

GAMZE TÜZÜN

***ORIGANUM SIPYLEUM L. (MOR MERCAN) EKSTRAKTININ MEME
KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ANTİPROLİFERATİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ***

CÜSBE

SİVAS

2019



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ORİGANUM SİPYLEUM L. (MOR MERCAN) EKSTRAKTININ
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ANTİPROLİFERATİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ***

GAMZE TÜZÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

SIVAS-2019

**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ORİGANUM SİPYLEUM L. (MOR MERCAN) EKSTRAKTININ
MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ANTİPROLİFERATİF
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ***

GAMZE TÜZÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DR.ÖĞR. ÜYESİ: CEYLAN HEPOKUR**

SİVAS-2019

“*Origanum sipyleum L. (mor mercan)* Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. İlhan YAYLIM



Üye Dr. Öğr. Üye Ceylan HEPOKUR
(Danışman)



Üye Dr. Öğr. Üye Sema MISIR



ONAY

Bu tez çalışması, tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MÜDÜRÜ

YÖNERGE

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



İTHAF

Çalışma sırasında bana destek olan eşime ve aileme...

ÖZET

ORIGANUM SİPYLEUM L. (MOR MERCAN) EKSTRAKTININ MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA ANTİPROLİFERATİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gamze Tüzün

Farmasötik Biyokimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Ceylan Hepokur

2019, 75 Sayfa

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak sürekli çoğalmaları sonucu gelişen tedavi edilmediği takdirde insanı ölüme götüren bir hastalıktır. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen maling tümör olup, metastaz yapmaya yatkın özelliği ile kanser ölümlerinde başlıca sıralardadır. Kanser tedavisi sonucu görülen yan etkiler bu hastalığın tedavi oranındaki yüzdesini düşürmektedir. Bu nedenle sağlık alanındaki çalışmalar kanser de yeni tedavi methodlarına kaymıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda doğal ürünlerin yeni antikanser ajanlar geliştirmek için önemli hedef hale gelmiştir.

Origanum türüne ait çok sayıda bitki bulunmaktadır. Bu bitki türleri uçucu ve aromatik yağlar, sekonder metabolitler nedeniyle birçok sektörde ekonomik öneme sahiptir. Bu bitki türleri genel olarak öksürüğü tedavi etmede, midede gerçekleşen ağrılarda ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde, yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada endemik tür olan *Origanum sipyleum L. (mor mercan)* ekstraktının meme kanser hücre hatlarında antioksidan ve antiproliferatif özellikleri incelenmiştir. Böylece kanser tedavisi için etkili bir terapötik ajan geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Origanum sipyleum L. (mor mercan)*, Antikanser, Antiproliferasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIPROLIFERATIVE PROPERTIES OF *ORIGANUM SIPYLEUM L.* (PURPLE CORAL) EXTRACT IN BREAST CANCER CELL LINES

Gamze Tüzün

Department of Pharmaceutical Biochemistry

Supervisor: Assistant Professor Dr. Ceylan Hepokur

2019, 75 Pages

Cancer is a disease that leads to death if it is not treated as a result of uncontrolled proliferation of cells. Breast cancer is the most common maligning tumor among women in the world and is predominant in cancer deaths due to its ability to metastasize. Side effects seen as a result of cancer treatment reduce the percentage of this disease in the treatment rate. Therefore, studies in the field of health have shifted to new treatment methods. As a result of the studies conducted, natural products have become important targets for developing new anticancer agents.

There are many plants belonging to the *Origanum* species. These plant species have economic importance in many sectors due to volatile and aromatic oils, secondary metabolites. These plant species are commonly used in treating cough, in pain in the stomach and in the treatment of infectious diseases. In this study, the antioxidant and antiproliferative properties of the endemic species *Origanum sipyleum L.* (purple coral) extract in breast cancer cell lines were investigated. Thus, it is aimed to develop an effective therapeutic agent for cancer treatment.

Key Words: *Origanum sipyleum L.*, Cancer, Antioxidant

KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana herşeyde yardımcı olan hoca olmaktan abla kardeş sevgisini aşıl原因an her sorduğum soruyu sabır ve güler yüzlülüğü ile bilimin amacını ve bilimsel düşünmeyi bana öğreten danışman hocam Dr.Öğr. Üyesi Ceylan HEPOKUR'a çok teşekkür ederim.

Akademik sürecim boyunca içimdeki gücü ve enerjiyi bana en fazla hissettiren, sevgisini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen ve bu yola nerdeyse birlikte çıktığım en büyük destekçim çok kıymetli eşim Burak TÜZÜN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana başarabileceklerimin fazlasını hissettiren, büyük bir sabırla ve fedakarlıkla bana yardımcı olup desteklerini esirgemeyen, hep pozitif düşünmemi sağlayan çok değerli Ailem'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YÖNERGE	v
ÖZET.....	vii
KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
KISALTMALAR/SİMGELER.....	xiv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. <i>Origanum Sipyleum L.</i> (mor mercan)	2
2.2.Kanser.....	3
2.3. Metastaz.....	4
2.4 Meme Dokusu ve Morfolojisi	4
2.5 Meme Kanseri.....	6
2.5.1 Noninvaziv Meme Kanseri(İn Situ Karsinom).....	7
2.5.1.1 Duktal Kanser Türü (DCIS).....	7
2.5.1.2 Lobüler Kanser Türü (LCIS)	7
2.5.2 İnvaziv Meme Kanseri.....	8
2.6 Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	9
2.6.1 Apoptoz.....	9
2.6.2 Nekroz.....	11
2.7. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	12
2.8. Flow Sitometri.....	13
2.9. Sitotoksisite Testleri	13
2.9.1 MTT Analizi	14
2.9.2 MTS Analizi	14
2.9.3 WST-1 Analizi.....	14
2.9.4 XTT Analizi.....	14
2.9.5 Elektrikli Hücre-Substrat İç Direnç Algılanması	15
3.MATERYAL VE METHOD.....	16
3.1.Kullanılan cihazlar	16
3.2.Kullanılan kimyasallar.....	17
3.3.Ekstraktların Hazırlanması.....	18

3.4. Antioksidan Kapasite	18
3.4.1. Ekstraktlardaki Toplam Polifenol Tayini	18
3.4.2. Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini.....	19
3.4.3. Ekstraktlarda Demir (Fe+3) İndirgeyici Güç Tayini	20
3.4.4. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini.....	21
3.5. Hücrelerinin Kültüre Edilmesi	22
3.5.1 Hücre Kültürü	22
3.5.2 Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması	22
3.5.3 Hücre Sayımı	23
3.6 Sitotoksosite Testleri	24
3.6.1 <i>Origanum sipyleum L.</i> kanser hücre hatlarındaki IC ₅₀ dozunun belirlenmesi.....	24
3.7 Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi	24
3.7.1 BrdU Yöntemi	24
3.7.2 Flow sitometri (Anneksin V)	25
3.8 İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1 Antioksidan	27
4.1.1 Ekstraktlardaki Toplam Polifenol Tayini	27
4.1.2 Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini.....	28
4.1.3 Ekstraktlarda Demir (Fe+3) İndirgeyici Güç Tayini	28
4.1.4 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini.....	29
4.2 Sitotoksosite Testleri	31
4.2.1 <i>Origanum sipyleum L.</i> kanser hücre hatlarındaki IC ₅₀ dozunun belirlenmesi.....	31
4.3 BRDU Testinin Değerlendirilmesi	35
4.4 Flow sitometri sonuçları	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	45
7. KAYNAKLAR	46
8. ÖZGEÇMİŞ	60

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	17
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri ve üretici firmalar.....	18
Tablo 3. <i>Origanum sipyleum</i> ekstraktlarında toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi.....	20
Tablo 4: <i>Origanum sipyleum</i> ekstraktının flavonoid içeriğinin belirlenmesi	21
Tablo 5: <i>Origanum sipyleum</i> ekstraktının demir (Fe ⁺³) indirgeyici güç tayini.....	22
Tablo 6. <i>Origanum sipyleum L.</i> metanol ekstraktının toplam fenol, toplam flavonoid, toplam demir indirgeyici güç ve antiradikal aktivite kapasiteleri	32
Tablo 7. <i>Origanum sipyleum L.</i> ekstraktının IC ₅₀ değerleri	36
Tablo 8. Flow sitometrisi Annexin V sonuçları.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Origanum sipyleum L.</i> Bitkisi.....	2
Şekil 2. Tümör oluşum evreleri	3
Şekil 3. Memenin iç yapısı	5
Şekil 4. Meme kanseri tanısı	6
Şekil 5. Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolakları .	10
Şekil 6. Renkli Formazan türevini oluşturmak için XTT'nin indirgenmesi	16
Şekil 7. Olympus R1 hücre sayım cihazı	24
Şekil 8. Olympus R1 hücre sayımı için slayt.....	24
Şekil 9. Gallik asit standart grafiği	28
Şekil 10. Quercetin standart grafiği	28
Şekil 11. Askorbik asit standart grafiği	29
Şekil 12. <i>Origanum sipyleum L.</i> bitkisinin DPPH tayin grafiği.....	32
Şekil 13. MCF-7 hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	31
Şekil 14. MCF-7 hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	31
Şekil 15. MDA-MB-231 hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	33
Şekil 16. MDA-MB-231 hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	33
Şekil 17. MCF-10A hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	34
Şekil 18. MCF-10A hücre hattında <i>Origanum sipyleum L.</i> 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)	34
Şekil 19. BRDU standart grafiği ($y=0.0181x + 0.0528$ ($R^2=0.9992$)).....	35
Şekil 20. 24 saat inkübasyon sonrasında %BrdU inkorporasyonu	35
Şekil 21. MDA-MB-231 Annexin V 1. Bölge Q1-LL: Canlı hücre; 2. Bölge Q1-LR: Erken apoptoz; 3. Bölge Q1-UR: Geç apoptoz; 4. Bölge Q1- UL: nekroz evresindeki hücreleri göstermektedir.....	38
Şekil 22. MCF-7 Annexin V 1. Bölge Q1-LL: Canlı hücre; 2. Bölge Q1-LR: Erken apoptoz; 3. Bölge Q1-UR: Geç apoptoz; 4. Bölge Q1-UL: nekroz evresindeki hücreleri göstermektedir.	38
Şekil 23. MCF-10A Annexin V 1. Bölge Q1-LL: Canlı hücre; 2. Bölge Q1- LR: Erken apoptoz; 3. Bölge Q1-UR: Geç apoptoz; 4. Bölge Q1-UL: nekroz evresindeki hücreleri göstermektedir.	39

KISALTMALAR/SİMGELER

AAE	Askorbik asit eşdeğeri
CE	Kuarsetin eşdeğeri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
ECM	Hücre Dışı Matris (Extracelluler matrix)
FBS	Fötal bovin serum (fetal sığır serumu)
GAE	Gallik asit eşdeğeri
IC₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
MCF-7	İnsan meme adenokarsinom hücre serisi
MDA-MB-231	İnsan meme adenokarsinom hücre serisi
MCF-10A	İnsan meme epitel hücre serisi
O₂⁻	Süperoksit
PBS	Fosfat tamponu
TE	Troloks eşdeğeri
XTT	2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

1.GİRİŞ

Kanser; vücuttaki sağlıklı hücrelerin kontrollü bölünebilme yeteneğini kaybederek, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu gelişen patolojik bir hastalıktır [1]. Kanserlerin %10-15 genetiksel faktörlerden olurken, geri kalan kısmı mutajenlere maruz kalarak hücrelerdeki DNA'nın replikasyonu oluşurken ortaya çıkan hatalardır [2-3].

Origanum sipyleum L. halk arasında mor mercan olarak bilinir. Bu familya üyelerinin birçoğu uçucu, aromatik yağlar ve benzeri ikincil metabolitler nedeniyle çeşitli birçok alanda ekonomik öneme sahip bitkilerdir [11]. *Origanum L.* cinsinin dahil olduğu Lamiaceae (Labiatae) familyası dünyada yaklaşık 200 cins ve 3500 türü bulunmaktadır. Ülkemiz birçok türe olduğu gibi *Origanum L.* cinsine ait çok sayıda türün dünyadaki en önemli gen merkezi konumundadır [7-10]. *Origanum L.* cinsi Türkiye florasında da 23 tür ve 5 tür altı takson ile temsil edilmektedir. Bunlardan 15'i yurdumuz için endemiktir. *Origanum* türü genelde Akdeniz havzası ülkeleri başta olmak üzere Avusturalya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülmektedir. [4-6]. *Origanum L.* türünün yaklaşık birçoğu (~%75'i) özellikle Doğu Akdeniz bölgesinde doğal yayılış göstermektedir. *Origanum L.* yapılan çalışmalarda yüksek antioksidan özellik gösterdiği görülmektedir [5-7-8]. *Origanum L.* halk arasında şifalı bitkiler sınıfında kullanılıp, çay olarak içilmektedir. Halk tıbbında soğuk algınlığı, gastrointestinal rahatsızlıklara bağlı öksürük tedavisinde, sinir sistemi uyarıcı hastalıklarda, analjezik ve mide ağrılarında kullanılmaktadır [12]

Bu tez çalışmasında; Pamukkale yöresinden toplanılan endemik tür olan *Origanum sipyleum L.* (mor mercan)'nın antioksidan ve meme kanseri hücre üzerine antiproliferatif özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 *Origanum Sipyleum L.* (mor mercan)

Origanum kelime anlamı olarak “dağların süsü” demektir (Şekil 1). Halk arasında bayır kekiği, bayır çayı ya da güvey otu olarak bilinir. *Origanum* türünün birçok morfolojik türü vardır [13]. Yeryüzünde 39 türü bulunan *Origanum*'un 23 türü Türkiye sınırları içerisindedir ve bunlar çoğunlukla Doğu Akdeniz bölgesinde yayılış göstermektedir. *Origanum* türleri genelde pembe çiçekleri olan 80 cm boyunda çok yıllık yarı çalı veya otsu yapıda olmaktadır. Gövdesi yüksek, dik ve çok az dallanmış yapıdadır. Yaprakları ise genellikle sapsızdır. Bu türler ılık iklimleri tercih ederler soğuk iklimlerde fazla dayanıklı değildir [14]. *Origanum* türleri genel olarak Nisan-Mayıs aylarında çiçek açarlar. Deniz seviyesinde 100 ile 1500 m arasında değişen yükseltilerde uygun iklim koşulları altında 3-4 yıllık ömre sahiptirler. *Origanum*'un besin bakımından zengin, kurak, kayalık ve kireçli topraklarda iyi yetişir [15].



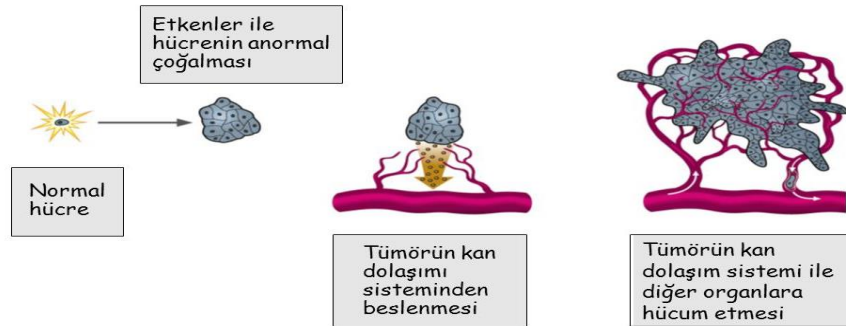
Şekil 1. *Origanum sipyleum L.* Bitkisi [16]

Origanum da yüksek miktarda karvakrol, timol ve p-simen bileşenleri bulunduğu belirtilmektedir [17]. Halk arasında *Origanum* bitkileri çay olarak veya yiyecekler de katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. *O. Sipyleum* genel olarak soğuk algınlığına bağlı öksürüğü tedavi etmede, mide ağrılarında ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [18-19].

2.2 Kanser

Kanser, dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır [20]. Genel olarak, sağlıklı insan hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünerek çoğalabilme yeteneğine sahiptirler. Yaralanan, hasar gören ve ölen hücreler yenilenmesi esnasında bu yeteneğini kullanırlar. Sağlıklı bir hücrenin yaşadığı süre boyunca belirli bir bölünme sayısı vardır. Bir hücre ne zaman ve ne kadar bölünebileceğini bilir [21]. Bunun tersi olarak kanserli hücreler de bu bilinci kaybetmiştir. Bu hücreler kontrolsüz ve farklı bir hücre yapısında çoğalırlar. Bu çoğalma sonucunda bir araya gelerek tümörleri meydana getirirler [22]. Tümörler sağlıklı hücrelerden oluşan dokuların içine sızabilirler, onları sıkıştırabilir veya zarar vererek yok edebilirler. Oluşan tümörlerden kanser hücreleri ayrılarak kan veya lenf dolaşımı aracılığıyla diğer organ ve dokulara yayılabilir (Şekil 2). Kanser hücrelerinin vücudun diğer organ ve dokulara yayılması olayına “metastaz” denir. Bu hücreler yayıldıkları organ ve dokularda yeni tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler [23].

Kanserin nedeni günümüzde tam olarak bilinmese de kanser hastalığına sebep olacak iki temel faktör üzerinde durulmaktadır. Bu faktörlerden birincisi kalıtsal faktörler ikincisi ise çevresel faktörlerdir. Kalıtsal faktörler ebeveynden çocuğuna geçen genetik yollarla ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. Çevresel faktörler ise sigara, alkol kullanımı, bazı kimyasal maddeler ve aşırı radyasyona maruz kalma gibi birçok sebebi bulunmaktadır [24-36]. Kanserin teşhisi ve tanısı tümörün bulunduğu doku ve organa göre değişmektedir.



