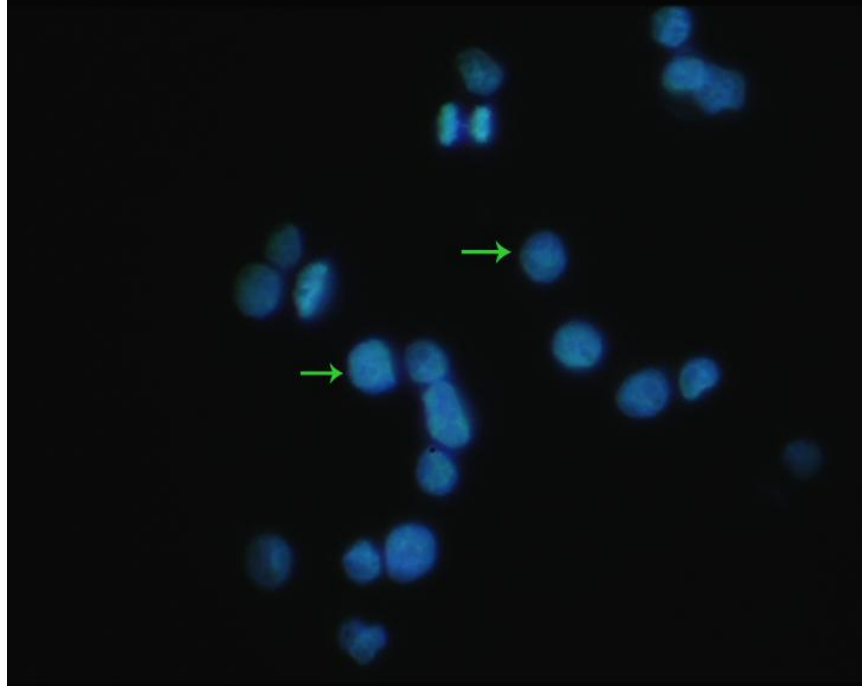
Şekil 4.26: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre).



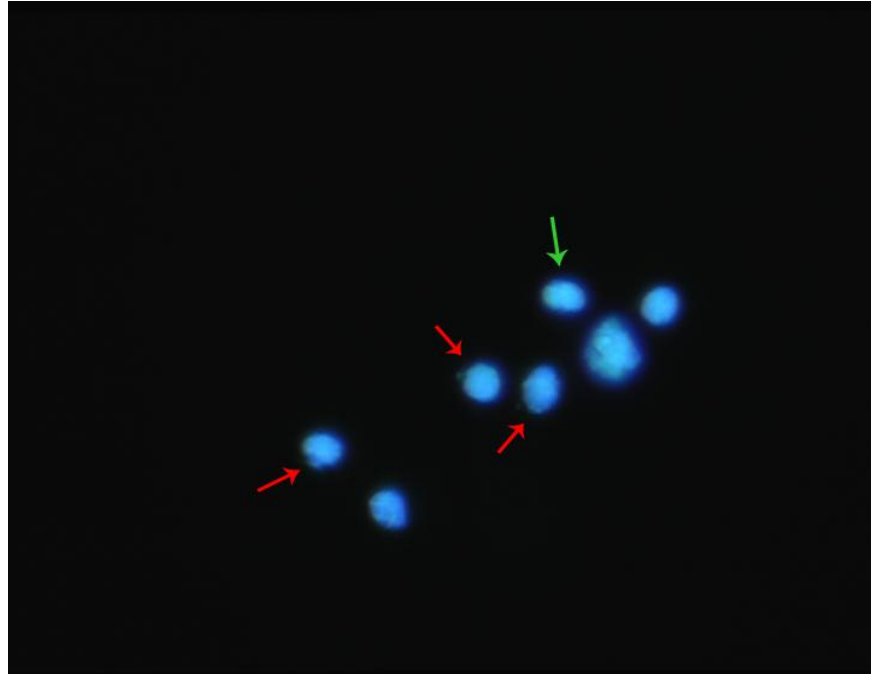
Şekil 4.27: HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda ışık mikroskobu görüntüsü (x1000; Feulgen) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).

4.2.1.3. Floresan Mikroskop

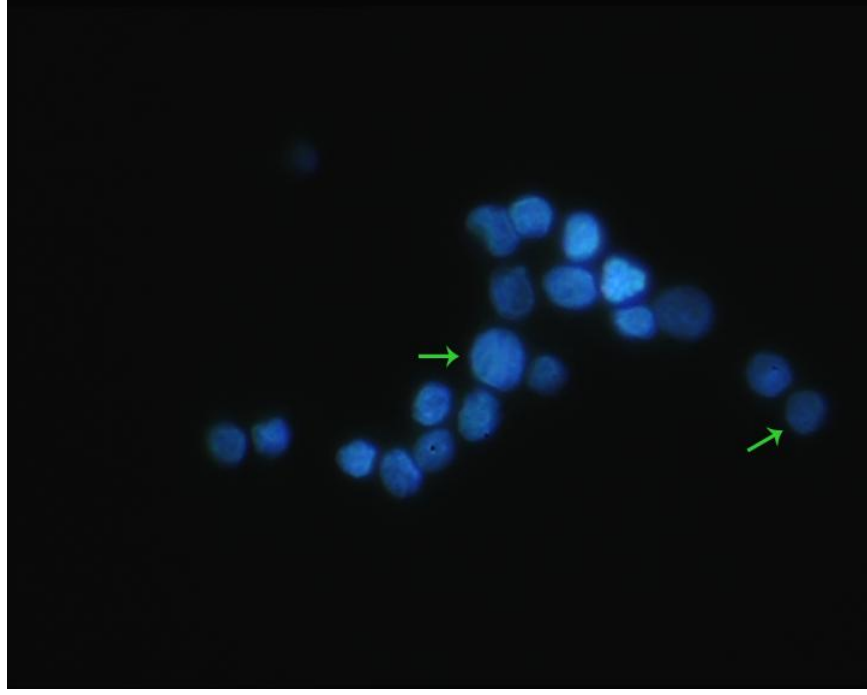
Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 (0,1 mg/ml) konsantrasyonunun HeLa hücre soyları üzerine uygulanması sonucunda 24, 48 ve 72 saat deney süreleri sonunda meydana gelen apoptoza özgü morfolojik özelliklerin (hücre membranında tomurcuklanma, nuklear kondensasyon ve apoptotik cisimcikler) DAPI ile floresan mikroskoptaki görüntüleri gösterilmiştir (Şekil 4.28-33).