Şekil 2. Tümör oluşum evreleri [37]

2.3 Metastaz

Tümör hücrelerinin genomunda çeşitli bölgelerde nokta mutasyonlar veya kromozom bütünlük değişimleri meydana gelir. Oluşan bu değişimler lamininleri, proteaz inhibitörleri, onkogenleri, HIF-1'i ve tümör supresör genleri gibi metastaz ilişkili genleri etkileyebilir [38].

Metastaz, primer tümör bölgesinden kanser hücrelerinin uzaklaşarak lenf veya kan dolaşımı ile diğer organ veya dokulara gitmesi, ulaştığı dokularda ise ikincil bir kanser gelişimine sebep olması durumudur. Birçok kanserde görülen ölüm sebebi, daha çok metastaz gelişimidir [39]. Metastaz, birçok basamaktan oluşmaktadır;

1. Yeni damar oluşumu (anjiyogenez),
2. Primer tümörden metastatik hücrelerin ayrılması (ayrılma ve migrasyon),
3. Tümör bazal membranı ve ECM aracılığıyla invazyon,
4. Bölgesel lenf ve kan damar endotelyumuna intravazyon,
5. Lenf veya kan damarları ile metastatik hücrenin hedef organa ulaşması,
6. Hedef organın endotelial hücrelerine ekstrasvazyon,
7. Mikrometastaz,
8. Makrometastaz [40].

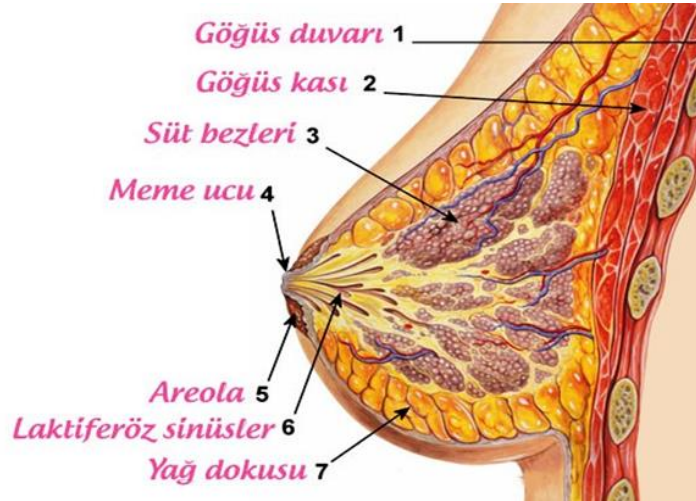
Primer tümör, gelişme sürecinde çok daha fazla besine ve oksijene ihtiyaç duyar. Daha sonra birtakım anjiyogenik faktörler sentezler ve yeni damar oluşumunu uyarır. Devamında ise komşu hücrelerle arasındaki bağları koparır ve hücreler primer tümörden ayrılmaya başlar. ECM'den geçen tümör hücreleri burada ilerlemeye başlar ve dolaşım sistemine katılır [41].

2.4 Meme Dokusu ve Morfolojisi

İnsan vücudunun göğüs kafesi hizasında iki yanda simetrik duran ve epidermisten kaynaklanan organa meme denir [42-46]. Meme göğüs ön duvarındaki “pektoralis majör”, “oblikus eksternus abdominis” ve “serratus anterior” kaslarının önünde bulunur [47]. Bu kaslarla meme arasında “derin fasya” adı verilen bir zar bulunur. Bu zarla meme arasında gevşek bağ dokusundan yapılmış yapılar bulunmaktadır. Erkeklerde normal koşullarda hayatları boyunca gelişmeyen memeler bulunurken, kadınlarda hayatlarının belli dönemlerinde büyüklük, hacim, biçim ve görev bakımından farklılık gösterirler.

Memedeki ilk gelişme belirtileri kız ve erkek çocuklarında ergenlik dönemi öncesindedir. Ergenlik dönemi öncesinde meme başını çevreleyen kabarcık kısma “Areola” denir. Bu kısım deri rengine kıyasla daha koyu renklidir [48]. Meme ucu çevresinde bulunan “areola” etrafında bazen küçük kabarcıklar görülmektedir [49]. Bu küçük kabarcıklara “Montgomery”, “Morgagni” bezleri olarak adlandırılır. Memenin orta bölgesinin ön yüzünde “papilla” denilen meme ucu bulunur. Bu meme ucunda düz kaslar ve içerisinde on beşin üzerinde süt kanalı bulunmaktadır [50,51]. Ergenlik dönemine süresince memelerdeki büyüme hızı artarak devam eder ve bu dönemde bütünüyle belirginleşirler. Bu dönemlerde gelişimin hızlı artmasından dolayı memeler arasında eşitsizlikler oluşabilir. Bu durum genellikle geçicidir ve ergenlik dönemi sonunda son bulur. Bazı kadınların memelerinde koltuk altına doğru olan bir uzantıya meme kuyruğu denmektedir [52,53]

Memenin iç yapısı süt üreten lobüllerle, sütü meme ucuna ileten kanallarla (duktus) ve bunları bir arada tutan yağ dokusu ile fibroz bağ dokusundan oluşur (Şekil 3). Yağ ve fibroz dokusu birleşimine grandüler denilmektedir. Memeye hacim ve şeklini verir. Lobüller ve süt kanalları sütün üretiminden ve aktarılmasından sorumludur [54].



Şekil 3. Memenin iç yapısı [55]

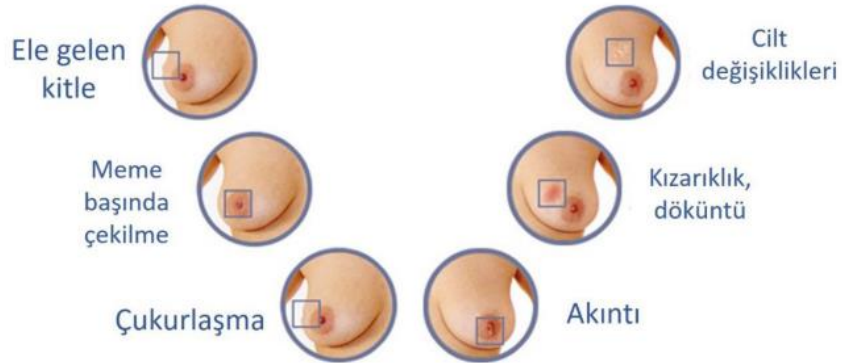
Genellikle koni şeklinde olan memelerin hacmi ve biçimi kadınların yaşına göre değişmektedir. Yoğun memelere sahip bayanlarda kötü huylu kitleleler muayeneler sırasında gözden kaçabilmektedir. Bunun için 40 yaş üstü

hastalarda mammografi çekilmeleri önerilirken, tanı için meme ultrasonografisi ve meme MR'ı yapılması tavsiye edilmektedir [24-36].

2.5 Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en yaygın olarak görülen kanser türlerinden biridir. Meme kanserinin başlama sebebi kesin olarak bilinmemesine rağmen genetik yatkınlık oluşturan gen mutasyonları bu kanserin başlıca sebeplerindedir. Meme kanseri, meme organında bulunan dokularda anormal gelişen hücrelerden kaynaklanır. Bu anormal gelişme, meme dokusunun herhangi bir bölgesinden oluşabilir [56]. Kadınlarda oluşan meme kanseri başlangıçta süt bezeleri veya sütü meme başına taşıyan hücrelerde gerçekleşmektedir [22,56,57].

Meme kanserinde “Moleküler Sınıflama” terminolojisi, ilk defa 2000 yılında Perou ve Sorlie tarafından yapılan kapsamlı bir çalışma sonucunda belirtilmiştir. Meme kanseri östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2/neu) ile beraber belli başlı proteinlerin ekspresyonunu yapmasına göre pozitif veya negatif olarak sınıflandırılırlar [58,59]. Bu reseptörlerin gen ekspresyon seviyelerinin yükselmesi veya azalması karşısında meme kanseri hücrelerinin biyolojik yapısını değiştirdiği için tedavi yöntemlerinde de değişiklikler görülmektedir. Meme kanserinin diğer sınıflandırması ise Luminal A, Luminal B, ERBB2 (HER2), bazal ve normal olmak üzere beş alt grupta ifade edilmektedir [60].



Şekil 4. Meme kanseri tanısı [61]

Meme kanserinin en yaygın görülen türleri ise meme lobülünde veya meme kanalında görülen türleridir. [62]. Ayrıca meme kanseri hücreleri veya tümörleri insitu (noninvaziv) ve invaziv olmak üzere iki temel başlıkta incelenmektedir. Kanseri hücrelerin bir araya gelerek oluşturduğu tümörlü hücreler çoğaldıkları ve geliştiği dokularda kalıyorsa bu insute ya da noninvaziv olarak tanımlanır. İnsute kanser türü duktal ve lobüller olmak üzere iki çeşittir. Meydana gelen kanserli hücrelerin süt kanalları ve lobülleri geçip lenf sistemi, kemik dokusu ve bunun sonucunda vücuttaki diğer organlara yayılmasına invaziv olarak adlandırılmaktadır [63].

2.5.1 Noninvaziv Meme Kanseri(İn Situ Karsinom)

2.5.1.1 Duktal Kanser Türü (DCIS)

Duktal karsinoma in situ (DCIS) meme kanserinin erken ya da pre-invaziv evresidir. İnvaziv meme kanserinin aksine, tümör hücreleri meme içindeki süt kanallarına hapsolmuştur. Meme dokusunu çevreleyen kanalların duvarlarını aşamazlar. Böylece lenf ve dolaşım sistemine yayılma yetenekleri yoktur. DCIS invaziv türde olmasada, meme kanseri olarak kabul edilir. Tedavi yöntemleri invaziv meme kanseri ile benzerlik gösterir. DCIS sadece memede olan lokal bir hastalık olması nedeniyle gerçekte kişinin hayatını değil memesini tehdit eden bir hastalıktır [64]. Duktal meme kanseri türü derece olarak üç sınıfı bulunmaktadır: yüksek, orta, düşük. Yüksek dereceli duktal kanser türünde tümör hücreleri çok hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Tedavi sonrası yineleme eylemi çok yüksektir ve meme kanserine dönüşmeye çok yatkındır [64]. Yüksek ve orta dereceli duktal meme kanserinde tek en önemli tedavi ameliyattır. Bu ameliyat içerisinde tümörün etrafında bulunan bir miktar sağlıklı doku ile beraber çıkarılmaktadır. Bu meme kanseri cerrahisi “geniş-bölgesel eksizyon” veya “lumpektomi” olarak adlandırılmaktadır. Bu gibi durumlarda ameliyat kesin çözüm değildir ve hastaların 6-12 ayda bir rutin bir takip programına uyarak takip edilmektedir [64].

2.5.1.2 Lobüler Kanser Türü (LCIS)

Lobüler karsinoma süt bezleri içinde sınırlı olan türdür. Lobüler karsinoma in situ çok tartışmalı bir terimdir; bazıları bu lezyonu “lobüler neoplazi” olarak tanımlamayı tercih ederler. Kanseri ya da kanser prekürsörü

değildir. Meme kanseri gelişiminde bir risk faktörüdür. Bazen DCIS'dan ayrımı zor olabilir. Genellikle makro boyutta bir lezyon oluşturmazlar, başka nedenlerle eksize edilen meme biopsilerinde tanı alırlar. Aynı şekilde mamografik olarak da özel bir görüntüleri yoktur. Lobüler neoplazi, terminal duktal lobüler unit içinde proliferasyon olarak bu üniteyi dolduran ya da distorsiyona uğratan uniform hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler küçük boyutlu olup, düzgün yuvarlak nüveleri ve dar bir stoplazmaları vardır. Nükleol belirsiz ya da küçüktür. Bazen intrasitoplazmik lümen varlığı görülebilir. Lobüler neoplazi fibroadenom, radial skar ve sklerozan adenozis gibi bazı benign meme lezyonlarının içinde de görülebilmektedir. İn situ lobüler karsinomun en önemli ayırıcı tanısı intraduktal karsinomun lobüler tutumu ile yapılmalıdır. İn situ lobüler karsinom duktuslara yayılırken genelde pagetoid bir görünüm sergiler ve lobulosentriktir. İntraduktal karsinomun özellikle küçük hücrelerden oluşan solid tipi in situ lobüler karsinom ile karışabilmektedir. İntraduktal karsinomların büyük hücrelerden oluşan tiplerinde nüve sitoplazma oranı, hücre boyutu, mitoz, nekroz gibi özellikler dikkate alınarak ayırım yapmak daha kolaydır [65].

2.5.2 İnvaziv Meme Kanseri

İnvaziv meme kanseri meme kanserinin en sık görülen çeşididir. Öyle ki “meme kanseri” ve “invaziv meme kanseri” eş anlamlı ifadeler olarak kullanılmaktadır. İnvaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinom en sık görülen alt türlerdir. Süt bezleri veya süt kanallarına yayılmış ve vücudun diğer bölümlerine yayılma potansiyeli olan kanserlerdir. Bu kanser türünün birçok çeşidi bulunmaktadır [66,67]. Bunlar;

1. İnvaziv Duktal Meme Kanseri Türü
2. İnvaziv Lobüler Meme Kanseri Türü
3. Tubuler Meme Kanseri Türü
4. İnvaziv Kribriform Meme Kanseri Türü
5. Medular Meme Kanseri Türü
6. Müsinoz Meme Kanseri Türü
7. İnvaziv Papiller Meme Kanseri Türü
8. İnvaziv Mikropapiller Meme Kanseri Türü
9. Apokrin Meme Kanseri Türü

10. Sekretuar Meme Kanser Türü
11. Adenoid Kist Meme Kanser Türü
12. Metaplazi ile Birlikte Olan Meme Kanser Türü
13. Nöroendokrin Meme Kanser Türü
14. İnflamatuar Meme Kanser Türü

2.6 Hücre Ölüm Mekanizmaları

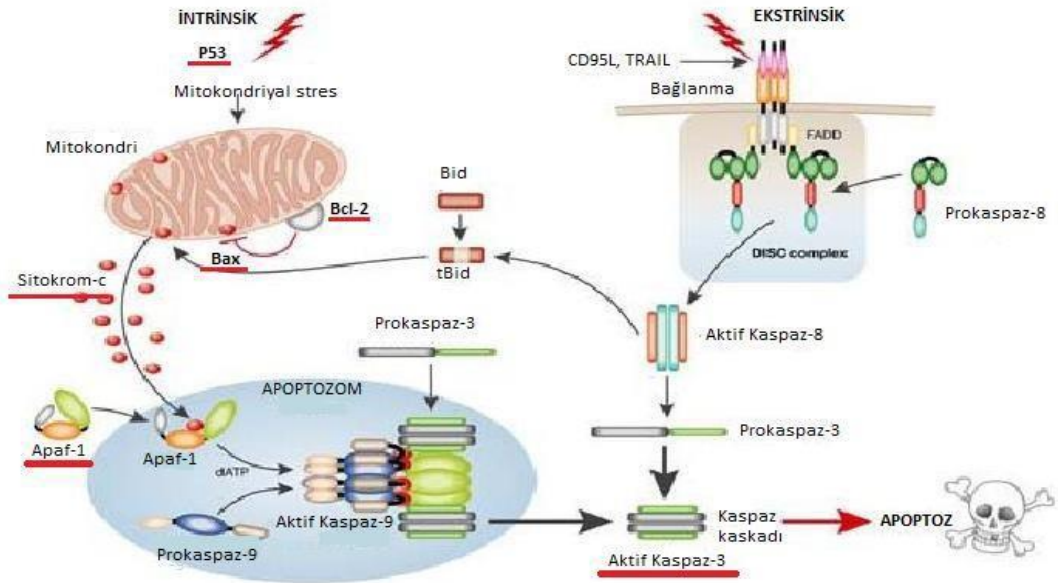
2.6.1 Apoptoz

Apoptozis Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş son baharda yaprak dökümü anlamına gelen bir kelimedir. Apoptoz, hücrelerin belirlenmiş biyolojik görevlerini yerine getirdikten sonra güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlayan, genetik regülasyona sahip programlanmış bir hücre ölüm şekli olup embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam süresince programlı hücre ölümü ve apoptotik mekanizma vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bazıları ise sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, immün sistem ve gastrointestinal sistem gibi pek çok dokuda devamlılık hücre yenilenmesi ve apoptozise bağlıdır [68]. Hücrenin apoptozu geçmesinin nedeni kromatin yoğunlaşmaya başlamadan kısa bir süre önce, hücrenin günlük aktivitelerinin yapılması için sinyal iletiminde kullanılan kalsiyumun sitoplazma içi derişimini artırmasıdır [69]. Kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutaminaz hücrede bulunan sessiz enzimler arasındadır. Hücre içindeki bu kalsiyum artışı sessiz enzimleri aktive ederek hücrede değişikliklere neden olur. Apoptozun geç evrelerinde ise kalsiyum derişiminde artışı gözlenmektedir (Bu da kalsiyumun hücrede farklı görevler üstlendiğini gösterir). Bu artış çekirdekdeki endojen kalsiyum-magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu nükleazlar hücrelerde devamlı olarak görülürken bazılarında ise apoptozdan bir süre önce gözlemlenmektedir. Hücredeki apoptozun en belirgin özelliği olan sitoplazmik yoğunlaşmanın mekanizması günümüzde hala bilinmemektedir. Hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşur ve sonrasında hücre içeriğini ayıran apoptotik cisimler oluşmaya başlar [70].

Apoptozun regülasyonu, hücre içi ve hücre dışı kaynaklı birçok faktörler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu faktörler arasında apoptozu tetikleyerek

sinyal yolağını başlatan faktörlere “pro-apoptotik”, hücre ölümünü engelleyen ve apoptoz sinyali yolağını baskılayan faktörlere “anti-apoptotik” adı verilir. AIDS, Alzheimer, Parkinson, insüline bağlı tip 2 diyabet, hepatit C gibi birçok hastalık apoptozun hızlanmasına sebep olurken otoimmün hastalıklar ve kanserde apoptoz süreci yavaşlar [69,70]. Apoptoz yolları *dışsal* ve *içsel* yolak olmak üzere iki kısımdan oluşur. Dışsal yolak (**ekstrinsik**) dıştan gelen ölüm sinyallerinin kendine özgü yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla oluşurken içsel yolak (**intrinsik**) hücre içindeki hedeflere doğrudan etki eden ve reseptör aracılığı olmayan mitokondriyal olarak başlatılan olaylar dizisinden oluşmaktadır. Genel olarak her iki yolak da Kaspaz-3 aktivasyonunda birleşir (Şekil 5) [71].

Dışsal yoldan gelen sinyallerin uyarılarının tetiklediği, tümör nekroz faktörü (TNF), CD95L veya TRAIL ölüm ligandlarının bir başka hücrenin zarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanmalarından sonra tetiklenmektedir. Bu reseptörler apoptoz sinyalini hücre içine iletirler. Reseptörler ligantlara bağlandığında hücre içinde ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu bağlanma ile birlikte pro-kaspaz 8 aktifleşir. Aktif Kaspaz-8, ya direkt Kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayarak apoptozun oluşumuna neden olur ya da Bid genin aktivasyonu ile Sitokrom-c'nin salınımını gerçekleştirerek mitokondriyal yolağın aktivasyonuna sebep olmaktadır [72].



Şekil 5. Apoptoz olayının dışsal (ekstrinsik) ve içsel (intrinsik) yolları [73]

İçsel apoptoz yolağında en önemli organel mitokondridir. "Mitokondriyel yolak" da denilen içsel yolakta tümör baskılayıcı/supresör p53, antiapoptik ve proapoptotik genleri barındıran Bcl-2 ailesi, apaf-1, kaspazlar, sitokrom-c gibi genlerin apoptozu oluşturma ya da apoptozun engellenmesinde rolleri vardır [71].

Ölüm sinyalinin alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak diğer komşu hücrelerle bağlantısını koparmakta ve büzüşmeye başlamaktadır. Hücre apoptoza özgü piknotik bir görünüm almaktadır. Hücre DNA'sı nukleozomlarından 180-200 baz çifti veya katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde kesilmekte, jel elektroforezinde merdiven bant görüntüsünü oluşturmaktadır [74]. Tüm bu metabolik olaylar gerçekleşirken hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korumaktadır. Hücre zarı yapısında bulunan fosfolipidlerin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olmasıyla çekirdek küçülme ve parçalara ayrılmaktadır. Hücre zarla birlikte tomurcuk şeklinde kopmaktadır. Bu kopan hücrelere apoptotik cisimcik denmektedir. Apoptotik cisimler, nükleer fragmanlı ya da nükleer fragman içermeyen sıkı bir paketlenmiş organellerin bulunduğu sitoplazmadan oluşmaktadır. Organellerin bütünlüğü henüz bozulmayan bu apoptotik cisimler daha sonra makrofajlar, parenkimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilmektedirler. Fagolizozomlar içinde bozunma gerçekleşmektedir. Apoptotik cisimcikler genellikle makrofajlar tarafından tanınmakta ve fagosite edilmektedirler. Makrofajlar çoğunlukla lenfoid foliküllerin rejeneratif germinal merkezlerinde veya timik kortekste yer almaktadırlar. Apoptoz süresince hiçbir enflamasyon reaksiyonu oluşmamaktadır. Çünkü apoptotik hücreler, hücre bileşenlerini çevre interstisyel dokuya salmamakta ve çevrelendikleri hücreler tarafından hemen fagosite edilmektedirler. Bu durum sekonder nekrozu önlemektedir. Ayrıca sızan hücreler de anti- inflamatuvar sitokinler üretmemektedir [75].

2.6.2 Nekroz

Nekroz hücre ölümünün akut bir şekli olup dışarıdan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu meydana gelir. Adenozin trifosfat (ATP) kaybı, iyon gradientlerinin yok olması, hücre şişmesi ve sonuç olarak hücre lizisiyle karakterizedir. Böylece nekroz; hücre içeriklerinin çevreye

salıverilmesine bağlı olarak, çevreleyen bölgede enflamasyona neden olur. Hücre zedelenmesi sonucu hücrede gelişen geri dönüşü olmayan hasar, hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Nekrotik hücre ölümüne genellikle yüksek toksin seviyeleri gibi, ciddi hücresel streslerden kaynaklanır. Nekroz programlanmış bir hücre ölümü değildir ve oluşmasında tanımlanabilen biyokimyasal bir yolak yoktur. Nekroz başladığında, terapötik müdahaleler için çok fazla olasılık yoktur [76].

2.7 Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz, sadece gelişim, hücre popülasyonun korunması ve yaşlanması gibi hemostatik dengenin korunmasını sağlayan bir mekanizma olmayıp; hasarlı, enfekte veya aşırı strese maruz kalmış hücrelerin eliminasyonu için de oldukça önemli bir süreçtir. Apoptoz birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli rol oynar [77].

Apoptozun nitel ve nicel olarak incelenmesinde: Morfolojik görüntüleme (Işık, floresan, faz kontrast veya elektron mikroskopisi), İmmünohistokimyasal (Annexin V-FITC, TUNEL, M30 antijen veya kaspaz 3deteksiyonu), Biyokimyasal (DNA-protein bazlı elektroforez veya akım sitometrisi bazlı metotlar), İmmünolojik (ELISA) moleküler biyoloji (Array-bazlı teknikler) gibi tekniklerin ön plana çıktığı görülmektedir. Kullanılacak yöntemlerin seçiminde örnek türü ve deney kurgusu önem taşımaktadır [78].

Apoptozun varlığının gösterilmesi amacıyla mikroskopik tekniklere başvurulmasına rağmen, apoptotik cisimcikler makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından ortadan kaldırıldığı için apoptozun sayısal olarak ifade edilmesinde bu yöntemler yetersiz kalmaktadır [79].

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick endlabelling) yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler ve hücre kültürü çalışmalarında apoptozisin varlığı bu yöntemle belirlenebilir [80].

Annexin V, fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için floresan bir madde ile işaretilenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir [77]. Analizlerde Annexin V-FITC ve canlılığın tespiti için propidyum iyodür (PI) kombine boyları 50 kullanılmaktadır. Apoptotik hücreler annexin V ile

boyanıp PI ile boyanmazlarken apoptoz süreci uzadıkça bu hücrelerde de PI alınımı gözlenebilmektedir [81].

Apoptozun en önemli aktörlerinden kaspazların aktivitelerinin ortaya konulması da başka bir yaklaşımdır [79].

Western blot metoduyla apoptozise özgü proteinlerin (örn; Bcl-2) eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn; kaspaz-3) saptanması mümkündür. Moleküllerin mitokondriden çıkıp çıkmadığının (sitokrom c) tespiti de bu metotla belirlenebilir [80].

2.8 Flow Sitometri

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir [81]. Flow sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Günümüzde flow sitometri ya da akım sitometri terimleri kullanılmaktadır. Flow sitometrinin temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüleritesi açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce floresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya (nükleik asitlere özel propidium iodide) kullanılarak işaretlenir [82].

Flow sitometri floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granüleritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir [83]. Hücreler hakkında elde edilen veriler grafik haline getirilmekte, istatistiksel analiz uygulanmakta ve yorumlanmaktadır [82].

Son yıllarda flow sitometri yöntemi özellikle biyokimya, immünoloji, hematoloji, onkoloji, moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, parazitoloji, enfeksiyon, yardımcı üreme teknikleri, patoloji, radyasyon onkolojisi, enfeksiyon hastalıkları, bitki biyolojisi ve deniz biyolojisi alanlarında klinik ve araştırma laboratuvarlarında sıklıkla tercih edilmektedir [84,85].

2.9 Sitotoksosite Testleri

Hücre canlılığının, çoğalmasının ve sitotoksitesinin tayin edilebilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Sitotoksosite testleri genellikle luminometrik ya da kolorimetrik ölçüm esasına dayanan yöntemlerdir [86].

Sitotoksosite değerlendirilmesi için birçok yöntem kullanılabilir. Membran bütünlüğünün değerlendirilmesi sitotoksiteyi ve hücre canlılığı

değerlendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitotoksik etkileri olan maddeler hücre bütünlüğüne zarar vermektedirler. Propidiyum iyodine ya da Tripan mavisi gibi canlı boyalar normal koşullarda canlı hücrelerin içinde bulunmamaktadır. Ancak hücre zarı zarar görmüşse, basit bir şekilde hücre içine girip hücre içi elemanları boyaya bilmektedirler [87].

2.9.1 MTT Analizi

İlk olarak Mosmann (1983) tarafından tanımlanmış ve daha sonra Alley et al. (1988) tarafından geliştirilmiştir. MTT [3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] yöntemi hücre canlılığının tayin edilebilmesi için sıkça kullanılmaktadır [88].

MTT, aktif olarak hücrelere absorbe olan ve mitokondri ile ilişkili bir reaksiyonla suda çözünmeyen, renkli formazana indirgenen bir maddedir. MTT'yi indirgeme özelliği hücre canlılığının bir ölçütü olarak alınmakta ve MTT analizi ile elde edilen boya konsantrasyonu canlı hücre sayısı ile bir bağıntı göstermektedir [88].

2.9.2 MTS Analizi

Hücrelerin canlılığını belirlemede kullanılan MTS [3-(4, 5-dimethyl thiazol- 2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] testi; 37 °C'de yaşayan hücrelerin, tetrazolium tuzunu (suda çözünen formazon ürünü) mitokondriyal aktiviteleri sonucu renkli bir yapıya dönüştürmesi temeline dayanmaktadır [89].

2.9.3 WST-1 Analizi

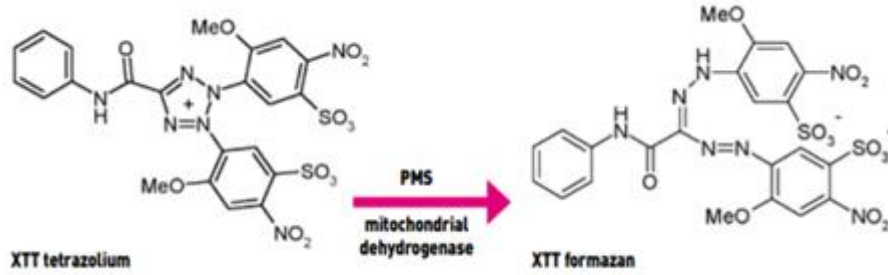
Hücre sitotoksitenin ve proliferasyonunun belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Süspansiyon halindeki veya yapışık hücreler bir mikro levhada kültür edilir, sonrasında WST-1 ile inkübe edilirler ve değerlendirilmesi spektrofotometre ile yapılmaktadır. Bu analizin esası; hücresel dehidrogenaz sonucu tetrazolium tuzunun WST-1'in redüksiyonu ile formazana dönüşmesi ve spektrofotometre ile görüntülenmesidir [90].

2.9.4 XTT Analizi

XTT metodu ilk olarak 1988 yılında P.A. Scudiero tarafından adlandırılmıştır. XTT metotunun kullanıma başlanması, proliferasyon ölçümü prosedürünü büyük oranda rahatlatmıştır. Bu kit, hücre proliferasyonunun çeşitli

büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ilişkili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır. XTT, hücrelerden ^{51}Cr salınımı temeline dayanan sitotoksik testlerin yerini almaktadır [91].

Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır (Şekil 6) [92]. Oluşan boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla 450 nanometre dalga boyunda okunabilmektedir. Boya duyarlılığı, aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olarak değişmektedir. Test prosedürü hücrelerin 96 kuyucuklu plaklarda kültüre edilip, XTT ajanının eklenerek 2-4 saat inkübasyonda bekletilmesi prensibine dayanmaktadır. İnkübasyon süresi boyunca, duyarlılığı bir spektrofotometre (ELISA okuyucu) ile ölçülebilen turuncu renk oluşmaktadır. Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile orantılıdır [93].



Şekil 6. Renkli Formazan türevini oluşturmak için XTT'nin indirgenmesi [94]

2.9.5 Elektrikli Hücre-Substrat İç Direnç Algılanması

Hücreler ince altın elektrotlar bulunduran küçük bir düzlem üzerindeki petrilere ekilir. Hücrelerle kaplanmış elektrotların iç direnci farklı zaman aralıklarında fonksiyona bağlı olarak ölçülmektedir. Hücrelerin yalıtkan davranış sergilemesi membranlarının izole edici özelliklerine bağlıdır. Buna bağlı olarak iç direnç, hücrelerin sayısının arttığı bölgelerde artmaktadır [95].

3.MATERYAL VE METHOD

3.1 Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -80°	Nüve
Derin dondurucu, -20°	Bosch
Dalga boyu ayarlanabilir mikropleyt okuyucu	SPECTROstar nano
Hücre sayımı	Olympus R1
Etüv	Binder
Çalkalayıcı	New Brunswick Scientific
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	ACCUMAX
Mikro santrifüj	Thermo IEC Micromax
pH-metre	Hanna Instruments
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	ZEISS
CO ₂ inkübatör	NÜVE EC-160
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	NestBiotechnology
Santrifüj	Allegra X-15R
Cam malzemeler (beher, erlen, balon joje)	Isolab
Flow sitometri	Beckman Coulter
Hassas analitik terazi	Shimadzu
Vorteks	IKA vortex genius 3
Steril 96 kuyucuklu hücre kültür pleytleri	Biologix
Çeşitli hacimlerde steril Pipet uçları	Axygen
Otoklav	Biobase

3.2 Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları, Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, yapıları ve üretici firmalar

Kullanılan maddeler	Üretici firma
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck
Metanol (CH ₃ OH)	Merck
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma
Gallik asit	Sigma
Kuersetin dihidrat	Sigma
Alüminyum nitrat nonahidrat (Al(NO ₃) ₃ .9H ₂ O)	Sigma
Potasyum asetat (KCH ₃ COO)	Merck
DMEM besi yeri	Capricorn
Penisilin/Streptomisin	Capricorn
PBS tablet	Medicano
Tripsin/EDTA çözeltisi	Capricorn
Fetal bovine serum (FBS)	Capricorn
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Tripan blue çözeltisi	Sigma
Demir (III) klorür	Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Merck
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Merck
Potasyum hekzasiyanoferrat (III) (K ₃ Fe(CN) ₆)	Sigma
Trikloroasetik asit (TCA)	Merck

3.3 Ekstraktların Hazırlanması

Araziden toplanan *Origanum sipyleum L.* bitkisinin yaprakları önce çeşme suyu, ardından distile su ile yıkandı. Laboratuvar ortamında 2 hafta boyunca kurutuldu. 100 gr *Origanum sipyleum L.* bitkisinden alınarak 1000 mL metanol içine konularak 45 dk boyunca 45 °C’de, ultrasonik banyoda sonikize edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Elde edilen örnek evaporatörde uçuruldu ve ekstrakt deney süresine kadar -20°C bekletildi [96].

3.4 Antioksidan Kapasite

3.4.1 Ekstraktlardaki Toplam Polifenol Tayini

Ekstraktların toplam polifenol içeriği, modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Metod, fosfotungstik asitin ($H_3P[W_3O_{10}]_4$) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan fosfotungstik mavisinin absorbanansı, aromatik fenolik grupların sayısı ile orantılıdır ve toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanıldı [97].

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- %20’ lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 50 ml’ ye tamamlandı.
- 1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi: 1 ml 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi, 9 ml saf su eklenerek 1:10 oranında seyreltilti. Tayin öncesi hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.
- Standartlar: 0.01 g gallik asit 1 ml saf su ile çözülerek 10 000 $\mu g/ml$ ’ lik gallik asit standardı elde edildi. Bundan 1000 $\mu g/ml$ ’ lik standart hazırlanarak saf su ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 $\mu g/ml$ ’ lik gallik asit standartları meydana getirildi.

Deneyin Yapılışı

Pipetlemeler 96 kuyucuklu mikroplyete Tablo 3’teki şekilde yapıldı.

Tablo 3. *Origanum sipyleum L.* ekstraktının toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su / Metanol	12.5 µl	-	-
Ekstrakt	-	12.5 µl	-
Standart	-	-	12.5 µl
1:10 Folin-Ciocalteu Reaktifi	62.5 µl	62.5 µl	62.5 µl
%20' lik Na ₂ CO ₃	125 µl	125 µl	125 µl

Oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

700 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbans ölçüldü.

3.4.2 Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini

Ekstraktların toplam flavonoid içeriği, Alüminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi. Metodun prensibi, AlCl₃' ün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak, AlCl₃, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile kompleks oluşturur [98]. Bu metoda göre standart olarak kuersetin kullanıldı [99].