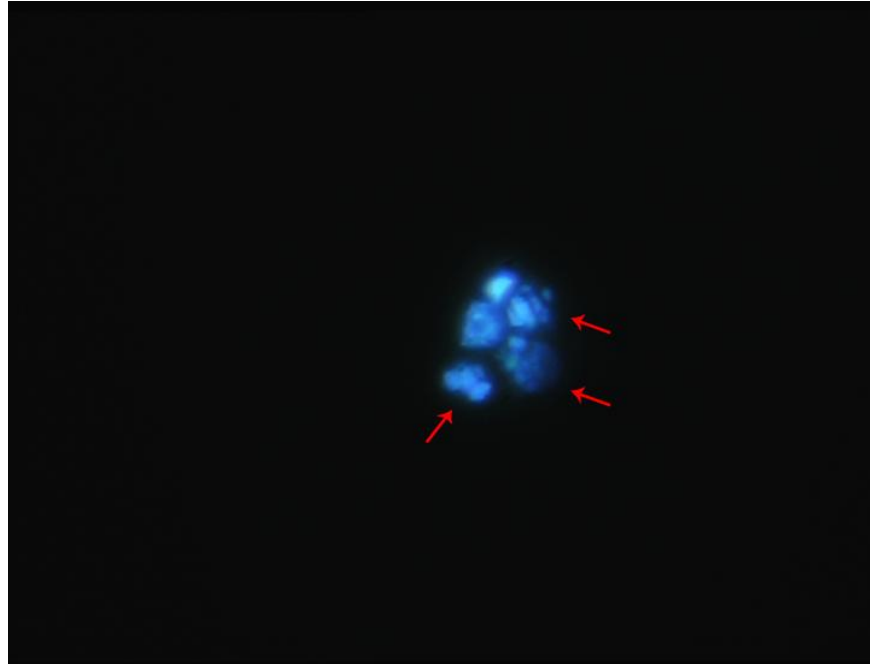
Şekil 4.28: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 24 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→ : Normal Hücre).



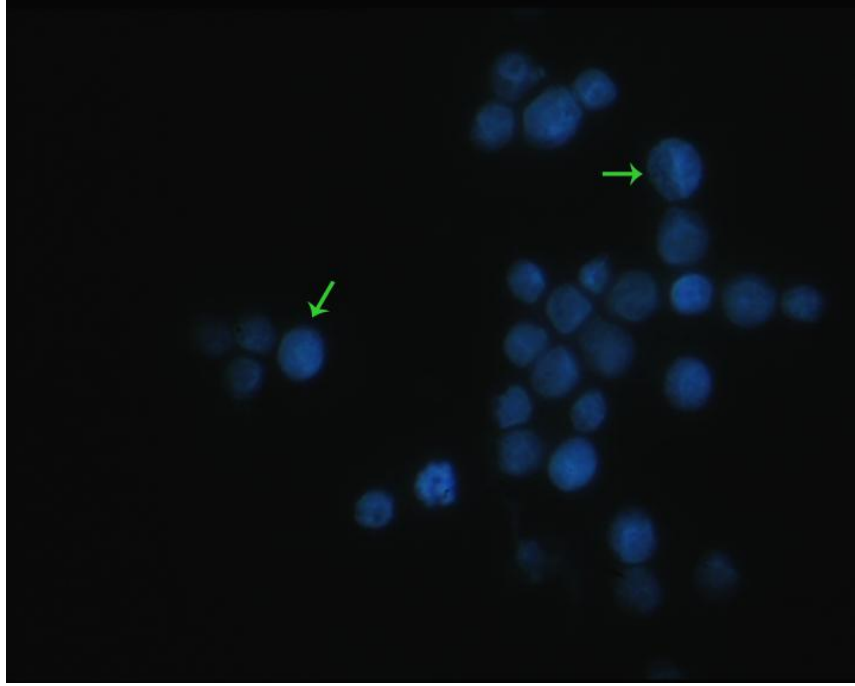
Şekil 4.29 : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 24 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).



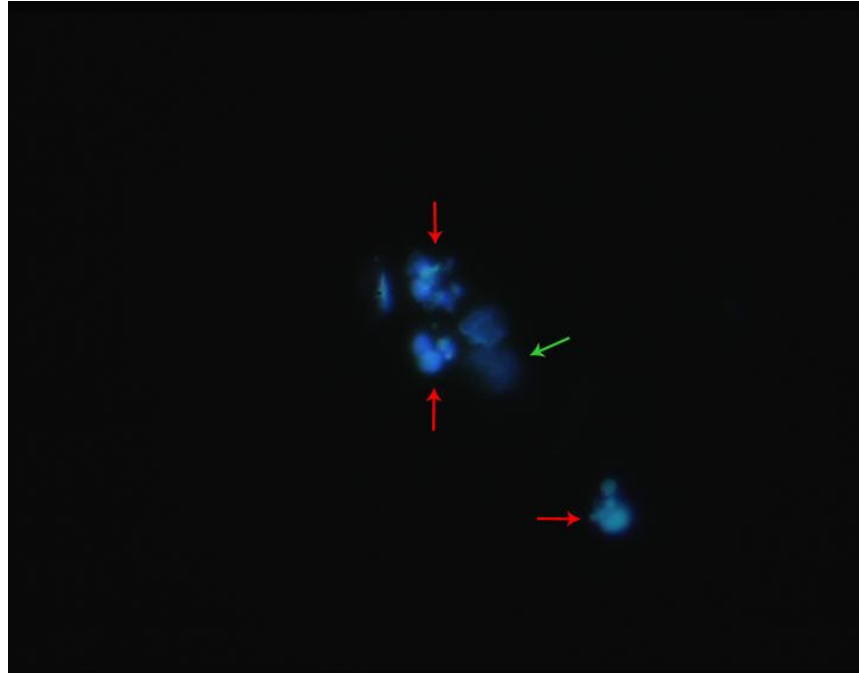
Şekil 4.30: HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 48 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→: Normal Hücre).



Şekil 4.31 : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 48 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→ : Apoptotik Hücre).



Şekil 4.32 : HeLa hücre kültürlerinde kontrol grubunun 72 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→ : Normal Hücre).

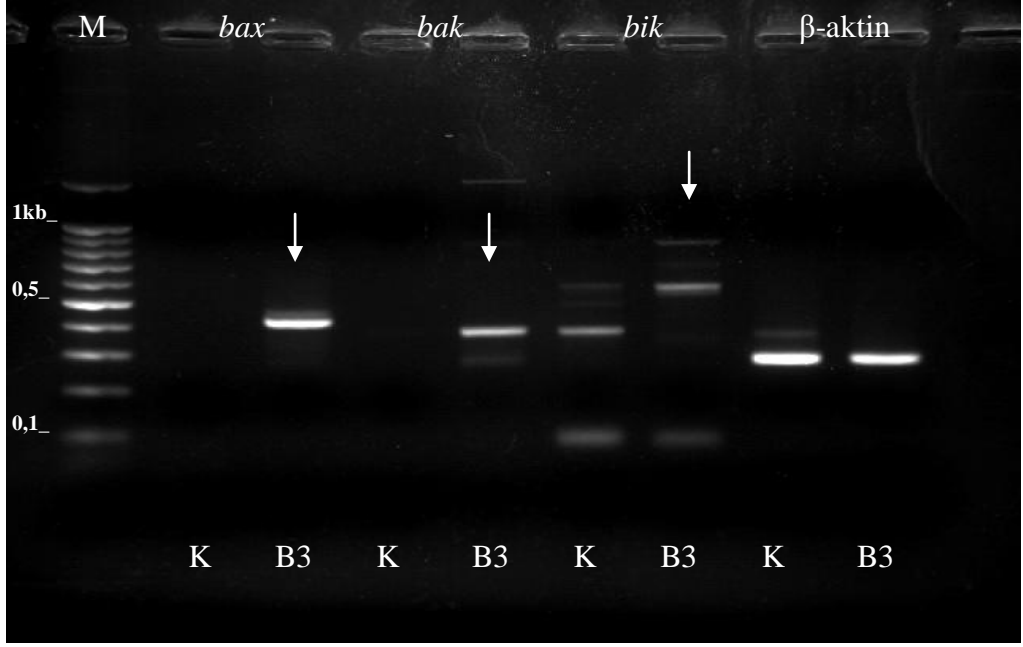


Şekil 4.33 : HeLa hücre kültürlerinde *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonunun uygulandığı deney grubunun 72 saat sonunda floresan mikroskobu görüntüsü (x1000; DAPI) (→ : Normal Hücre, → : Apoptotik Hücre).

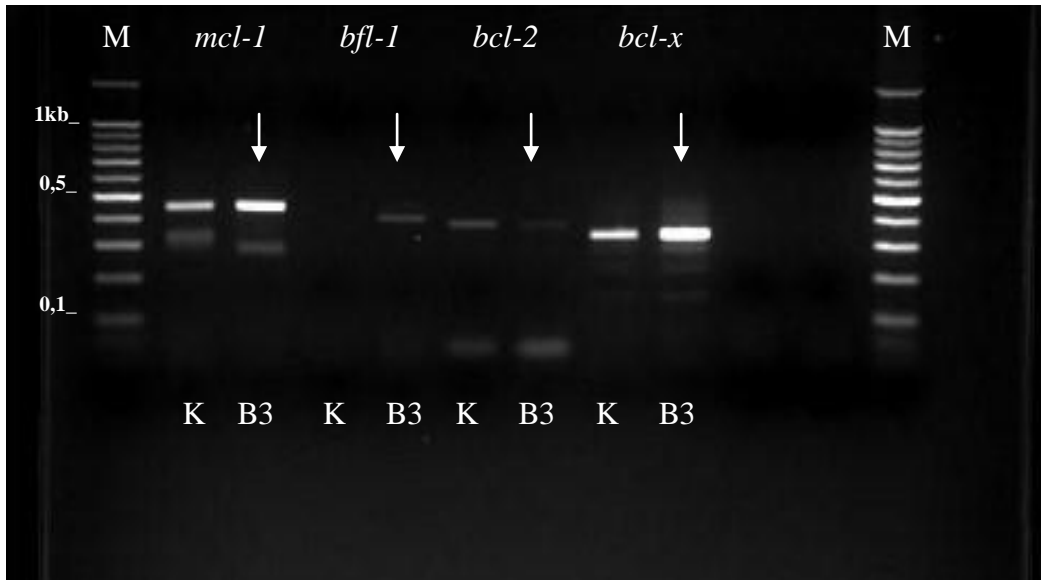
4.2.2. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

4.2.2.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin 48 saat deney grubunun en yüksek AI değerine sahip B3 (0.1 mg/ml) konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki hücrelerde total RNA izolasyonunun ardından *bcl-2* gen ailesine ait pro-apoptotik (*bax*, *bak*, *bik*) ve anti-apoptotik (*bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1*, *bfl-1*) genlerin ve β -aktin geninin anlatımına RT-PCR yöntemi kullanılarak bakıldı. RT-PCR yöntemi kullanılarak elde edilen cDNA'lar elektroforez tankındaki agaroz jelin kuyucuklarına yüklenerek güç kaynağına bağlandı. *bax*, *bak*, *bik*, *bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1* ve *bfl-1* genlerinin anlatımları bant boyutlarına göre saptandı. Pro-apoptotik genlerden *bax*, *bak* ve *bik* genlerinin anlatımı kontrol grubunda gözlenmezken *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstresinin B3 konsantrasyonu uygulanmış deney grubunda bu genlerin anlatımlarının yapıldığı tespit edildi (Şekil 4.34). *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstresinin B3 konsantrasyonu uygulanmış deney grubunda anti-apoptotik genlerden olan *mcl-1* ve *bcl-x* genlerinin anlatımlarının kontrol grubuna göre arttığı saptandı. Ayrıca B3 konsantrasyonu uygulanmış deney grubunda *bfl-1* geninin anlatımı gözlenirken, kontrol grubunda bu genin anlatım yapmadığı tespit edildi. *bcl-2* geninin ise kontrol grubunda anlatımının yapıldığı, B3 konsantrasyonu uygulanmış deney grubunda ise anlatımının olmadığı belirlendi (Şekil 4.35).