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- %80' lik Etanol Çözeltisi: 80 ml' lik saf etanolün hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- %10' luk Al(NO₃)₃ Çözeltisi: 2.5 g Al(NO₃)₃ tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 ml' ye tamamlandı.
- 1 M KCH₃COO Çözeltisi: 2.454 g KCH₃COO tartıldı, saf su ile çözülüp hacmi 25 ml' ye tamamlandı.
- Standartlar: 0.01 g kuersetin 802 µl saf etanol ile çözülerek hacmi saf su ile 1000 µl' ye tamamlandı. 10 000 µg/ml' lik kuersetin standardı elde edildi. Bundan 1000 µg/ml' lik standart hazırlanarak % 80' lik etanol ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 µg/ml' lik kuersetin standartları meydana getirildi.

Deneyin Yapılışı

Tablo 4: *Origanum sipyleum* ekstraktının filavonoid içeriğinin belirlenmesi

	Kör	Numune	Standart
Su/Metanol	20 µl	-	-
Ekstrak	-	20 µl	-
Standart	-	-	20 µl
%80'lik etanol	172 µl	172 µl	172 µl
%10'luk Al(NO ₃) ₃	4 µl	4 µl	4 µl
1 M KCH ₃ COO	4 µl	4 µl	4 µl

Oda sıcaklığında, karanlıkta 40 dakika inkübe edildi.

415 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbands ölçüldü.

3.4.3 Ekstraktlarda Demir (Fe⁺³) İndirgeyici Güç Tayini

Antioksidanlar gibi indirgen maddelerin varlığı Fe⁺³-ferrisiyanür kompleksinin Fe⁺², ye indirgenmesine neden olmaktadır. Bu metotta, test edilen örneğin indirgenme gücüne bağlı olarak test çözeltisinin rengi sarıdan yeşile döner. Oluşan yeşil renk 700 nm' de maksimum absorbands verir ve artan absorbands artan indirgenme kuvvetini gösterir [100]. Bu metoda göre standart antioksidan bileşik olarak troloks kullanıldı.

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- 0.2 M pH:6.6 Fosfat Tamponu: 2.137 g NaH₂PO₄.2H₂O ve 1.121 g Na₂HPO₄.2H₂O tartılarak karıştırıldı. Saf su eklenerek 90 ml' ye kadar çözüldü. Daha sonra pH' sı 6.6' ya ayarlanarak hacmi saf su ile 100 ml' ye tamamlandı.
- % 1' lik K₃Fe(CN)₆ Çözeltisi: 1 g K₃Fe(CN)₆ tartıldı, saf su ile çözümlü hacmi 100 ml' ye tamamlandı.
- %10' luk TCA Çözeltisi: 5 g TCA tartıldı, saf su ile çözümlü hacmi 50 ml' ye tamamlandı.
- %0.1' lik FeCl₃ Çözeltisi: 0.1 g FeCl₃ tartıldı, saf su ile çözümlü hacmi 100 ml' ye tamamlandı.

- Standartlar: 0.001 g troloks 1 ml saf metanol ile çözülerek 1000 µg/ml' lik troloks standardı elde edildi. 1000 µg/ml' lik standarttan saf etanol ile çözülmüş 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 µg/ml' lik troloks standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Deney modifiye edilerek spektrofotometrik kuvvetler yerine Tablo 5' deki pipetlemelerin ilk altı aşaması 1.5 ml' lik ependorflarda, sonraki aşamalar ise 96 kuyucuklu mikropleytte yapıldı [101].

Tablo 5: *Origanum sipyleum* ekstraktının demir (Fe⁺³) indirgeyici güç tayini

	Kör	Numune	Standart
Su/Metanol	40 µl	-	-
Ekstrakt	-	40 µl	-
Standart	-	-	40 µl
0.2 M pH:6.6 Fosfat Tamponu	100 µl	100 µl	100 µl
% 1' lik K ₃ Fe(CN) ₆	100 µl	100 µl	100 µl
50 °C' de 20 dakika inkübe edildi ve soğutuldu.			
% 10' luk TCA	100 µl	100 µl	100 µl
3000 g' de 10 dakika santrifüj edildi.			
Üstteki fazlardan 100' er µl alınarak 96 kuyucuklu mikropleyte aktarıldı.			
Saf su	100 µl	100 µl	100 µl
% 0.1' lik FeCl ₃	20 µl	20 µl	20 µl
Oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.			
700 nm' de mikropleyt okuyucuda absorbands ölçüldü.			

3.4.4 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Origanum sipyleum L. ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi, Ou ve arkadaşları tarafından geliştirilen method modifiye edilerek kullanıldı [102,103]. DPPH radikali, ticari olarak satın alınabilen bir radikal olup, 517 nm dalga boyunda maksimum absorbands değeri vermektedir. Antioksidan madde veya maddelerle etkileştiğinde, DPPH 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbands değerlerinin düşmesine

neden olmaktadır. Ekstraktları değişik konsantrasyonlarda hazırlanır ve eşit hacimde (1000 µL) DPPH ve numune çözeltileri karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. Süre sonunda DPPH'nin maksimum absorbans değerini verdiği 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur. Negatif kontrol olarak DPPH çözeltilisi ve numunenin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Sonuçları karşılaştırmak amacıyla doğal antioksidan olarak ise askorbik asit kullanıldı. Numune ve standartların radikal süpürücü aktivitesi negatif kontrole oranla % inhibisyon olarak verildi [104].

3.5 Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

3.5.1 Hücre Kültürü

Çalışmalarda meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231, MCF-7 ve sağlıklı MCF-10A hücreleri kullanılmıştır. İnsan epitel meme adenokarsinom (MDA-MB-231) (ATCC® HTB-26™), insan epitel meme adenokarsinom (MCF-7) (ATCC® HTB-22™) ve sağlıklı insan meme epitel (MCF-10A) (ATCC® CRL-10317™) hücreleri ATCC den ticari olarak temin edilmiştir.

3.5.2 Hücrelerin Büyütülüp Çoğaltılması

MDA-MD-231, MCF7 ve MCF-10A hücreleri 25cm²'lik flasklara ekim yapıldı. Hücre kültürü ortamı olarak %10 FBS, Penicilin-Streptomycin (100 ünite), L-Glutamine ve NaHCO₃ içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda inkübasyona bırakılıp çoğaltılmıştır.

Hücreler büyüdüğünde farklı ortama geçirmek için pasajlandı. Pasajlamada, önce DMEM çekilip, FBS'i ortamdan uzaklaştırmak için DPBS ile yıkandı. Sonra hücreleri flasktan kaldırmak için flaksa Tripsin-EDTA çözeltilisi eklenip, flaks CO₂ etüvünde yaklaşık 1 dakika tutuldu. Tripsin-EDTA'nın aktivitesini durdurmak için flaksa FBS içeren medyum konuldu. Hücreler falkon tüpe toplanıp oda sıcaklığında 800 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılıp çöken pellet medyumda süspanse edilip yapılacak işleme göre hücre kültür platelerine ekim yapıldı.

3.5.3 Hücre Sayımı

Platelere ekim yapılmadan önce her kuyucuğa belli sayıda hücre ekebilmek için hücreler pasajlandıktan sonra Tripan Mavisi ile boyayıp Olympus R1 cihazıyla hücre sayımı yapıldı.



Şekil 7. Olympus R1 hücre sayım cihazı



Şekil 8. Olympus R1 hücre sayımı için slayt

Karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra slayta 10 μ L yüklenerek cihazda sayım yapılır. Bu durumda l hücreler metilen mavisi ile boyanır, canlı hücreler boyanmaz. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı hücre sayımı gerçekleştirilebilir. Seyrelme faktörü de dikkate alınarak mL başına düşen hücre sayısı hesaplanarak her bir kuyucuğa ekilecek olan hücre miktarı belirlenir.

3.6 Sitotoksosite Testleri

3.6.1 *Origanum sipyleum L.* kanser hücre hatlarındaki IC₅₀ dozunun belirlenmesi

IC₅₀ dozu, bir inhibitörün hedefinin %50'sini öldürmek için gerekli olan konsantrasyonu belirtmektedir. Ekstraktın IC₅₀ dozu "Cell Proliferation Kit" kullanarak XTT testi ile belirlendi. XTT kit içerisinde, XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) ajanı ve aktivasyon ajanı yer almaktadır. Reaktifler 50/1 XTT ajanı (Labelling reagent) /aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı. XTT bir tetrazolium tuzu olmakla beraber metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimiyle parçalanarak suda çözünebilen formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan turuncu renk yoğunluğuna bağlı olarak, mikropalak okuyucuda 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunarak hücre canlılığını belirlendi.

Ekstraktı çıkarılan *Origanum* türü olan *Origanum sipyleum L.*'nin IC₅₀ değeri belirlendi. Steril 96 kuyucuklu platalere her bir kuyucukta 10x10⁴ sayıda hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Daha sonra bileşikler farklı konsantrasyonlarda (1000-31,25) bu kuyucuklara uygulandı. Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda bileşikler kuyucuklardan uzaklaştırılacak ve XTT kiti uygulandı. Deney sonunda cihaz bu değeri her bir kuyucuk için hesaplayarak ve ortalama değer alındı. (Her bir kuyucuk için n=3 olacak şekilde çalışıldı.)

3.7 Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi

3.7.1 BrdU Yöntemi

Bu çalışmada hücre proliferasyonunu belirlemek için BrdU yöntemi ELISA ile spektrofotometrik olarak incelendi. DNA sentezi esnasında BrdU (5-Bromo-2'-deoxy-uridine)'nin anti-BrdU antikoru kullanarak spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Hücreler BrdU içeren bir hücre ortamında inkübe edilerek, primidin analogları büyüyen hücrelerdeki yeni sentezlenen DNA'ya timidin yerine bağlandı. BrdU içeren ortam kaldırılıp hücreler fiske edildikten sonra anti-BrdU-POD antikoru eklendi ve bu antikor BrdU içeren yeni sentezlenmiş

hücresel DNA'ya bağlandı. Oluşan bu immün kompleks substrat ile tepkimeye sokulup ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak incelendi.

SinoGeneClon Biotech Co. şirketine ait insan 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BRDU) Elisa Kiti (Cat. No: SG-11538) kullanılmıştır. Kitin standart aralığı 0.8-50 pmol/mL olarak verilmiştir. Kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Kit prosedürü aşağıda verilmiştir.

Kit prosedürü:

37° C %5 CO₂ inkübatörde büyümüş hücreler trypsinlenerek kaldırılarak 800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Hücre sayımı Olympus R1 marka hücre sayım cihazı ile yapıldı. 10 x 10⁵ hücre olacak şekilde ekilip 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra *Origanum sipyleum L.* ekstraktı uygulanarak tekrar 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler kaldırılarak santrifüjlendi. Hücreler tekrar sayılarak 10 x 10⁵ milyon/ml PBS ile yıkanarak 2000-3000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek hazırlandı.

1. Bütün reaktifler, standart çözeltiler ve örnekler talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce oda sıcaklığında bekletildi. Analizler oda sıcaklığında yapıldı.
2. Standartlar kuyucuklara 50 µl eklendi (Standartlara antikor eklenmedi, çünkü standart çözeltisi biotinlenmiş antikor içermekteydi).
3. Örnekler 40 µl olarak ilave edildi. Üzerine 10 µl sample diluent eklendi ve üzerine 50 µl Streptavidin-HRP ilave edildi. 37 C°de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate 5 kez yıkandı, ardından 50 µl HRP konjugantı her bir kuyucuğa eklendi. 37 C°de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate 5 kez yıkandı, inkübasyon sonrası kromojen A 50µl ve kromojen B çözeltisi 50µl ilave edilerek karanlıkta 37° C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 50 µl stop solusyonu ilave edildi. Mavi rengin hızla sarıya döndüğü gözlemlendi. Stop solusyon eklenmesinden 5 dakika sonra 450 nanometrede ölçüm yapıldı.

3.7.2 Flow sitometri (Anneksin V)

Meme kanseri hücre hattında ve MCF10A hücre serisinde seçici toksisite gösterdiği belirlenen *Origanum sipyleum L.*'in hücrede rolünün araştırması

amacıyla annexin-V(apoptoz) ve PI ticari kiti kullanılarak flow sitometrik ölçüm yapıldı. Steril 6 kuyucuklu pleytler kullanıldı. Hücre serileri için; ekstrakt uygun dozlar olacak şekilde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plate içeriği uzaklaştırıldı. PBS ile yıkanan hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 5 dk 800 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen hücreler tripan blue ile sayıldıktan sonra 5 µL Annexin V ve 5 µL PI eklendi. Oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası, 400µL binding buffer buz üzerinde ilave edilerek flow sitometride (emisyon;530 nm, ekzitasyon;488 nm) ölçüm yapıldı.

3.8 İstatistiksel Analiz

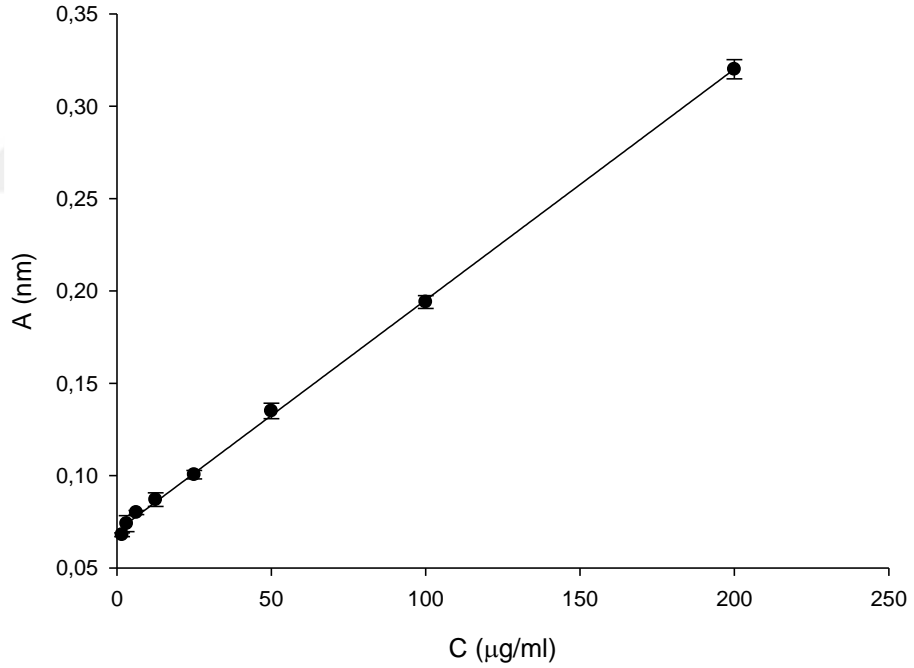
Veriler, aritmetik ortalama ve standart sapma ($x \pm SD$) şeklinde ifade edildi. Gruplar arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmak için Anova ve Tukey analizleri kullanıldı. Farklar $p < 0.05$ için anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler, SPSS 22.0 ile gerçekleştirildi. Deneyde en az üç bağımsız veri alındı.

4.BULGULAR

4.1 Antioksidan

4.1.1 Ekstraktlardaki Toplam Polifenol Tayini

Antioksidan bileşiklerin en önemlisi fenolik yapıli maddelerdir. Fenoller yapısında bulundurdıkları fonksiyonel gruplar dolayısıyla elektron ve hidrojen verebilir. Bu gruplar radikalleri ve oksitleyici grupları seçerler. Fenolik gruplar OH grubunca zengindir. Bu gruplar onlara polar olma özelliği katar ve antioksidan özelliğini artırır. Bu çalışmada toplam fenolik madde tayini, Folin-Ciocaltaeu metoduna göre yapıldı. Standart olarak kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi için bu maddelerin sekiz farklı konsantrasyonda (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 µg/mL) metanol çözeltileri hazırlandı [97].



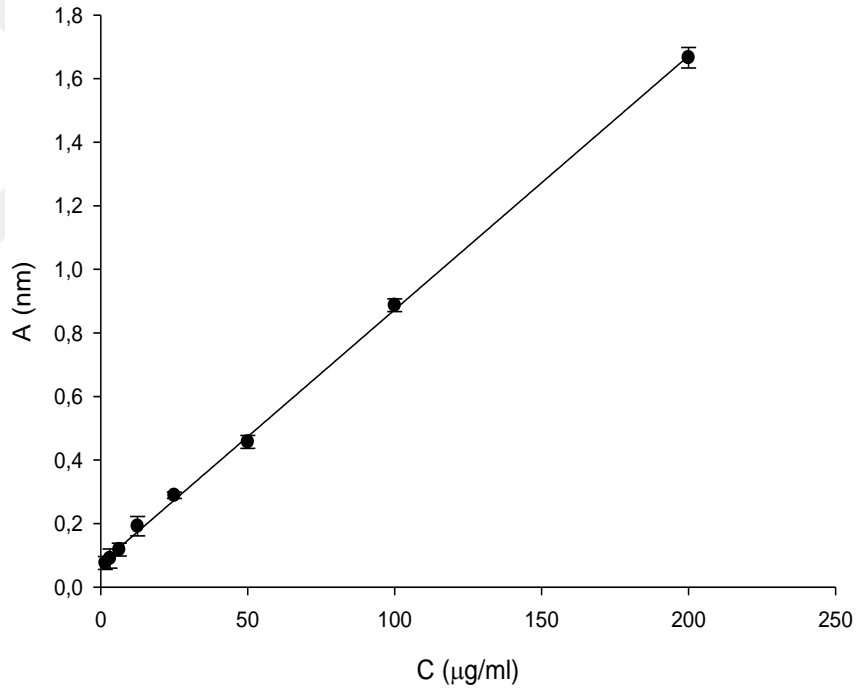
Şekil 9. Gallik asit standart grafiği

Origanum sipyleum L. ekstraktında bulunan toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonları Şekil 9’de verilen gallik asit standart grafiği kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denklemi $y = 0.0012x + 0.0726$ ($R^2=0.9997$) olarak bulundu. Bu eğriden elde edilen denklem kullanılarak

Origanum sipyleum'un toplam fenolik madde miktarı 135.33 ± 1.39 μg GAE/100g olarak belirlendi.