Şekil 4.34: *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda *bcl-2* gen ailesine ait *bax*, *bak*, *bik* genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml).

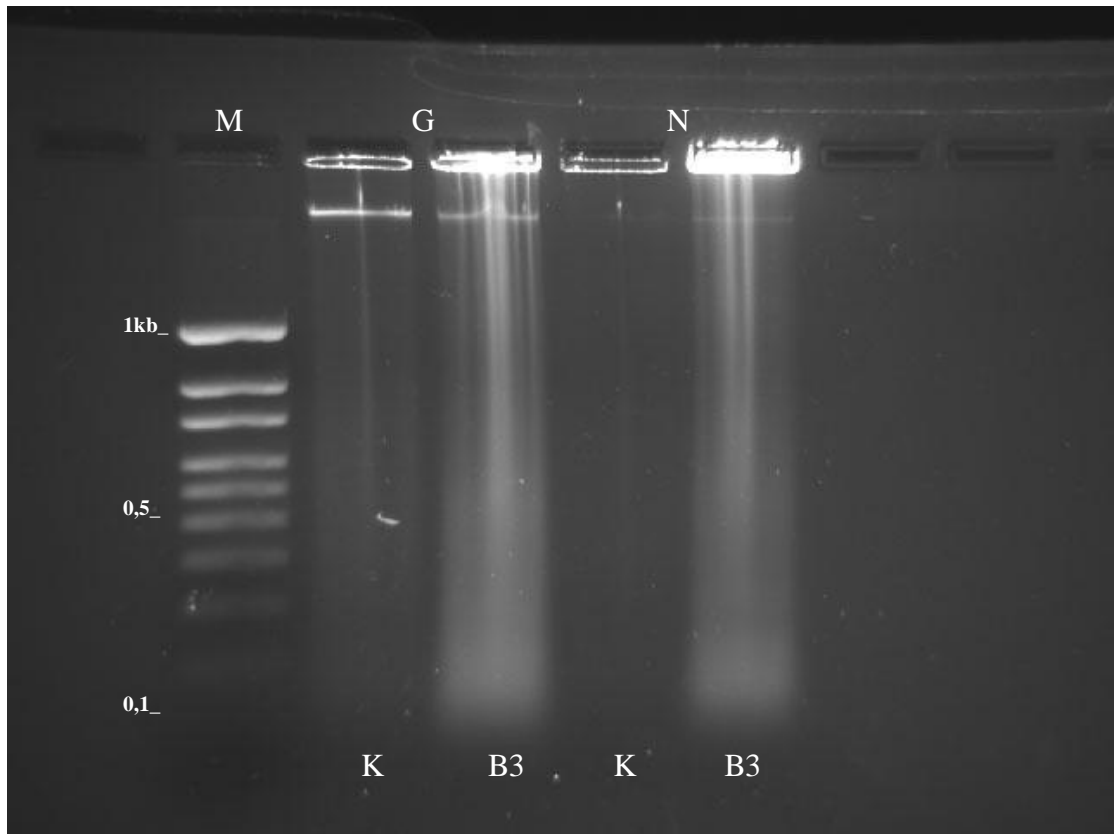


Şekil 4.35: *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda *bcl-2* gen ailesine ait *bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1*, *bfl-1* genlerinin anlatımlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml).

4.2.3. Biyokimyasal Yöntemler

4.2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi

Colchicum baytopiorum C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 (0,1 mg/ml) konsantrasyonu uygulanan 48 saat deney grubunda DNA fragmentasyonunu gözlemlemek amacıyla deney ve kontrol grubundaki hücrelerden DNA izole edildi ve agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelendi. Deney sonucunda *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan HeLa hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmedi (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 : *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubu ve kontrol grubundaki hücrelerde 48 saat sonunda HeLa hücrelerindeki genomik DNA içeren ve içermeyen nükleozomal DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (M:1,5 kb marker) (K: kontrol, B3: 0.1 mg/ml) (G: genomik DNA içeren nükleozomal DNA, N: genomik DNA içermeyen nükleozomal DNA).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, eski çağlardan beri tedavi amaçlı kullanılan *Colchicaceae* familyasına ait olan *Colchicum umbrosum* S. ve ülkemize endemik *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkilerinden elde edilen ekstrelerin HeLa hücre soyları üzerine anti-tümöral ve apoptotik etkisi araştırılarak, bu etkilerin moleküler mekanizmasında hangi moleküllerin etkin olduğunun aydınlatılması amaçlanmıştır. Ayrıca kullanılan iki ekstrenin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Deneyle, her iki ekstrenin 5 farklı konsantrasyonu için ayrı ayrı olmak üzere belirlenen hücre kinetiği parametrelerinden çoğalma hızı ve AI, moleküler biyoloji yöntemlerinden de DNA fragmentasyonu ve RT-PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Colchicum umbrosum S. ve *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkilerlerinden elde edilen ekstrelerinden 5 farklı konsantrasyon hazırlanarak HeLa hücre kültürleri üzerine bu ekstrenin zamana bağlı sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda kolorimetrik MTT yöntemi kullanılmış ve % canlılık değerleri tespit edilmiştir. Bunun sonucunda HeLa hücreleri üzerine uygulanan *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden elde edilen ekstrelerin, *Colchicum umbrosum* S. bitkisinden hazırlanan ekstrelere oranla 24 ve 48 saatte daha toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.1-3).

Colchicum türleri etken madde olarak kolşisin ve türevlerini içermektedir. Kolşisin ve türevlerinin sitotoksik etkisinin araştırılması üzerine bir çok çalışma yapılmasına rağmen ekstre bazında bu doğrultuda çalışma çok az sayıdadır. Pırıldar (2006) tarafından *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinin çeşitli kısımlarından hazırlanan ekstreler arasında en sitotoksik etkiye sahip olanın yumru ekstresi olduğu belirlenmiş ve bu ekstre K562 ve HL60 hücre soyları üzerine uygulanmıştır. Daha sonra kolşisin ve türevi demekolsinin oluşturduğu sitotoksik etki ile ekstrenin sitotoksik aktivitesi karşılaştırılmıştır. Ekstrenin HL60 ve K562 hücreleri üzerine kolşisin ile aynı etkiyi

gösterirken, K562 hücreleri üzerinde demekolsinden daha sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada, *Actinidia valvata* Dunn bitkisinden izole edilen korosolik asit farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonunda HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. 6 saatte hücrelerde büzülmelerin başladığı, 36 saatin sonunda da kontrole oranla canlı hücre sayısında azalma olduğu belirtilmiştir (Xu ve diğ., 2009).