4.1.2 Ekstraktlarda Toplam Flavonoid İçerik Tayini

Origanum sipyleum L. ekstraktında bulunan toplam flavanoid bileşiklerin konsantrasyonları (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ise Şekil 10'de verilen kuersetin standart grafiği kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden toplam flavanoid madde miktarı kuersetine eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denklemi de $y = 0.0032x + 0.0768$ ($R^2 = 0.9997$) olarak bulundu. Bu egriden elde edilen denklem kullanılarak *Origanum sipyleum*'un flavonoid madde miktarı 67.25 ± 1.42 μg CE/100g bulundu.

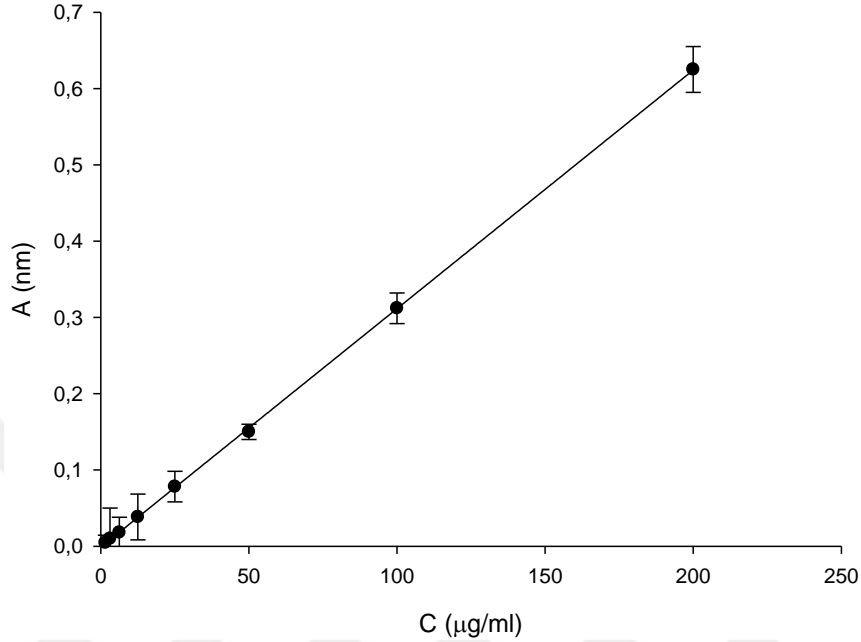


Şekil 10. Kuersetin standart grafiği

4.1.3 Ekstraktlarda Demir (Fe+3) İndirgeyici Güç Tayini

Origanum sipyleum L. ekstraktında bulunan demir indirgeyici bileşiklerin konsantrasyonları (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ise Şekil 11'da verilen troloks standart grafiği kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemden demir indirgeyici güç miktarı trolokse eşdeğer olarak hesaplandı. Elde edilen grafik denklemi de $y = 0.0031x - 0.0012$ ($R^2 = 0.9999$) olarak bulundu.

Bu eğriden elde edilen denklem kullanılarak *Origanum sipyleum*'un demir indirgeyici güç miktarı $332.580 \pm 1.58 \mu\text{g TE}/100\text{g}$ bulundu.



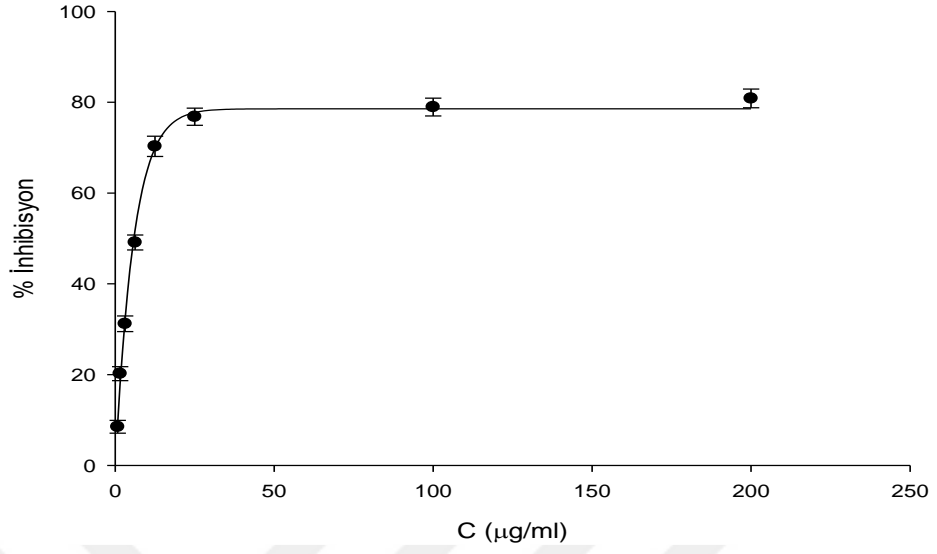
Şekil 11. Troloks standart grafiği

4.1.4 DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

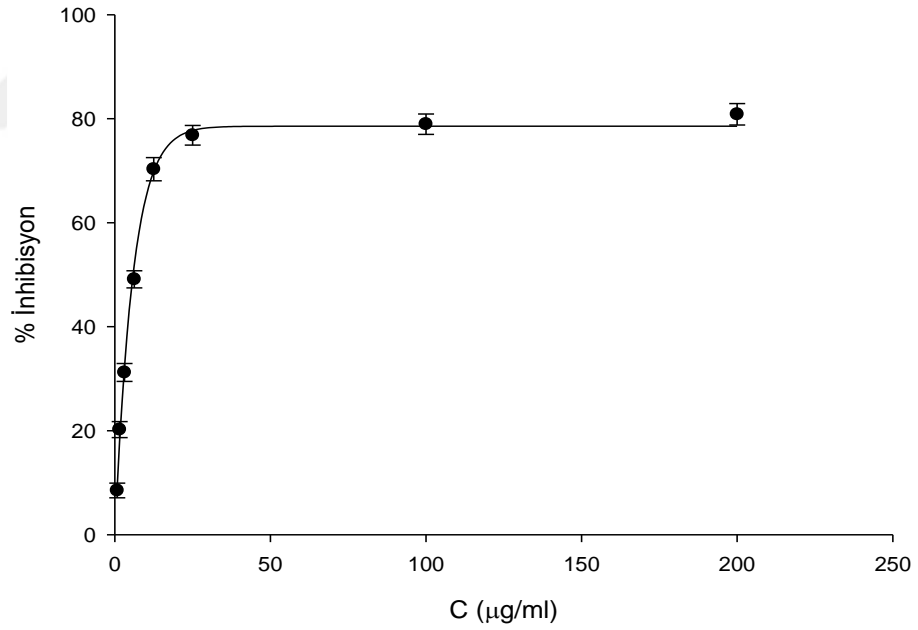
DPPH koyu mor renkli bir radikaldir ve antioksidan varlığında, bir proton alarak renksiz bir bileşik olan DPPH indirgenmiş moleküle dönüşmektedir. DPPH'ın, antioksidan madde ile reaksiyonunun 517 nm de absorbansının ölçülmesi, en yaygın olarak kullanılan dekolarizasyon analiz yöntemlerindedir [103].

Origanum sipyleum'un metanol ekstraktıyla askorbik asit'in farklı konsantrasyonları (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562 $\mu\text{g}/\text{mL}$) için DPPH radikalini süpürme aktivitesi belirlendi. Bu amaçla elde edilen absorpsiyon değerlerinden her bir konsantrasyondaki % inhibisyon değerleri hesaplanarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır [104].

$$I (\%) = \left[\frac{A_{KÖR} - A_{NUMUNE}}{A_{KÖR}} \right] \times 100$$



Şekil 12. Askorbik asit standart grafiği



Şekil 13. *Origanum sipyleum L.* bitkisinin DPPH tayin grafiği

Origanum sipyleum L. ekstraktının IC_{50} değeri 6.88 ± 0.08 µg/mL olarak bulundu. Askorbik asitin IC_{50} değeri ise 4.67 ± 0.09 µg/mL olarak bulundu.

Tablo 6'da *Origanum sipyleum L.* ekstraktının toplam fenol, toplam flavonoid, toplam demir indirgeyici güç ve radikal süpürücü aktivite kapasiteleri verilmiştir.

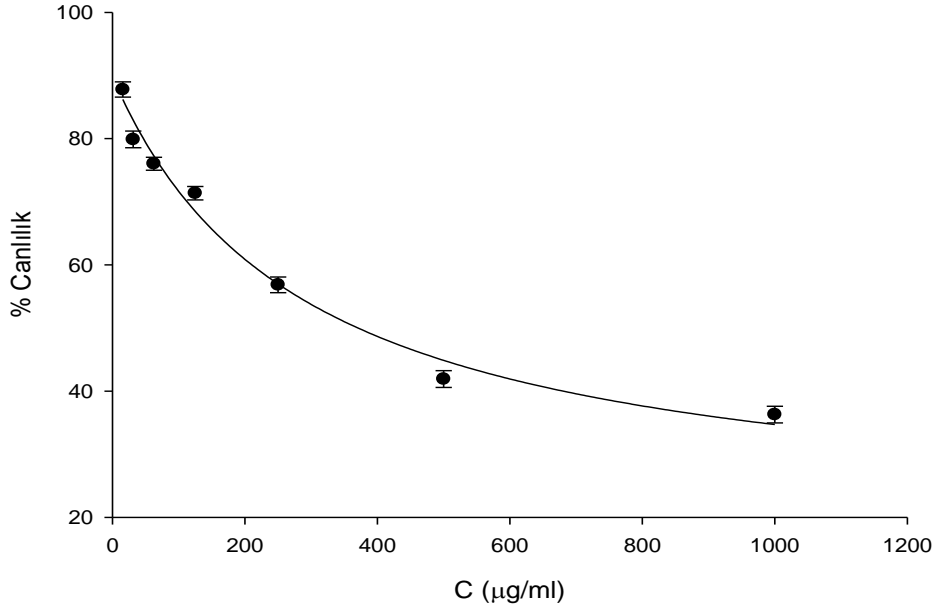
Tablo 6. *Origanum sipyleum L.* ekstraktının toplam fenol, toplam flavonoid, toplam demir indirgeyici güç ve antiradikal aktivite kapasiteleri

	Toplam fenol (μg gallik asit/100g)	Toplam Flavonoid (μg kuersetin/100g)	Toplam demir indirgeyici (μg troloks/100g)	Antiradikal aktivite ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Origanum sipyleum L.</i>	135.33 \pm 1.39	67.25 \pm 1.42	332.580 \pm 1.58	6.88 \pm 0.08

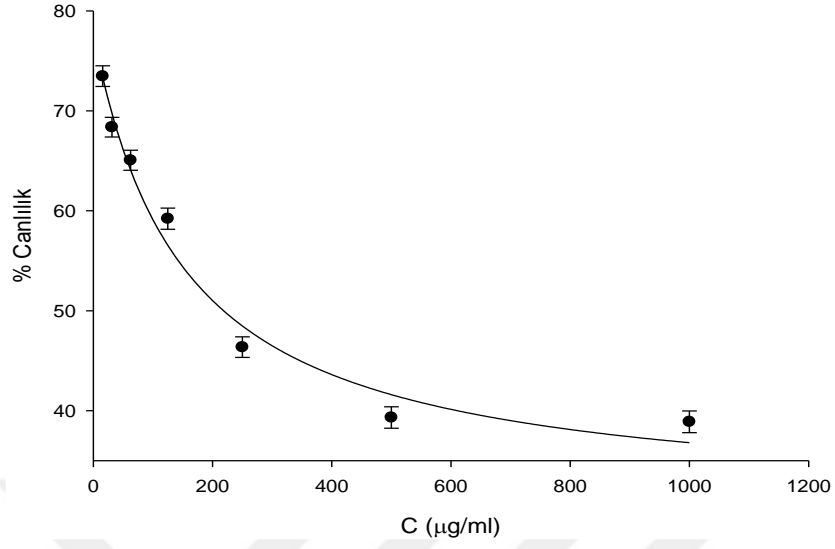
4.2 Sitotoksosite Testleri

4.2.1 *Origanum sipyleum L.* kanser hücre hatlarındaki IC₅₀ dozunun belirlenmesi

Origanum sipyleum L. ekstraktının sitotoksik etkileri meme kanseri hücre hatlarında 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında XTT testi ile değerlendirildi. IC₅₀ değerleri Tablo 7’de gösterilmiştir.

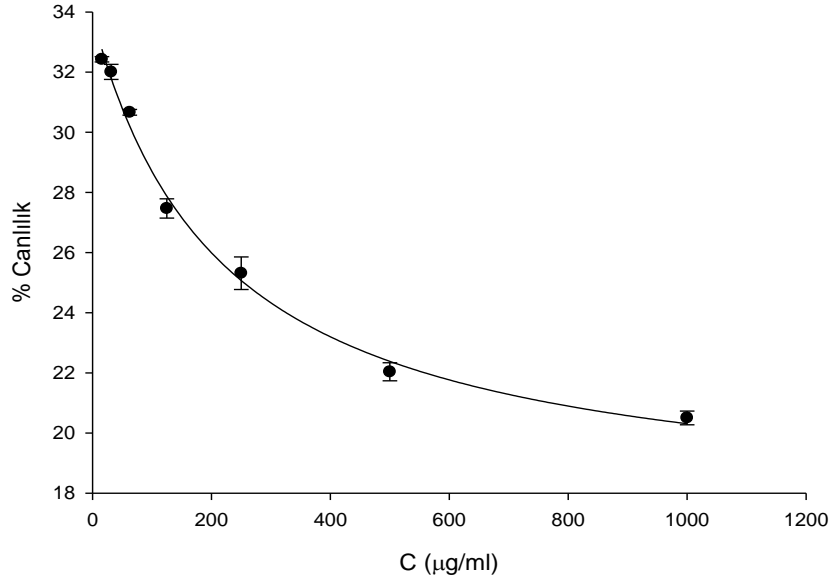


Şekil 14. MCF-7 hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)

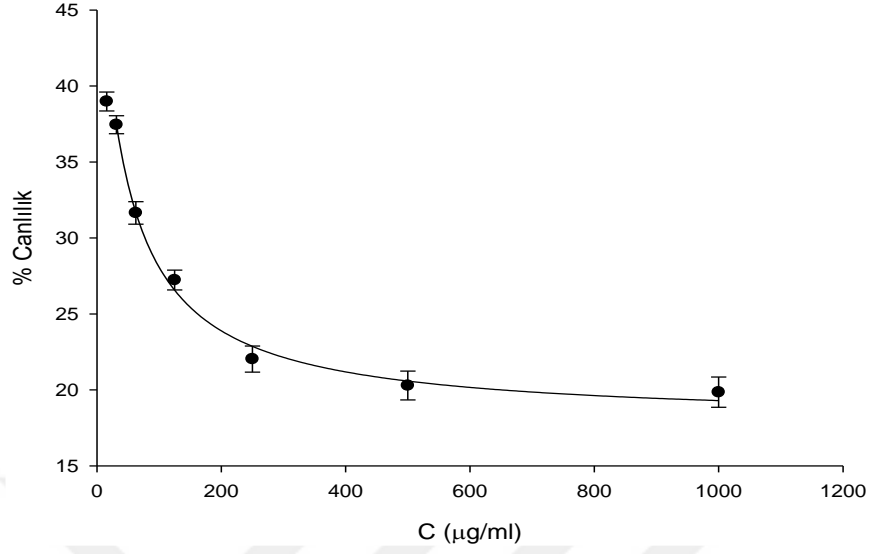


Şekil 15. MCF-7 hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)

Şekil 14-15'de *Origanum sipyleum L.*'nin MCF-7 hücre hattında 24 ve 48 saat sonraki artan derişime bağılı % canlılık olarak verilmiştir. *Origanum sipyleum L.*'nin derişim artıkça % canlılık azalmaktadır.

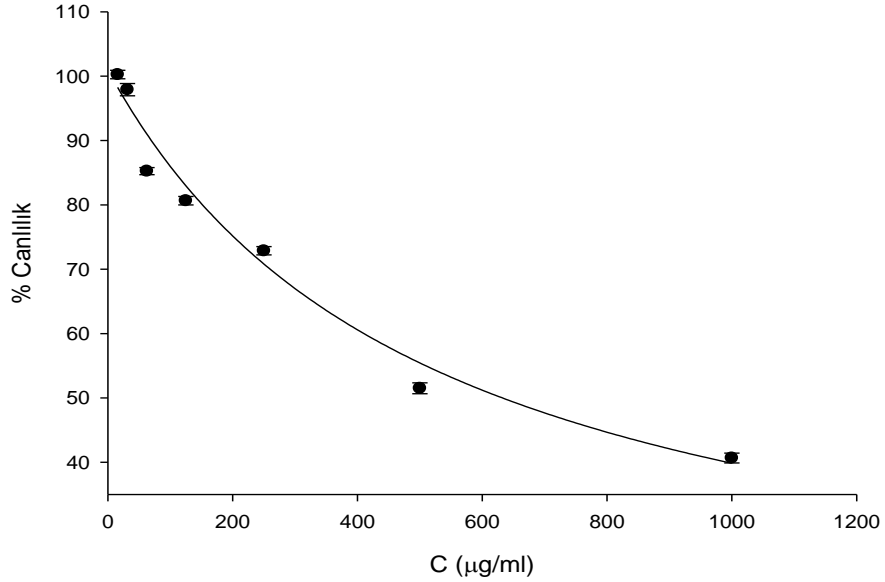


Şekil 16. MDA-MB-231 hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)

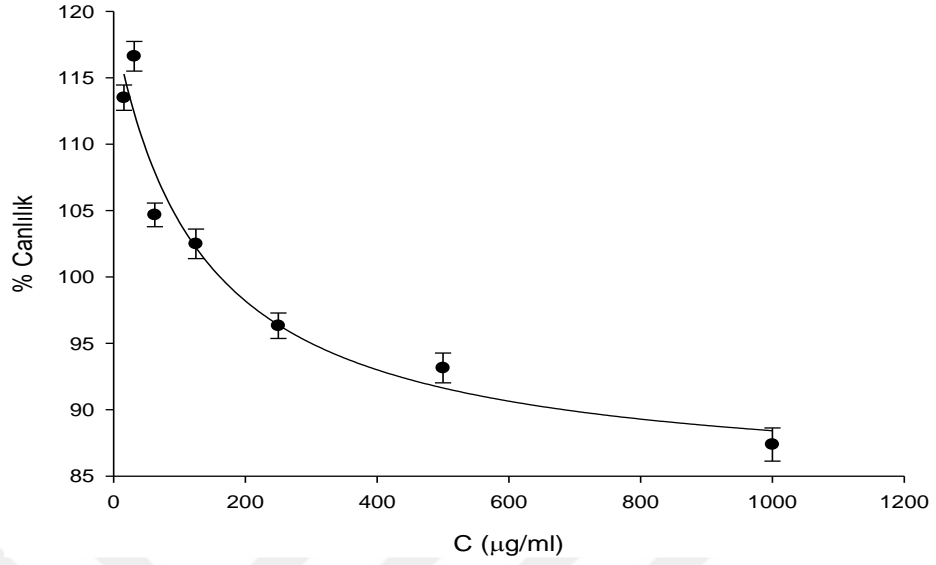


Şekil 17. MDA-MB-231 hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)

Şekil 16-17’de *Origanum sipyleum L.*’nin MDA-MB-231 hücre hattında 24 ve 48 saat sonraki artan derişime bağılı % canlılık olarak verilmiştir. *Origanum sipyleum L.*’nin derişim artıkça % canlılık azalmaktadır.



Şekil 18. MCF-10A hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 24 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)



Şekil 19. MCF-10A hücre hattında *Origanum sipyleum L.* 48 saat sonraki % canlılık grafiği (n=3)

Şekil 18-19'de *Origanum sipyleum L.*'nin MCF-10A hücre hattında 24 ve 48 saat sonraki artan derişime bağılı % canlılık olarak verilmiştir. *Origanum sipyleum L.*'nin derişim artıkça % canlılık azalmaktadır.

Tablo 7. *Origanum sipyleum L.* ekstraktının IC₅₀ değerleri

	MCF-7		MDA-MB-231		MCF-10A	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
IC₅₀ (µg/mL)	205±6.86*	147±4.23	197±4.15*	96±3.46	248±3.21*	150±1.22
	t=4.15		t=10.24		t=9.42	
	P=0.001*		P=0.001*		P=0.001*	

[* 24 saat ve 48 saate göre P<0.05 önemli]

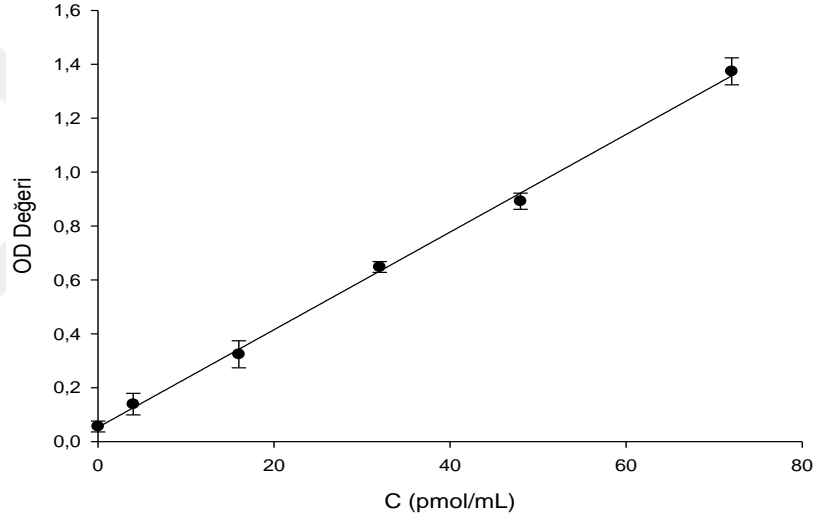
Yapılan çalışma 24 ve 48 saatlik iki farklı inkübasyonda değerlendirildi. Üç hücre hattında 48 saatlik inkübasyon 24 saate göre daha etkiliydi. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A gruplarında 24 saat ve 48 saat IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında; 48 saatlik IC₅₀ değerleri 24 saate göre anlamlı bulunmuştur. (p <0.05)

MDA-MB-231 hücre hattı 48 saatlik inkubasyon sonrası MCF-7 hücre hattına göre etkinliği daha fazla olarak görülmektedir. 24 saatlik inkubasyonlara bakıldığında MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7'e göre daha etkindir.

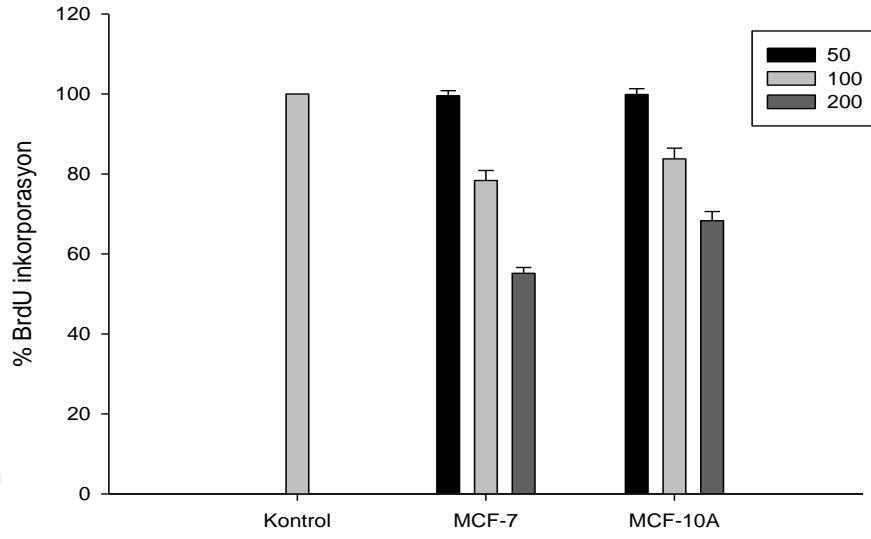
4.3 Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi

4.3.1 BRDU Testinin Değerlendirilmesi

BrdU testi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA'ya BrdU (5-bromodeoksiüridin) bağlanmasını saptayan bir testtir. Yapılan bu test ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan *Origanum sipyleum L.* ekstraktının meme kanseri hücreleri üzerine etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 20. BrdU standart grafiği ($y=0.0181x +0.0528$ ($R^2=0.9992$))



Şekil 21. 24 saat inkübasyon sonrasında %BrdU inkorporasyonu

BrdU analizi hücre proliferasyonunu değerlendirmek için hızlı, basit ve yüksek duyarlı bir yöntemdir. Şekilde görüldüğü üzere 24 saatte 200 µM konsantrasyonda yaklaşık olarak kontrol grubuna göre sağlıklı hücrede %68 oranında hücre canlılığı söz konusu iken, meme kanserinde bu canlılık oranı %55 olarak bulunmuştur.

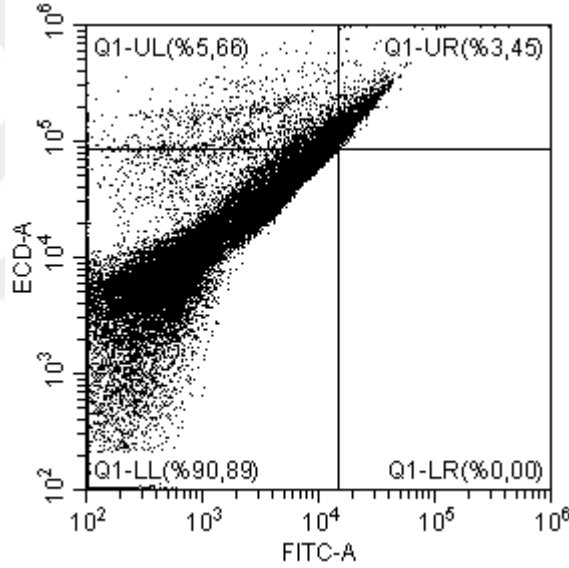
4.3.2 Flow sitometri sonuçları

Origanum sipyleum L. ekstraktının IC₅₀ değerleri verilerek 48 saat inkübe edildikten sonra meme kanseri hücre sonuçları aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 22-23-24). Tablo 8’de meme kanseri hücre serilerindeki tüm gruplara ait Annexin V analiz sonuçları % hücre miktarı şeklinde görülmektedir. Pozitif kontrol olarak sağlıklı hücre hattı kullanılmıştır.

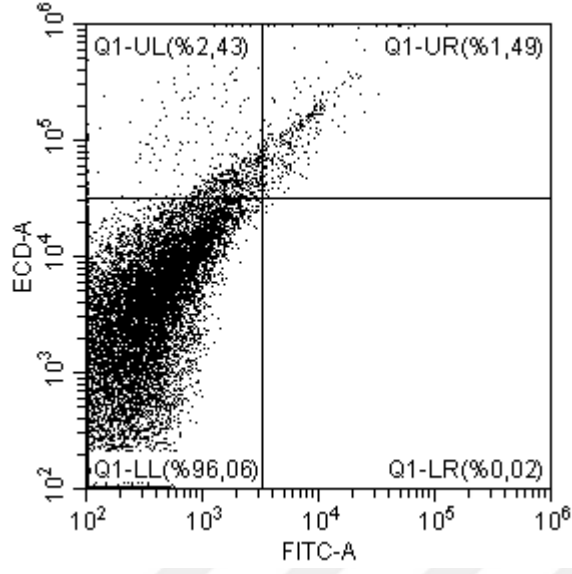
Tablo 8. Meme kanseri hücre serisininde Anneksin V analizi % hücre oranları (n=3)

	Normal hücre sayısı (%)	Erken apoptoz hücre sayısı (%)	Geç apoptoz hücre sayısı (%)	Nekroz hücre sayısı (%)
MDA-MB-231	90.89±1.24	-	3.45±0.23	5.66±0.95
MCF-7	96.06±0.95	0.02±0.001	1.46±0.085	2.43±0.56
MCF-10A	98.53±1.31	-	0.12±0.004	1.35±0.45
	F=2.56 P=0.162	-	F=4.35 P=0.032 *	F=6.05 P=0.002*

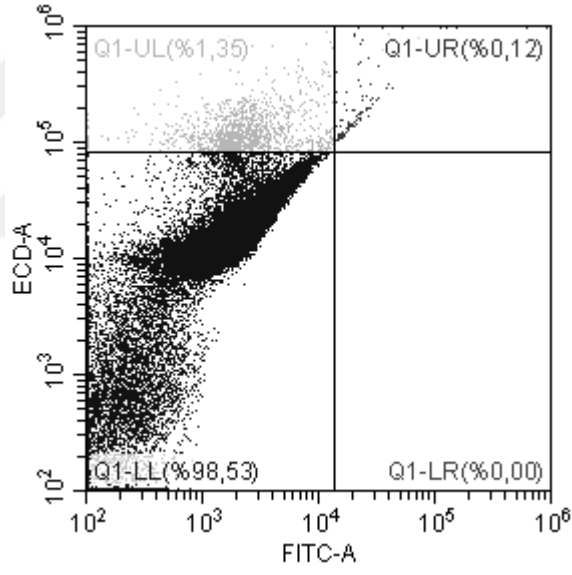
[*Pozitif kontrole göre anlamlı değişim göstermiştir (p<0.05)]



Şekil 22. MDA-MB-231 hücre hattında flow sitometri görüntüsü (Anneksin V 1. Bölge Q1-LL: Canlı hücre; 2. Bölge Q1-LR: Erken apoptoz; 3. Bölge Q1-UR: Geç apoptoz; 4. Bölge Q1-UL: nekroz evresindeki hücreleri göstermektedir.)



Şekil 23. MCF-7 hücre hattında flow sitometri görüntüsü



Şekil 24. MCF-10A hücre hattında flow sitometri görüntüsü

Sağlık ve kanser hücre hatları apoptoz değerlerine dair verilen dozlar incelendiğinde önemli bir fark gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Kanser dünyada en sık görülen sağlık sorunlarından biridir. Meme kanseri ise kadınlar arasında en çok rastlanan kanser türüdür. Meme kanseri için birçok tedavi yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. En yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de kemoterapidir. Kemoterapi tedavisinde kanser hücrelerini zayıflatan ve yok eden birçok kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Fakat bu ajanların saç folikülleri, tırnak, kemik iliği gibi hızlı bölünen hücrelerde yan etkilere yol açtığı gözlenmiştir [105].

Son yıllarda insanların sentetik ilaçlardan çok doğal ürünlere yöneldiği görülmektedir. Bu doğal ürünlerin daha az yan etki ve toksisiteye sahip olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Kanserli hücrelere karşı kullanılan sentetik ilaçların %70'in den fazlası doğal ürünler veya doğal ürünlerden üretilmiş maddelerden oluştuğu belirtilmektedir. Bu nedenle doğal ürünlere yeni ilaçların üretilmesi için potansiyel hammadde gözüyle bakılmaktadır [106].

Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanarak elde edilen *Origanum L.* türlerine dair pek çok çalışma literatürde yer almaktadır [110]. *Origanum L.* türleri toplandığı yer ve zamana göre içerik yönünden farklılıklar göstermektedir [107]. *Origanum L.* türlerinin ekstraksiyonu için maserasyon, soksilet çıkarma, ultrasonik (sonikasyon) ve mikrodalga ekstraksiyonu gibi farklı yöntemler ve çözücüler kullanılmaktadır [108]. *Origanum L.* türlerinin ekstraksiyonu için etanol, metanol, su, hekzan, asetik asit, kloroform, diklormetan DMSO ve aseton gibi çözücüler kullanılmaktadır [109]. Kullanılan ekstraksiyon yöntemine ve çözücüye göre de ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri değişebilmektedir [110].

Çalışmamızda *Origanum L.* türünün bir üyesi olan *Origanum sipyleum L.* bitkisinin metanol ekstraktının toplam polifenol içeriği 135.33 ± 1.39 $\mu\text{gGAE}/100\text{g}$ bulunmuştur. Literatürde Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan *Origanum L.* türlerinin ekstraktlarındaki toplam polifenolik içeriği; 220-650 mg GAE/g aralığında yer almaktadır [110]. Antalyada Kemer, Kuzdere, Kesme boğazı mevkilerinden toplanan *Origanum L.* ailesinin bir türü olan *Origanum solymicum* bitkisinin farklı ekstraktlarda toplam polifenol çalışması yapılmıştır. Su ekstreğinde 235.5 ± 2.3 , n-bütanol 307.7 ± 8.4 g GAE/g ekstrakt

belirtilmektedir [111]. Konya Seydişehir-Beyşehir ana yolu üzerinden toplanan *Origanum Sipyleum L.* bitkisinin toplam fenolik miktarı 226.66 ± 1.18 mg GAE/g ekstrakt belirtilmektedir [112]. *Origanum rotundifolium*'un Su/etil asetat ekstraktlarında toplam polifenol içeriği çalışılmıştır. Yapılan çalışmada ekstrağın toplam polifenol içeriği 620.05 g GAE/kg ekstrakt olarak belirtilmiştir [113].