Apoptozun şiddeti ve oranını belirten AI parametresinin tespiti, tümörün tipini, evresini, hastalığın seyrinin, sonuçlarının, hastanın direnme gücü ve hastaya yardım olanakları dikkate alınarak hastanın geleceğinin nasıl olacağı tahmin edilmesine yardımcı bir tekniktir (Öktem ve diğ., 2001).

Colchicum umbrosum S. ve *Colchicum baytopiorum* C.D. bitki ekstreleri uygulanan HeLa hücrelerinde saptanan sitotoksitenin apoptoz ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi için bu iki ekstrenin 5 farklı konsantrasyonunun uygulanmasına ait AI değerleri karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda 72 saatte her iki ekstrenin çok sitotoksik etkisi olması nedeni ile 48 saatin deney amacına yönelik en uygun süre olduğu sonucuna varılmıştır.

Her iki ekstrenin 48 saat sitotoksiste ve AI değerleri göz önüne alınarak yapılan değerlendirme sonucunda *Colchicum baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin en etkili konsantrasyonun B3 (0.1 mg/ml) olduğu belirlenmiştir.

Tanako ve diğ. (1999) tarafından küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan 236 hastadan alınan dokulardan hazırlanan preparatlarda, AI ve çoğalma oranı arasında bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. AI oranı artarken yaşam oranında azalma olduğu belirlenmiştir.

Bungu ve diğ. (2006) tarafından *Tulbaghia violacea* bitkisinin yaprak ve soğanlarından hazırlanan ekstreler HeLa, HT29, MCF-7 ve WHCO3 hücreleri üzerine uygulanmıştır. 24 saat sonunda belirgin miktarda apoptotik hücre saptanmıştır. 48 saat sonunda ise

apoptotik hücre sayısında daha fazla artma olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar bu ve benzer diğer araştırmalar ile tutarlılık göstermektedir.

Çalışmamızda *Colchicum baytopiorum* bitkisinden hazırlanan ekstrenin HeLa hücre soyu üzerine en etkili konsantrasyonunun B3 (0.1 mg/ml) olduğunun belirlenmesinden sonra HeLa hücrelerinde meydana gelen apoptoza özgü morfolojik değişimler Feulgen metodu ve Giemsa boyama ile ışık mikroskobu kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16-27).

Apoptoz iki ana yol ile gerçekleşmektedir. Bunlar; ölüm ligandları yolu ile tetiklenen dış ölüm yolağı ve mitokondri yolu ile gerçekleşen iç ölüm yolağıdır. Mitokondri aracılı ile gerçekleşen apoptotik yolakta kaspaz kaskadın aktivasyonu için mitokondrial taşıma sisteminin elemanlarından olan sitokrom c'nin salınması gerekmektedir. Apoptozun ilk evresinde mitokondriden sitokrom c'nin sitozole salınması, *bcl-2* ailesine ait üyeler tarafından pozitif ve negatif olarak ayarlanmaktadır. *bcl-2* ailesi üyelerinden *bcl-2*, *bcl-xL* ve *mcl-1* apoptozu engellemekte; *bax*, *bak*, *bid*, *bik*, *bim* ve *bad* apoptozu tetiklemektedir (Bhalla, 2003; Yin ve diğ., 2003).

Çalışmamızda, B3 konsantrasyonu uygulanan HeLa hücrelerinde 48 saat sonunda meydana gelen apoptoz sürecinde *bcl-2* ailesine ait genlerin anlatımına Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile bakılmıştır. B3 konsantrasyonu uygulanan deney grubunda *mcl-1*, *bcl-x* genlerinin anlatımlarında kontrole göre artış olduğu, *bax*, *bak*, *bik* ve *bfl-1* genlerinin anlatımlarının yapıldığı, *bcl-2* gen anlatımının ise yapılmadığı tespit edilmiştir.

Gorman ve diğ. (1999) yaptıkları çalışmada, serebellar granül hücrelerinde kolşisinin teşvik ettiği apoptoz sırasında sitokrom c salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Sitoplazmadan sitokrom c'nin salınımı ile beraber apoptozun meydana geldiği ve böylece bu sürecin aktive olan kaspaz 3 vasıtası ile gerçekleştiği gösterilmiştir.

Kim ve diğ. (2009) tarafından çoklu tümör hücreleri üzerinde anti-kanserojen etkisi olan, soyadan elde edilen *genistein* ile çalışılmıştır. HeLa, CaSki ve C33A hücreleri

(servikal kanser hücreleri) üzerine 48 saat 5-60 µmol/L dozunda *genistein* uygulanarak bu maddenin apoptozu hangi yolak üzerinden gerçekleştirdiği araştırılmıştır. *Genisteinin* hem iç hem de dış yolak üzerinden etki ettiği gösterilmiştir. Ayrıca *genisteinin*, mitokondride sitokrom c salınımında rol oynayan *t-bid* ve *bax* genlerinin anlatımını arttırdığı; *bcl-2* geninin anlatımında ise bir artış olmadığı ve bu durumda *bax/bcl-2* oranının yükseldiği saptanmıştır.

Bir diğer çalışmada retinoblastomada gerçekleşen apoptozun farklı yollarında rol oynayan genlerin anlatımları Sitorus ve diğ. (2009) tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada 19 hastadan alınan 10 tanesi göz içi tümörlerden, 9 tanesi de göz dışı tümörlerden olmak üzere 19 olgu üzerinde çalışılmıştır. Çeşitli tümörlerde AI, *bcl-2* geninin anlatımı ile ters ilişkili olmasına rağmen iki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Tümörlerin hepsinde *bcl-2* geninin aşırı anlatımı gözlenmesine rağmen apoptotik hücre sayısında artış tespit edilmiştir. Ayrıca, 11 tümörde *bcl-2* geninin hiç anlatım yapmadığı bildirilmiştir. Bunlardan 4'ünde apoptoz belirgin olarak tesbit edilememiş ve bir çok tümörde *bcl-2* geninin aşırı anlatımının her zaman apoptozu engellemediği sonucuna varılmıştır.