Yapılan çalışmada metanollu *Origanum sipyleum L.* ekstraktının toplam flavonoid içeriği 67.25 ± 1.42 µg CE/ 100g bulunmuştur. Türkiye'nin farklı yerlerinden toplanan *Origanum L.* türüne ait ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği 50-1500 µg CE/g arasında yer almaktadır [110]. Çanakkale yöresinden toplanan *Origanum L.* ailesinin bir türü olan *Origanum vulgare L.*'nin toplam flavonoid içeriği $716.86-1291.69$ µg CE/g arasında belirtilmektedir. *Origanum vulgare L.*'nin değişik çözücülerdeki ekstraktları; Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 856.94 ± 1.46 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 893.17 ± 1.27 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 1291.69 ± 1.67 , Etanol:su:asetik asit ekstraktı 995.82 ± 1.71 , Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 1027.22 ± 0.91 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 884.72 ± 1.31 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 1215.61 ± 1.11 , Etanol:su:asetik asit ekstraktı 716.86 ± 1.17 , Su:asetik asit ekstraktı 936.65 ± 0.84 µg CE/g olduğu belirtilmiştir. Isparta yöresinden toplanan *Origanum L.* ailesinin bir türü olan *Origanum minutiflorum* bitkisinin farklı ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği çalışılmıştır. Toplam flavonoid miktarı ise $622.66-854.53$ µg CE/g arasında belirtilmektedir. Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 738.59 ± 0.42 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 622.66 ± 0.91 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 843.66 ± 2.93 , Etanol:su:asetik asit ekstraktı 662.51 ± 2.55 , Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 727.73 ± 1.71 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 854.53 ± 1.3 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 703.57 ± 1.58 , Etanol:su:asetik asit ekstraktı 722.89 ± 0.75 , Su:asetik asit ekstraktı 623.87 ± 1.26 µg CE/g olduğu belirtilmiştir. Mersin yöresinden toplanan *Origanum L.* ailesinin bir türü olan *Origanum syriacum L.* bitkisinin farklı ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği çalışılmıştır. Toplam flavonoid miktarları $517.60-1443.86$ µg CE/g arasında belirtilmektedir. Bunlar sırasıyla Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 718.06 ± 2.54 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 517.60 ± 1.05 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 1236.14 ± 2.20 ,

Etanol:su:asetik asit ekstraktı 889.55 ± 1.27 , Metanol:aseton:su:asetik asit ekstraktı 1128.66 ± 2.18 , Metanol:su:asetik asit ekstraktı 1443.86 ± 1.27 , Aseton:su:asetik asit ekstraktı 917.32 ± 2.02 , Etanol:su:asetik asit ekstraktı 1086.39 ± 1.11 , Su:asetik asit ekstraktı 718.06 ± 2.38 $\mu\text{g CE/g}$ olduğu belirtilmiştir [109].

Origanum sipyleum L. bitkisinin metanol ekstraktının demir indirgeyici güç tayini çalışmamızda yapılarak 332.580 ± 1.58 $\mu\text{g TE/100g}$ olarak bulunmuştur. Isparta yöresinden toplanan *Origanum L.* ailesinin bir türü olan *Origanum Minutiiflorum* ekstraktlarının indirgeme gücü tayinleri farklı çözücülerde yapılmıştır. Yapılan çalışmaya göre; hekzan $0,117 \pm 0,010$, diklormetan $1,237 \pm 0,033$, kloroform $0,343 \pm 0,008$, aseton $1,272 \pm 0,001$, metanol $1,583 \pm 0,110$ mg CE/mg ekstrakt olarak belirtilmektedir [114].

DPPH radikali süpürme yöntemi örneklerin serbest radikallerin inhibisyonundaki etkilerinin değerlendirilmesi için etkin bir yöntem olarak kabul edilmektedir [104]. Bu yöntem, bir antioksidanla reaksiyonu sonucunda DPPH radikalinin tüketilmesinin spektroskopik olarak ölçümü temeline dayanır. DPPH molekülünün yapısındaki 3 aromatik halkanın varlığı bu molekülü oldukça kararlı kılmaktadır. Çalışmamızda *Origanum L.* türünün bir üyesi olan *Origanum sipyleum L.* bitkisinin metanol ekstraktının DPPH radikalini süpürme aktivitesi belirlendi. Bu amaçla DPPH radikali süpürme aktivitesinin IC_{50} değeri 6.88 ± 0.08 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Standart olarak askorbik asit kullanılmış ve IC_{50} değeri 4.67 ± 0.09 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Antalyada Kemer, Kuzdere, Kesme boğazı mevkieinden toplanan *Origanum solymicum* bitkisinin DPPH değerleri; ekstrakt olarak su kullanıldığında IC_{50} değeri 64.3 ± 0.4 , n-bütanol 38.9 ± 0.6 , etil asetat 22.8 ± 1.2 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirtilmektedir [111]. Mersin yöresinden toplanan *Origanum Sipyleum L.* bitkisinin antioksidan çalışmalarında 500 $\mu\text{g/ml}$ derişiminde hazırlanan metanol ekstraktının DPPH (%) inhibisyon değeri 93.19 ± 3.80 $\mu\text{g/ml}$ olduğu belirtilmiştir [115].

Siddiq'in yaptığı çalışmada *Origanum* ailesine ait bir tür olan *Origanum vulgare* yapraklarından ekstraksiyon yapılmıştır. Sonuçlara göre total polifenol içeriği ve DPPH aktivitesi güçlü süpürücü etki gösterdiği belirtilmiştir [116]. Elde edilen veriler çalışmamızı destekleyici niteliktedir. Jayapraskasha ya göre

ekstraktın antioksidan aktivitesi polifenollerin varlığına bağlıdır [117]. Yaptığımız çalışmada polifenol içeriği yüksek bulunduğu için antioksidan aktivitesinin de yüksek olduğu gözlenmektedir.

Hücre kültüründe hücre canlılığını ve proliferasyonunu incelemek için çeşitli yöntemler (MTT, WST, MTS, XTT) kullanılmaktadır [118]. XTT testi farklı hücre tiplerine uygulanabilen, ucuz, radyoaktif olmayan, hızlı, hassas ve güvenilir bir kolorimetrik metottur. Çalışmamızda sitotoksikite analizi MCF-7, MDA-MB-231 ve paralel olarak sağlıklı MCF-10A hücre hatlarında XTT testi ile gerçekleştirildi [119,120].

Çalışmamızda *Origanum sipyleum L.* metanollü ekstraktının doza bağlı (15.625-1000 µg/mL) olarak hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra IC₅₀ değeri MCF-7 için sırasıyla 205±6.86; 147±4.23, MDA-MB-231 için sırasıyla 197±4.15; 96±3.46, MCF-10A için sırasıyla 248±3.21 ve 150±1.22 µg/mL olarak bulunmuştur.

Yapılan literatür taramasında *Origanum L.* ekstraktlarının farklı hücre serilerinde sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayesh ve arkadaşları Polonyada Al-Breem fidanlığında yetiştirilen *Origanum syriacum L.* bitkisiyle THP-1 (periferik kan) hücrelerinde yaptıkları çalışmada IC₅₀ değerini 2.126 µg/ml bulmuşlardır [121]. Al-Kalaldehy ve arkadaşları *Origanum L.* türünden *Origanum Vulgare*'nin MCF-7 hücre hattında antiproliferatif etkisinin gözlemlendiğini belirtmiş ve IC₅₀ değerinin 30.1µg/ml olarak bulmuşlardır [122]. Chaouki ve arkadaşları *Origanum L.* bir türü olan *Origanum Compactum* MCF-7 hücre hattında antiproliferatif etkisi incelemişlerdir. *Origanum compactum*'un metanol ve etil asetat ekstreği çıkarılmış 24h ve 48h inkübasyonlarda sırasıyla IC₅₀ değeri 575.57±20 ve 382.12±17 µg/ml olarak saptandığını belirtmişlerdir [123]. *Origanum L.* türünden *Origanum majorana* türü karaciğer hücre hattında uygulanmış IC₅₀ değeri 1511 µg/ml olarak bulunduğu belirtilmiştir [124]. Berrington ve Lall'ın yaptıkları çalışmada *Origanum*'un bir türü olan *Origanum vulgare* bitkisinin doz bağımlı olarak HeLa ve Vero hücrelerine uygulamışlardır. HeLa hücrelerinde IC₅₀ değeri 126.03±1.00µg/ml olarak bulunurken Vero hücrelerinde ise 163.8±2.95µg/ml bulunduğunu göstermiştir [125]. Al-kalaldehy

ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Origanum* türleri olan *Origanum syriacum* ve *Origanum vulgare* bitkilerinin MCF-7 hücre hattında 50µg/ml ekstrakt da 72 saat inkübasyon sonra IC₅₀ değerleri sırasıyla 23.89±2.43 ve 88.61±25.53 olarak bulunduğu belirtilmiştir [126]. Al Dhaheri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Origanum*'un bir türü olan *Origanum majorana*'nın etanol ekstraktında MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında 24 saat ve 48 saat uygulanmış IC₅₀ derğeri sırasıyla 350 µg/ml ve 400 µg/ml olarak saptandığı belirtilmiştir [127]. Al Dhaheri ve arkadaşlarının *Origanum L.* türünden *Origanum majorana*'nın etanolik ekstraktının MDA-MB-231 hücre hattına uygulamışlardır. Yapılan çalışma da *Origanum* ekstraktı meme kanseri hücre hattına doz bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir [128]. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Apoptozun belirlenmesinde TUNEL yöntemi, western blotting, M30 yöntemi, ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) ve flow sitometri gibi yöntemler kullanılmaktadır [129,130]. Flow sitometri; hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, membran potansiyelinin ve apoptozun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem oldukça hızlı ve kısa sürede binlerce hücreyi analiz ederek güvenilir sonuçlar verebilmektedir [131].

Metanollü *Origanum sipyleum L.* ekstraktının MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre serilerinde apoptoza olan etkileri flow sitometri ile araştırıldı. Çalışmamızda *Origanum sipyleum L.* metanollü ekstraktının MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A hücre hatlarında IC₅₀ değeri 24 saatte inkübasyonda uygulandıktan sonra hücre sayısı (%) sırasıyla MCF-7; 96.06±0.95, MDA-MB-231; 96.89±1.24, MCF-10A 98.53±1.31 olarak bulunmuştur. Abdel-Massih ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Origanum majorana*'nın etanolik ekstraktı insan lösemi hücre hatlarına uygulanmıştır. Yapılan çalışmada IC₅₀ değeri 48 saatte 8000 µg/ml olarak bulunmuş kontrole karşı hücre canlılığı 48 saat sonunda %78 azaldığı belirtilmiştir. *Origanum majorana* anti-proliferatif etkisinin apoptozisin indüklenmesine bağlı olup olmadığını araştırmak için Annexin V-flow sitometrik analizi yapmışlardır. *Origanum majorana* ekstreleri (1mg / ml), Jurkat hücrelerinde 24 saatte erken apoptozu (A +, PI) ve geç

apoptoz / nekrozu (A +, PI +) indüklemiştir. Erken apoptotik hücrelerde bir azalma ve 24 saatte A ve PI pozitif hücrelerinde bir artış, daha yüksek konsantrasyonda bitki özü (yaklaşık 2mg/ml) kullanıldığında gözlenmiştir [132].



6.SONUÇ

Tedavi amaçlı kullanılan ilaçların yaklaşık %50'si bitkisel kaynaklıdır. Bitkilerin biyolojik olarak aktif moleküllerin zengin kaynakları olmalarına rağmen şimdiye kadar sadece çok az bir kısmının biyolojik aktivitesinin değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Etkin biyoaktif ajanlara olan gereksinim nedeniyle, etnobotanik yaklaşıma dayalı olarak bitkilerin fitokimyasal ve biyoaktivite özelliklerine yönelik araştırmalar da hız kazanmıştır [133]. Çeşitli bitkisel ürünler insanlık tarihi boyunca kullanıldığından genellikle düşük riskli olarak kabul edilmektedirler. Bununla birlikte, bitkilerden elde edilen çeşitli ekstraktlar veya saf bileşiklerin bazıları insanlar için toksik de olabilmektedir. Bu nedenle, çeşitli in vitro ve in vivo tarama testleri ile bitkisel ürünlerin hem faydalı hem de toksik etkilerinin ortaya konulması oldukça önemlidir [134].

Sonuç olarak, *Origanum sipyleum L.* yüksek antioksidan ve antiproliferatif etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu bitkilerde aktif bileşiklerin saflaştırılması/tanımlanması, ilgili koruyucu mekanizmaların daha iyi anlaşılması sağlık alanındaki uygulamalar için gereklidir.

7.KAYNAKLAR

- [1] Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T (2012). Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. JBPC 3: 156-173.
- [2] Monteiro LS, Bastos KX, Barbosa-Filho JM, Athayde-Filho PF, Diniz MFFM, Sobral MV (2014). Medicinal plants and other living organisms with antitumor potential against lung cancer. Evid Based Complement Alternat Med ID 604152, 15 pages.
- [3] Olfat S, Moataz M, Yasser N, George M, Ziad G (2015). Role of microRNAs- 29b-2,-155,-197 and-205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. Gene 560: 77-82.
- [4] Davis, P. H. (Edt.) (1982). Flora of Turkey and The East Aegean Island. Univ. Press, Edinburgh, Vol. 7, pp. 297-313.
- [5] Kokkini, S. (1994). Herbs of the Labiatae. Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition, Academic Press, London, pp. 2342-2348.
- [6] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. (1995).Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116 (Ders Kitabı), 4. Baskı, Bornova-İZMİR, 396 s.
- [7] Zohary, M. (1973). Geobotanical foundations of the Middle East, Amsterdam, Vol. 1, pp. 156- 160, 169-181, 329.
- [8] Tan, K. (1984).More New Taxa from South and East Anatolia, Notes RBG Edinb. 42,1.
- [9] Duman, H., Aytaç, Z., Ekici, M., Karavelioğulları, F. A., Dönmez, A., Duran, A. (1995). Three New Species (Labiatae) from Turkey, Flora of Mediterranean 5, pp.221- 228.
- [10] Ietswaart, J. H. (1980). A Taxonomic Revision of the Genus *Origanum*, Leiden University Press, London.
- [11] Sarer, E., Scheffer, J.J.C. And Baerheim Svendsen, A. (1982). Monoterpenes in the essential oil of *O. majorana*, J. of Medicinal Plant research, 46, 236-239.

- [12] Gürsoy Ş (2008). Düzenli spor yapan öğrenci gruplarında egzersizin total antioksidan kapasite ve serum lipit profili üzerine etkisi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.58
- [13] Dirmenci, T., YAZICI, T., ÖZCAN, T., Celenk, S., & Martin, E. (2018). A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L.(Lamiaceae) from the west of Turkey. Turkish Journal of Botany, 42(1), 73-90.
- [14] Semiz, G., Semiz, A., & Mercan-Doğan, N. (2018). Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant and antibiofilm activities of four *Origanum* species from southeastern Turkey. International Journal of Food Properties, 21(1), 194-204.
- [15] Sevindik, B., İzgü, T., Şimşek, Ö., Tütüncü, M., Çürük, P., Yılmaz, Ö., Mendi, Y. Y. (2017). In Vitro Culture of Turkish *Origanum sipyleum* L. American Journal of Plant Biology, 2(5-1), 32-36.
- [16] Artun F.T., (2015) Farklı Bitki Ekstrelerinin In Vitro Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- [17] Erbaş, S., & Fakir, H. (2012). Türkiye'nin Batı Akdeniz Yöresinde doğal olarak yetişen dağ çayı (*Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis* (Bentham) Bornm) ve bayır kekiği (*Origanum sipyleum* L.) türlerinin uçucu yağ oranları ve bileşenlerinin belirlenmesi. Turkish Journal of Forestry, 13(2), 119-122.
- [18] Dirmenci, T., YAZICI, T., ÖZCAN, T., Celenk, S., & Martin, E. (2018). A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L.(Lamiaceae) from the west of Turkey. Turkish Journal of Botany, 42(1), 73-90.
- [19] Temel, M., & Tokur, S. (2006). *Origanum hypericifolium* Schwarz et Davis ve *O. sipyleum* L. Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Araştırmalar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 6(2), 71-88.
- [20] Kalan, A. (2005). Tamoksifen kullanan meme kanseri hastalarının endometrium patolojileri açısından değerlendirilmesinde transvajinal ultrasonografi, histeroskopi ve endometrial biyopsinin yeri. Uzmanlık tezi. İstanbul: şişli etfal eğitim ve araştırma hastanesi.

- [21] Çiçin, İ. (2008). Hormon reseptörü negatif ve her-2 negatif meme kanserli hastalarla hormone reseptörü negatif ve her-2 pozitif meme kanserli hastaların demografik, patolojik ve klinik özelliklerinin karşılaştırılması. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi.
- [22] Özdemir SY (2013). Meme kanserinde PIWIL-1 PIWIL-2, DICER-1, VE DDX-4 gen düzeylerinin araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kayseri.
- [23] Tavassoli, F.A., Devilee, P. (2003). “World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of the Breast And Female Genital Organs,” Lyon IARC, 227-228.
- [24] Demir, S. (2015). Türk propolisinin akciğer kanseri (A549) hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [25] Anders, C. Marcom, PK. Peterson, B. et al (2008). A pilot study of predictive markers of chemotherapy-related amenorrhea among premenopausal women with early stage breast cancer. *Cancer Invest*, 26:286–295.
- [26] Cullinane CA, Lubinski J, Neuhausen SL, Ghadirian P, Lynch HT, Isaacs C, Weber B, Moller P, Offit K, Kim-Sing C, Friedman E, Randall S, Pasini B, Ainsworth P, Gershoni-Baruch R, Foulkes WD, Klijn J, Tung N, Rennert G, Olopade O, Couch F, Wagner T, Olsson H, Sun P, Weitzel JN, Narod SA (2005). Effect of pregnancy as a risk factor for breast cancer in BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Int J Cancer*, 117(6):988–991.
- [27] Bozza C, Puglisi F, Lambertini M et al (2014). Anti-Mullerian hormone: determination of ovarian reserve in early breast cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 21:R51–R65.
- [28] Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein RC et al (2007). Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. *Br J Cancer*, 96:1808–1816.
- [29] Broer SL, Broekmans FJM, Laven JSE, Fauser BCJM (2014). Anti-Mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update*, 20:688–701.