Gottardi ve diğ. (1996) tarafından yapılan çalışmada, malignant CD5⁺ B hücrelerinde apoptoz kontrol mekanizması araştırılarak *bcl-2* gen ailesinin anlatımına bakılmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre, malignant CD5⁺ B hücrelerinde *bax* geninin anlatımının yüksek seviyelerde olduğu; örneklerin çok azında ise *bcl-xS* geninin anlatımında azalma olduğu saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, Krajewska ve diğ. (1996) prostat kanserinin 64 olgusunda *bcl-2* gen ailesi üyelerinin anlatımları araştırılmıştır. Prostat kanserlerinin hepsinde anti-apoptotik genlerden *bcl-2*, *bcl-x* ve *mcl-1*'in anlatımlarının arttığı ortaya konulmuştur. Bununla beraber pro-apoptotik olan *bax* geninin anlatımının aynı kaldığı tespit edilmiştir.

Volbracht ve diğ. (2001) yaptıkları çalışmada başlangıçtaki kolşisin ile uyarılmış mikrotübül yıkımının ve ardından gerçekleşen nükleer kondensasyonun *bcl-2* tarafından ayarlanıp ayarlanmadığını araştırılmıştır. Bunun için ilk olarak, yalnız kolşisine maruz

kalmış *bcl-2* anlatımı fazla olan farelerden alınmış serebellar granül hücre kültürleri üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir ve *bcl-2*'nin anlatımının artmasının mikrotübül yıkımında belirgin bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, nöronlara 1 μ M kolşisin ile beraber kaspaz aktivitesini engelleyen zVAD-fmk uygulandığında meydana gelen apoptoza özgü morfolojik değişikliklerin DNA hasarı ile paralellik gösterip göstermediği DNA fragmentasyonu gözlenerek değerlendirilmiştir. Kolşisinin, hem zVAD-fmk varlığında hem de yokluğunda yüksek molekül ağırlıklı DNA fragmentasyonunun oluştuğunu göstermişlerdir. Kolşisinin zVAD-fmk ile uygulandığı durumda da zamana bağlı olarak DNA fragmentasyonunun sadece kolşisin uygulanmış olanlar ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

Genomik DNA fragmentasyonu apoptoz sürecinin en sonunda gerçekleşen bir olaydır. Bitkilerden elde edilen ve türetilen anti-kanser ilaçlarından biri olan kolşisin, hücrel stres sonucunda teşvik edilen DNA hasarına neden olmaktadır (Jordan ve Wilson, 2004). Çalışmamızda kullandığımız *Colchicum baytopiorum* C.D. ekstresinin en etkili olduğu konsantrasyon ve saatin belirlenmesinin ardından HeLa hücrelerinde, DNA fragmentasyonuna bakılmıştır. Agaroz jel elektroforezi yöntemi ile bakılan DNA'da apoptoza özgü olan DNA fragmentasyonu gözlenmemiştir. Bu durumun konsantrasyon ve süreye bağlı olarak DNA fragmentasyonunun değişebildiğini göstermektedir.

Essack (2006), tarafından *Cotyledon orbiculata*, *Oxalis pescaprae*, *Echium plantagineum*, *Cissampelos capensis*, *Euphorbia mauritanica*, *Haemanthus pubescens*, *Cynanchum africanum*, *Lessertia frutescens* ve *Elytropappus rhinocerotis* bitkilerinden elde ettiği ekstrelerin 5 mg/ml konsantrasyonunu 48 saat süresince MCF, HeLa ve CHO hücreleri üzerine uygulayarak DNA fragmentasyonuna sebep olup olmadıkları araştırılmıştır. *Cynanchum africanum*, *Lessertia frutescens*, *Elytropappus rhinocerotis* ve *Haemanthus pubescens* bitkilerinden hazırlanan ekstrelerin diğer 5 bitkiden daha pro-apoptotik aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir. Kanser hücresi olmayan CHO hücrelerinin diğer kanser hücrelerine göre bitki ekstrelerine karşı daha duyarlı oldukları saptanmıştır. *Elytropappus rhinocerotis* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin uygulandığı CHO hücrelerinde apoptozun karakteristik belirteci olan DNA fragmentasyonu tesbit edilmiştir. MCF, HeLa hücrelerinde ise DNA fragmentasyonu gözlenmemiştir. Bu bulgu çalışmamızın sonucu ile paralellik göstermektedir.

Anti-kanserojen yeni ajanların bulunmasında ve türevlerinin oluşturulmasında genellikle doğal ürünlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca bu anti-kanserojen ajanların hangi mekanizmada rol oynadığının bilinmesi de tedavi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada varılan sonuçlar, ülkemize endemik olan *Colchicum* türlerine ait bitkilerden elde edilen ekstralarının HeLa hücreleri üzerine uygulanarak anti-kanserojen etkileri ile beraber apoptotik etkilerinin de belirlenmesi, AI değerlerinin incelenmesi, DNA fragmentasyonu ve *bcl-2* gen ailesine üye pro-apoptotik, anti-apoptotik özelliklere sahip genlerin anlatımına bakılarak moleküler mekanizmasının araştırılması açısından önemlidir. *C.baytopiorum* C.D. bitkisinden hazırlanan ekstrenin B3 konsantrasyonu uygulanan HeLa hücrelerinde *bax* geninin anlatımı gözlenirken, *bcl-2* anlatımının olmaması ve dolayısıyla *bax/bcl-2* oranının *bax* lehine arttığı tespit edildi bu bağlamda yapılan çalışmalar açısından bir ilki teşkil etmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların, gelecekte bitki ekstraları ile yapılması planlanan çalışmalarda ülkemize endemik türlerin kullanımını teşvik edeceği düşünülmektedir. Ayrıca, kanser tedavisinde kullanılan doğal ürünlerin hücresel ve moleküler düzeyde etkilerinin ortaya konması, bu ürünlerin kanser tedavisinde, kemo-radyoterapide etkinliğinin artması konusunda önemli katkıları olacaktır.

KAYNAKLAR

- Anonim-a, 2010, *Morphology of Apoptosis*, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Apoptosis.png>, [Ziyaret Tarihi: 3 Mart 2010].
- Anonim-b, 2009, *Colchicine*, <http://www.pharmacy.vcu.edu/medchem/articles/colchicine/index.html>, [Ziyaret Tarihi: 19 Eylül 2009].
- Anonim-c, 2010, *Microtubule Structure* http://plantphys.info/plant_physiology/cytoskeleton.shtml, [Ziyaret Tarihi: 6 Şubat 2010].
- Anonim-d, 2010, *Colchicum umbrosum*, http://www.bulbsociety.org/GALLERY_OF_THE_WOLDS_BULBS/GRAPHICS/Colchicum/Colchicum_umbrosum/Colchicum_umbrosum.html, [Ziyaret Tarihi: 20 Mart 2010].
- ARORA, S., WANG, X.I., KEENAN, S.M., ANDAYA, C., ZHANG, Q., PENG, Y., WELSH, W.J., 2009, Novel microtubule polymerization inhibitor with potent antiproliferative and antitumor activity, *Cancer Research*, 69 (5), 1910-1915.
- BARGOU, R. C., WAGENER, C., BOMMERT, K., MAPARA, M.Y., DANIEL, P.T., ARNOLD, W., DIETEL, M., GUSKI, H., FELLER, A., ROYER, H. D., DÖRKEN, B., 1996, Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 97 (11), 2651-2659.
- BENITO, A., SILVA, M., GRILLOT, D., NUNEZ, G., FERNANDEZ-LUNA, J. L., 1996, Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by bcl-x_L, *Blood*, 87 (9), 3837-3843.
- BHALLA, K.N., 2003, Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis, *Oncogene*, 22, 9075-9086.
- BÖGLER, O., WELLER, M., 2002, Apoptosis in gliomas, and future treatment, *Frontiers in Bioscience*, 7, 339-353.

- BUNGU, L., FROST, C.L., BRAUNS, S.C., VAN DER VENTER, M., 2006, *Tulbaghia violacea* inhibits growth and induces apoptosis in cancer cells *in vitro*, *African Journal of Biotechnology*, 5 (20), 1936-1943.
- CHANG, H.Y., YANG, X., 2000, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and molecular biology reviews*, 64 (4), 821-826.
- COHEN, G.M., 1997, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. j.*, 326, 1-16.
- COLLAZO, C., CHACÓN, O., BORRÁS, O., 2006, Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals, *Biotechnologia aplicada*, 23 (1), 1-10.
- COMBEAU, C., PROVOST, J., LANCELIN, F., TOURNOUX, Y., PROD'HOMME, F., HERMAN, F., LAVELLE, F., LÉBOUL, J., VUILHORGNE, M., 2000, RPR112378 and RPR115781: two representatives of a new family of microtubule assembly inhibitors, *Molecular Pharmacology*, 57, 553-563.
- CORAZZA, N., KASSAHN, D., JAKOB, S., BADMANN, A., BRUNNER, T., 2009, *TRAIL-Induced Apoptosis Between Tumor Therapy and Immunopathology*, MARC DIEDERICH, Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways, Annals of the New York Akademi of Sciences, New York, 50-58.
- DUMONTET, C., SIKIC, B.I., 1999, Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death, *Journal of Clinical Oncology*, 17 (3), 1061-1070.
- ESSACK, M., 2006, *Screening Extracts of Indigenous South African Plants for the Presence of Anti-cancer Compounds*, MSc. thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Science, University of the Western Cape.
- EVAN, G.I., VOUSDEN K.H., 2001, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature*, 411, 342-347.
- FRENZEL, A., GRESPI, F., CHMELEWSKI, W., VILLUNGER, A., 2009, Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer, *Springer Science*, 14, 584-596.
- FRESHNEY, R.I., 2000, *Cell Lines*, FRESHNEY, R.I., Culture of animal cells: a manual of basic technique, Wiley-Liss, New York, 177-194.
- GORMAN, A.M., BONFOCO, E., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., CECCATELLI, S., 1999, Cytochrome c release and caspase-3 activation during colchicine-induced apoptosis of cerebellar granule cells, *Eur J. Neuroscience*, 11, 1067-1072.

- GOTTARDI, D., ALFARANO, A., DE LEO, A.M., STACCHINI, A., ARAGNO, M., RIGO, A., VENERI, D., ZANOTTI, R., PIZZOLO, G., CALIGARIS-CAPPIO, F., 1996, In leukaemic CD5⁺ B cells the expression of BCL-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis, *British Journal of Haematology*, 94, 612-618.
- HENGARTNER, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-775.
- IGNEY, F.H., KRAMMER, P.H., 2002, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nature Reviews*, 2, 277-288.
- ILGAR, N.I., ÖZCAN ARICAN, G., 2009, Induction of apoptosis and cell proliferation inhibition by paclitaxel in FM3A cell cultures, *African Journal of Biotechnology*, 8 (4), 547-555.
- JORDAN, M.A., WILSON, L., 2004, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nature Reviews*, 4, 253-265.
- KARAGÖZ, A., TURGUT KARA, N., ÇAKIR, Ö., DEMİRGAN, R., ARI, Ş., 2007, Cytotoxic activity of crude extracts from *Astragalus chrysochlorus* (*Leguminosae*), *Biotechnology. & Biotechnoogy Equipment.*, 21 (2), 220-222.
- KIM, S., KIM, S., LEE, S., SONG, Y., 2009, *Involvement of both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in apoptosis induced by genistein in human cervical cancer cells*, MARC DIEDERICH, Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways, *Annals of the New York Akademi of Sciences*, New York, 196-201.
- KRAJEWSKA, M., KRAJEWSKI, S., EPSTEIN, J.I., SHABAIK, A., SAUVAGEOT, J., SONG, K., KITADA, S., REED, J.C., 1996, Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-x, and mcl-1 expression in prostate cancers, *American Journal of Pathology*, 148 (5), 1567-1576.
- KUAN, C., KUIDA, K., 2003, *Apoptosis in action*, YIN, X.M., DONG, Z., Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 163-175.
- LALIER, L., CARTRON, P.F., JUIN, P., NEDELKINA, S., MANON, S., BECHINGER, B., VALLETTE, F.M., 2007, Bax activation and mitochondrial during apoptosis, *Springer Science*, 12, 887-896.
- LEVINE, B., SINHA, S., KROEMER, G., 2008, Bcl2 family members dual regulators of apoptosis and autophagy, *Autophagy*, 4 (5), 600-606.
- LONGLEY, D.B, JOHNSTONE, P.G., 2007, *Molecular basis of disease therapy*, SRIVASTAVA, R., Apoptosis, cell signaling, and human diseases, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 263-278.
- MA, H., SHIEH, K.J., CHEN, G., 2005, Apoptosis, *Nature and Science*, 3 (2), 1-4.

- MARZO, I., NAVAL, J., 2008, Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy, *Biochemical Pharmacology*, 76, 939-946.
- MITCHELL, R.N., COTRAN, R.S., 2003, *Hücre Zedelenmesi, Adaptasyonu ve Ölümü*, ÇEVİKBAŞ, U., Robbins Temel Patoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3-31.
- MITCHELL, R.N., KUMAR V., 2003, *Neoplazi*, ÇEVİKBAŞ, U., Robbins Temel Patoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 166-210.
- MOSSMAN, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- MUÑOZ-GÁMEZ, J.A., MARTÍN-OLIVA, D., AGUILAR-QUESADA, R., CAÑUELO, A., NUÑEZ, M.I., VALENZUELA, M.T., RUIZ DE ALMODÓVAR, J.M., DE MURCIA, G., OLIVER, F.J., 2005, PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis, *Biochem. J.*, 386, 119-125.
- MYCEK, M.J., HARVEY, R.A., CHAMPE, P.C., 1998, *Kemoterapötik İlaçlar*, OKTAY, Ş., Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 373-400.
- O'CONNOR, S., BRIONES, F., CHARI, N.S., CHO, S.H., HAMM, R.L., KADOWAKI, Y., LEE, S., SPUNGERS, K.B., McDONNELL, T.J., 2003, *Apoptosis in action*, YIN, X.M., DONG, Z., Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 177-199.
- ÖKTEM, S., ÖZHAN, M.H., ÖZOL, D., 2001, Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2 (1), 91-95.
- ÖZCAN ARICAN, G., SERBES, U., ARICAN, E., 2008, Evolution of the cytotoxicity interactions between epirubicin and daunorubicin in HeLa cell cultures, *African Journal of Biotechnology*, 7 (6), 706-711.
- ÖZÖREN, N., EL-DEIRY, W.S., 2000, *Introduction to cancer genes and growth control*, EHRLIC, M., DNA alterations in cancer: genetic and epigenetic changes, Eaton Publishing, Natick, MA, 13-43.
- PENG, J., DING, J., TAN, C., BAGGENSTOSS, B., ZHANG, Z., LAPOLLA, S.M., LİN, J., 2009, Oligomerization of membrane-bound Bcl-2 is involved in its pore formation induced by tBid, *Springer Science*, 14, 1145-1153.
- PIRILDAR, S., 2006, *Colchicum baytopiorum C.D. Brickell üzerinde farmakognozik araştırmalar*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı.

- RICCI, M.S., EL-DEIRY, W.S., 2007, *Apoptosis and alternative modes of cell death*, GEWIRTZ, D.A., HOLT, S.E., GRANT, S., Apoptosis, senescence, and cancer, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 31-54.
- SHI, Y., 2003, *Molecules and Pathways of Apoptosis*, YIN, X.M., DONG, Z., Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 47-65.
- SHIMAZU, T., DEGENHARDT, K., NUR-E-KAMAL, A., ZHANG, J., YOSHIDA, T., ZHANG, Y., MATHEW, R., WHITE, E., INOUYE, M., 2007, NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-X_L and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition, *Genes and development*, 21, 929-941.
- SITORUS, R.S., GUMAY, S., VALK, P., 2009, *The apoptotic paradox in retinoblastoma*, MARC DIEDERICH, Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways, Annals of the New York Akademi of Sciences, New York, 77-86.
- TANAKO, F., MIO LI, Y.K., TAKATA, T., MIYAHARA, R., YAGAHIRA, K., OHTAKE, Y., FUKUSE, T., WADA, H., 1999, Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 17 (9), 2728-2736.
- TANG, D.G, KEHRER, J.P., 2007, *Malignant Transformation and Metastasis*, SRIVASTAVA, R., Apoptosis, cell signaling, and human diseases, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 97-117.
- TOMATIR, A.G., 2003, Apoptoz: programlı hücre ölümü, *T Klin Tıp Bilimleri*, 23, 499-508.
- TSUJIMOTO, Y., 1998, Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, *Genes to Cells*, 3, 697-707.
- VOLBRACHT, C., LEIST, M., KOLB, S.A., NICOTERA, P., 2001, Apoptosis in caspase-inhibited neurons, *Molecular Medicine*, 7 (1), 36-48.
- XU, Y., GE, R., DU, J., XIN, H., YI, T., SHENG, J., WANG, Y, LING, C., 2009, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Cancer Letters*, 284, 229-237.
- YILMAZ, İ., 2005, *Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptosis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptosisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.
- YIN, X.M., DING, W.X., ZHAO, Y., 2003, *Molecules and pathways of apoptosis*, YIN, X.M., DONG, Z., Essential of apoptosis: a guide for basic and clinical research, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 13-14.

ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., 2009, Clinical perspectives of cell death: where we are and where to go, *Springer Science*, 14, 333-335.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Hamdullah Suphi Tanrıöver İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Küçükçekmece İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Fahrettin Kerim Gökay Anadolu Lisesi'nde 2001-2002 eğitim-öğretim yılında tamamladım.

Yükseköğrenim hayatıma 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladım ve 2007 yılında mezun oldum. 2007-2008 eğitim-öğretim yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açtığı Genel Biyoloji Yüksek Lisans programına kayıt oldum.

Yüksek Lisans eğitimim süresince XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi'nde sunulan bir akademik çalışmada araştırmacı olarak görev aldım. Halen sürmekte olan 2 adet bilimsel projede araştırmacı olarak akademik çalışmalarımı sürdürmekteyim.