- [30] Barbour S, Moore J, Dunn N, Effeney R, Harden H, McCarthy A, et al (2017). Patterns of care for ductal carcinoma in situ of the breast: queensland's experience over a decade. *Breast*, 35:169-76.
- [31] Rakovitch E, Nofech-Mozes S, Hanna W, Sutradhar R, Gu S, Fong C, et al (2017). Omitting radiation therapy after lumpectomy for pure DCIS does not reduce the risk of salvage mastectomy. *Breast*, 97:(17)305-9.
- [32] Goodwin A, Parker S, Ghersi D, Wilcken N (2013). Post-operative radiotherapy for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cochrane Database Syst Rev*, 11:CD000563.
- [33] Walker BL (1997). Adjustment of husbands and wives to breast cancer. *Cancer Pract*, 5:92-98.
- [34] Kadmon I, Woloski-Wruble A, Yongqin J, Wan-Min Q (2004). Social support as experienced by Chinese and Israeli husbands of breast cancer: a comparative study. *Eur J Oncol Nurs*, 8:131-137.
- [35] Group EBCTC, Darby S, McGale P, et al (2011). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 378:1707-16.
- [36] Poortmans P (2014). Postmastectomy radiation in breast cancer with one to three involved lymph nodes: ending the debate. *Lancet*. 383:2104–2106.
- [37] Raghu R, Lu K-H, Sheen L-Y (2012). Recent research progress on garlic as a potential anticarcinogenic agent against major digestive cancers. *J Tradit Complement Med* 2: 192-201.
- [38]] Lujambio, A., Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle*. 2009 Feb 1;8(3):377-82.
- [39] Seyfried, T. N., Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, 2013;18(1-2):43-73
- [40] Dal A. (2016). Meme Kanseri Metastazında Serbest DNA'ların Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- [41] Guan, X. (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2015 Sep;5(5):402-18.
- [42] Ünal, G. (2001). Microscopic anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. *Cancer of the breast*. 4th edition. Philadelphia, London. W.B.Saunders: 1995:16-21
- [43] Torre Lindsey A, Siegel Rebecca L, Ferlay Jacques, Lortet-Tieulent Joannie, Jemal Ahmedin (2015). *Global Cancer Statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 65:87–108.
- [44] Ariyan, S. (1979). The pectoralis major myocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg*, 63(1), 73-81.
- [45] Torre Lindsey A, Siegel Rebecca L, Ferlay Jacques, Lortet-Tieulent Joannie, Jemal Ahmedin (2015). *Global Cancer Statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 65:87–108.
- [46] Laronga, C., Kemp, B., Johnston, D., Robb, G. L., & Singletary, S. E. (1999). The incidence of occult nipple-areola complex involvement in breast cancer patients receiving a skin-sparing mastectomy. *Annals of Surgical Oncology*, 6(6), 609-613.
- [47] Wang, X., & Ning, L. (2008). Breast carcinoma associated with Poland's syndrome: One case report and literatures review. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 223.
- [48] Strickler, T. L. (1978). Myology of the shoulder of *Pontoporia blainvillei*, including a review of the literature on shoulder morphology in the cetacea. *American Journal of Anatomy*, 152(3), 419-431.
- [49] Laronga, C., Kemp, B., Johnston, D., Robb, G. L., & Singletary, S. E. (1999). The incidence of occult nipple-areola complex involvement in breast cancer patients receiving a skin-sparing mastectomy. *Annals of Surgical Oncology*, 6(6), 609-613.
- [50] Gerber, B., Krause, A., Reimer, T., Müller, H., Küchenmeister, I., Makovitzky, J., ... & Friese, K. (2003). Skin-sparing mastectomy with conservation of the nipple-areola complex and autologous reconstruction is an oncologically safe procedure. *Annals of surgery*, 238(1), 120.
- [51] Herbette, M., & Tom, C. (2008). U.S. Patent Application No. 11/801,453.

- [52] Stephenson GD, Rose DP (2003). Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer*, 45:1- 16
- [53] Olfat S, Moataz M, Yasser N, George M, Ziad G (2015). Role of microRNAs- 29b-2,-155,-197 and-205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 560: 77-82.
- [54] Dunham MH (2003). “Data Mining Introductory and Advanced Topics”, Prentice Hall, Pearson Education Inc.
- [55] Atmaca H (2013). Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Trabectedin (ET-743) Molekülünün Etkileştiği Moleküler Sistemlerin Araştırılması. Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [56] Dunham MH (2003). “Data Mining Introductory and Advanced Topics”, Prentice Hall, Pearson Education Inc.
- [57] Ashing-Giva K, Ganz PA, Petersen L (1999). Quality of life African-American and white long term breast carcinoma survivors. *Cancer*, 15:418-426.
- [58] Zissiadis Y, Langlands AO, Barraclough B, Boyages J (1997). Breast conservation: long-term results from Westmead Hospital. *Aust N Z J Surg*, 67:313-319.
- [59] Fix LN, Shah M, Efferth T, Farwell MA, Zhang B (2010). MicroRNA expression profile of MCF-7 human breast cancer cells and the effect of green tea polyphenon-60. *Cancer Genom Proteom* 7: 261-277.
- [60] Zaleska K (2015). miRNA-Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now? *Rep Pract Oncol Radiother* 20: 79-86.
- [61] Atmaca H (2013). Meme Kanseri Hücre Kültürlerinde Trabectedin (ET-743) Molekülünün Etkileştiği Moleküler Sistemlerin Araştırılması. Doktora Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [62] Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT (1993). Breast cancer after treatment of Hodgkins disease. *JNCI* 85:25- 29.
- [63] İnanç, S. (1997). “Meme Kanserinin Doğal Seyri ve Prognostik Faktörler,” Meme Kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi, (Ed: Topuz, E.), İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 72-101.

- [64] Cengiz, A. (2006). İn Situ Meme Kanserinde Cerrahi Tedavi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:54 Aralık; 79-85.
- [65] Ganz, P.A., Casillas, J.N., Coscarelli, A. (2010). Estimating the human costs of cancer survivorship in children. *Ann Intern Med.*152(7): p. 465-6
- [66] Rosai, J., Ackerman, LV., Rosai, J., Ackerman LV. (2004). *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, Mosby, Ninth edition, Edinburg; 2:1764-876.
- [67] Lester, SC., Kumar, V., Abbas, AK., Fausto, N., Aster, JS. (2010). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Eighth edition, Philadelphia, Saunders; 1065-95.
- [68] Taraphdar, AK., Roy, M., Bhattacharya, RK. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci* 80: 1387-1396.
- [69] Koff, JL., Ramachandiran, S., Bernal, LM. (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci* 16: 2942-2955.
- [70] Yazıcı, P., Alizadehshargh, S., Akdoğan, GG. (2009). Apoptoz: düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 29: 1677-1686.
- [71] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004 Jul;5(7):674-8.
- [72] Liang CH, Wang GH, Chou TH, Wang SH, Lin RJ, Chan LP, So EC, Sheu JH (2012). 5-epi-Sinuleptolide induces cell cycle arrest and apoptosis through tumor necrosis factor/mitochondria-mediated caspase signaling pathway in human skin cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1820: 1149-1157.
- [73] Koff JL, Ramachandiran S, Bernal LM (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci* 16: 2942-2955.
- [74] Ashkenazi, A., Dixit, V. (2001). Death receptors: signaling and modulation. *Science*;281:1305-1308.
- [75] Wajant H., 2002, The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.*; 296:1635–1636.

- [76] Aydoğar A (2012). İnsan meme kanseri hücre serisi (mcf-7) üzerinde phellodendron lavalleyi bitkisinden izole edilen felavin saf maddesinin sitostatik ve apopitotik etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bolu.
- [77] Martinez MM, Reif RD, Pappas D (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal Methods* 2: 996-1004.
- [78] Ulukaya E, Acilan C, Ari F, İkitimur E, Yilmaz Y (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turk J Biochem* 36: 261-269.
- [79] Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M (2012). Apoptosis in cancer: An update. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 4873-4878.
- [80] Dinçel GÇ, Kul O (2016). Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences* 5: 86-108.
- [81] Henry CM, Hollville E, Martin SJ (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61: 90-97.
- [82] Taneli F (2007). Methodology of flow cytometry and its role in clinical laboratory. *Journal of Turkish Clinical Biochemistry* 5: 75-82.
- [83] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37: 163-176.
- [84] Karaboz İ, Kayar E, Akar S (2008). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 6: 1-18.
- [85] Demirel D (1995). Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri. *Türk Patoloji Dergisi* 11: 64-65.
- [86] Weyermann J, Lochmanna D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int Phytorem.* 2005 Jan 20;288(2):369-76
- [87] Riss TL, Moravec RA.(2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2004 Feb;2(1):51-62.

- [88] Abe K, Matsuki N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 2000 Dec;38(4):325-9.
- [89] Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991; 3(7): 207-212.
- [90] Ngamwongsatit P, Banada PP, Panbangred W, Bhunia AK. (2008). WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods* 2008 Jun;73(3):211-5.
- [91] Tüzüner U. (2014). *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun modifiye mikropalak ve XTT yöntemi ile saptanması. Uzmanlık Tezi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi. İzmir.
- [92] Mossman T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63
- [93] Tunç T., (2013). Antineoplastik İlaç İçeren Maleik Anhidrit Kopolimer Konjugatlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri, İlaç Salım Davranışları ve Meme Kanseri Hücre Serileri Üzerine Antitümör Aktivitelerinin İncelenmesi, *Doktora Tezi Cumhuriyet Üniversitesi.*
- [94] Gürer S.E., (2018). Palmarosa (*Cymbopogon martinii*) ve Nioli (*Melaleuca viridiflora*) Uçucu Yağlarının, Antimikrobiyal, Antitümör ve Sitotoksik Aktivitelerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi*
- [95] Ok E. (2010). Kök kanal irrigasyon ve dezenfeksiyonunda % 1, % 2 ve % 5'lik kekik (*o. minutiflorum*) suyunun sitotoksitesinin, *e. feacalis* ve smear tabakasına etkisinin in vitro ve ex vivo olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endodonti Anabilim Dalı, Isparta.

- [96] İrnaç B., (2015) *Origanum onites* L. Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Biyoaktif Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi
- [97] Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D., Karlovic, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115: 441-448.
- [98] Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3): 178-182.
- [99] Lin, J.Y., Tang, C.Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101: 140-147.
- [100] Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 3482-3485.
- [101] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., and Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) And Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122-3128.
- [102] Singh, R., Singh, S., Kumar, S., Arora, S. (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry*, 103: 505-511,
- [103] Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- [104] Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 1199-1200.
- [105] Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ Jr (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 53(3):661–674.PMID: 4412247.

- [106] Zizic JB, Vukovic NL, Jadranin MB, Anelkovic BD, Tesevic VV. Kacaniova MM, Sukdolak SB, Markovic SD (2013). Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *J Sci Food Agric* 93: 3001-3009.
- [107] Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huaman A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem* 113: 1243-1251.
- [108] Elhardallou, S.B., 2011, Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants, *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(3), 201-229.
- [109] Özkan G., (2007). Türkiye’ De Lamiaceae (Labiatae) Familyasına Ait Baharat veya Çeşni Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerin Fenolik Bileşenleri İle Antioksidan Ve Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi.
- [110] Oflaz, S., Kürkçüoğlu, M., Baser, K. H. C., 2002, *Origanum onites* ve *Origanom vulgare* Subsp. Hirtum Üzerinde Farmokognozük Çalışmalar, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29 – 31 Mayıs 2002, 252 – 258.
- [111] Erenler, R., Adak, T., Karan, T., Elmastas, M., Yıldız, I., Aksit, H., Sanda, M. A. 2017. Chemical constituents isolated from *Origanum Solymicum* with antioxidant activities. *The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics*, 1, 139-145.
- [112] Ozkan, G., Sagdic, O., Ekici, L., Ozturk, I., & Ozcan, M. M. (2007). Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *Journal of food lipids*, 14(2), 157-169.
- [113] Erenler, R., Meral, B., Sen, O., Elmastas, M., Aydın, A., Eminagaoglu, O., Topcu, G. (2017). Bioassay-guided isolation, identification of compounds from *Origanum rotundifolium* and investigation of their antiproliferative and antioxidant activities. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1646-1653.

- [114] Baddal M.K. (2010) *Origanum Minutiflorum* Bitkisinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- [115] Karagöz, A., Artun, F. T., Özcan, G., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., & Sütlüinar, N. (2015). In vitro evaluation of antioxidant activity of some plant methanol extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1184-1189.
- [116] Siddiq, M., Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food chemistry*, **2017**. 218 p.216-220.
- [117] Jayaprakasha, G.K., Selvi, T. And Sakariah, K.K. 2003. Antibacterial And Antioxidant Activities Of Grape (*Vitis Vinifera*) Seed Extracts. *Food Res. Int.* 36, 117–122.
- [118] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288: 369-376.
- [119] Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 76: 545-558.
- [120] Goiato MCA, Freitas E, Santos DD, Medeiros RD, Sonogo M (2015). Acrylic resin cytotoxicity for denture base -literature review. *Adv Clin Exp Med* 24: 679-686.
- [121] Ayesh, B. M., Abed, A. A., Doa'a, M. F. (2014). In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. *BMC research notes*, 7(1), 612.
- [122] Al-Kalaldeh, J. Z., Abu-Dahab, R., Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 30(4), 271-278.
- [123] Chaouki, W., Leger, D. Y., Eljastimi, J., Beneytout, J. L., & Hmamouchi, M. (2010). Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmaceutical biology*, 48(3), 269-274.

- [124] Liang, TL., Li, TL., Lien, CC., Chun, CL. (2002). In vitro antihepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytother Res* 16: 440–444.
- [125] Berrington, D., Lall, N. (2012). Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- [126] Al-Kalaldeh, J. Z., Abu-Dahab, R., Afifi, F. U. (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutrition Research*, 30(4), 271-278.
- [127] Al Dhaheri, Y., Eid, A., AbuQamar, S., Attoub, S., Khasawneh, M., Aiche, G., ... & Iratni, R. (2013). Mitotic arrest and apoptosis in breast cancer cells induced by *Origanum majorana* extract: upregulation of TNF- α and downregulation of survivin and mutant p53. *PLoS One*, 8(2), e56649.
- [128] Al Dhaheri, Y., Attoub, S., Arafat, K., AbuQamar, S., Viallet, J., Saleh, A., Iratni, R. (2013). Anti-metastatic and anti-tumor growth effects of *Origanum majorana* on highly metastatic human breast cancer cells: inhibition of NF κ B signaling and reduction of nitric oxide production. *PLoS One*, 8(7), e68808.
- [129] Özyay G, Ülker E (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi* 2: 73-78.
- [130] Clarke ST, Calderon V, Bradford JA (2017). Click chemistry for analysis of cell proliferation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 82: 7.49.1-7.49.30.
- [131] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37: 163-176.
- [132] Abdel-Massih, R. M., Fares, R., Bazzi, S., El-Chami, N., & Baydoun, E. (2010). The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leukemia research*, 34(8), 1052-1056.

- [133] Elhardallou, S. B. (2011). Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(3), 201-29.
- [134] Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK (2001). Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci* 80: 1387-1396.



8.ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gamze TÜZÜN

Doğum Tarihi: 18 Temmuz 1993

Elektronik posta: gamzekekul@gmail.com

Telefon:0507 (788 81 53)

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Mühendisliği	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	2016
Y. Lisans	Eczacılık / Biyokimya	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi	-

Bilimsel Araştırma Alanları:

- Antioksidanlar
- Hücre kültürü/Sitotoksosite
- Antimikrobiyal

Katıldığı Kongreler:

1. 5. Uluslararası İlaç Kimyası Kongresi, 2017, Antalya
2. 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi(İVEK) , 26-29 nisan 2017, İstanbul
3. 6. Ulualararası İlaç Kimyası Kongresi, 25-26 MART 2018, ANTALYA

Projeler:

1. 2-Benzoil-1,3-Diaril-2,3,3a,8a-Tetrahidrosiklopenta[A]İnden-8(1h)-On Türevlerinin Sentezi, Tiyosemikarbazon ve Tiyazol Türevlerine Dönüşümü, Antikanser ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi
2. “*Origanum sipyleum L.* (mor mercan) Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi”

SCI Kapsamındaki Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. **C Hepokur, A Günsel, MN Yarasir, AT Bilgiçli, B Tüzün, G Tüzün, İ Yaylım** “Novel type ketone-substituted metallophthalocyanines: synthesis, spectral, structural, computational and anticancer studies” 89, 56296-56305 (2017)

Uluslararası Sempozyum ve Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. **Hepokur C., Bilgiçli A. T., Yaraşirm. N., Tüzün G., Yaylım İ.** “Ftalosiyanın Türevlerinin Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” 5. Uluslararası İlaç Kimyası Kongresi, 2017, Antalya
2. **Yıldız H., Tüzün G., Mısır S., Balhca S., Çiçek M., Hepokur C.** “Thymbra sintenisii subsp. Isaurica (Kara Kekik)’in Farklı Kanser Hücre

katlarında Anti-kanser Etkilerinin İncelenmesi” 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 26-29 Nisan 2017, İstanbul

3. **Gezegen H., Tutar U., Hepokur C., Tüzün G.,** "Yeni 2-benzoil-1,3-diaril-2,3,3a,8a-tetrahidrosiklopenta [a]inden-8(1H)-on Türevlerinin Sentezi ve Aktivitelerinin İncelenmesi” 6. Uluslararası İlaç Kimyası Kongresi, 25-27 MART 2018, ANTALYA
4. **Tüzün G., Hepokur C.,** “*Origanum sipyleum L.* (mor mercan) Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi” 6. Ululararası İlaç Kimyası Kongresi, 25-26 MART 2018, ANTALYA

