

**T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ÖKSE OTU
EKSTRAKTLARININ APOPTOTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esin SAKALLI ÇETİN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Engin ULUKAYA**

2011-İSPARTA

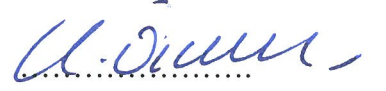
KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 02 / 05/ 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Doç. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Pamukkale Üniversitesi, Denizli



Üye : Doç. Dr. Efkan UZ
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



Üye : Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta



ONAY : Bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ
Enstitü Müdürü

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ÖKSE OTU
EKSTRAKTLARININ APOPTOTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ESİN SAKALLI ÇETİN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Engin ULUKAYA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 1741-D-08 Proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No:**

2011-İSPARTA

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmalarım esnasında her türlü yardım, ilgi ve desteğini gördüğüm, öneri ve eleştirileri ile beni daima yönlendiren değerli danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Çalışma konusunun belirlenmesinden, araştırmanın sonuçlanmasına kadar her aşamasında desteğini ve fikirlerini esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Doktora tez çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Sayın Yrd. Doç. Dr. Serap ÇELİKLER'e Sayın Arş. Gör. Ferda ARI'ya Sayın Arş. Gör. Mehmet SARIMAHMUT'a ve Sayın Yüksek Lisans Öğrencisi Buse CEVATEMRE'ye, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Sayın Uzm. Dr. Dilek ABİ YEĞİN'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nden (BİBAM) Sayın Doç.Dr. Lütfi GENÇ'e,

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardım ve önerileri ile tezime katkıda bulunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof.Dr. H. Ramazan YILMAZ'a, Sayın Doç. Dr. Efkan UZ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşe ALTUNBAŞAK'a ve Arş. Gör. Dilek AŞCI'ya

Çalışmaya mali destek veren Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine (1741-D-08) ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Meme Kanseri	2
2.1.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	3
2.1.2. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması	7
2.1.3. Meme Kanserinin Evrelemesi	7
2.1.4. Meme Kanseri Tedavisi	9
2.1.5. Meme Kanserinde Kemoterapi	9
2.2. <i>Viscum album</i> L. Hakkında Genel Bilgiler	9
2.2.1. <i>Viscum album</i> L.'un Sistematığı	10
2.2.2. <i>Viscum album</i> L.'un Genel Özellikleri	11
2.2.3. <i>Viscum album</i> L. Genusunun Bileşikleri	14
2.2.3.1. Lektinler	14
2.2.3.2. Viskotoksinler	15
2.3. ÖKSE OTU (<i>Viscum album</i>) Ekstraktının Apoptozis Mekanizması	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Ekstraktların Hazırlanması	22
3.2. Hücre Kültürü	23
3.3. Kullanılan Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması	24
3.4. Hücrelerin Sayılması	25
3.5. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu	25
3.6. ATP Canlılık Testi	26
3.7. Tripan Blue Boyama Yöntemi	27
3.8. Hematoksilen Boyama Yöntemi	28
3.9. İkili Boyama (Double Staining) Yöntemi	29
3.10. Western Blot Yöntemi	31
3.10.1. Hücre Lizisi	31

3.10.2. Örnek yüklemesi	32
3.10.3. Elektroforez	32
3.10.4. Transfer	33
3.10.5. Deteksiyon	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Sitotoksisite MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları	35
4.1.1. MTT metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	36
4.1.1.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları	37
4.1.1.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları	37
4.1.1.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları	40
4.1.1.4. İnterferansın Araştırılması	42
4.1.2. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	44
4.1.3. MTT Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	44
4.1.3.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları	45
4.1.3.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları	47
4.1.3.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları	48
4.1.3.4. İnterferansın Araştırılması	50
4.1.4. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	51
4.2. Ökse Otu Ekstraktlarının MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Mikroskopta Tespiti.....	52
4.2.1. Tripan Blue Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti.....	52
4.2.2. İkili Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti	53
4.2.3. Hematoksilen Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti.....	55
4.3. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Sitotoksisite MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları	59
4.3.1. MTT metodu ile MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	59
4.3.1.1. 24 saatlik inkübasyon bulguları	60
4.3.1.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları	63
4.3.1.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları	64
4.3.1.4. İnterferansın Araştırılması	65

4.3.2. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	65
4.3.3. MTT metodu ile MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	66
4.3.3.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları	66
4.3.3.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları	69
4.3.3.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları	70
4.3.3.4. İnterferansın Araştırılması	71
4.3.4. ATP Canlılık Testi ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri	72
4.4. Ökse Otu Ekstraktlarının MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Mikroskopta Tespiti	72
4.4.1. Tripan Blue Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti	73
4.4.2. İkili Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti	73
4.4.3. Hematoksilen Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti	76
4.5. Ökse Otu Ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Apoptotik Etkinin Western Blot Metodu ile Tespiti.....	78
5. TARTIŞMA	79
ÖZET.....	86
SUMMARY	88
KAYNAKLAR	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Uluslararası patentli ticari ökse otu (V. album) özütleri ve sahip oldukları aktiviteler.	13
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Viscum album L.</i> 'nin Genel Görünümü.....	11
Şekil 2. Fas- fas ligand aracılı apoptoz	18
Şekil 3. Fas reseptörleri ile sitokrom-c salınımı	18
Şekil 4.1. MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm'de verdikleri absorbans değerleri	35
Şekil 4.2. Endemik ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	37
Şekil 4.3: Endemik ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	38
Şekil 4.4: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	40
Şekil 4.5: Endemik ökse otu ekstraktlarının PH'ları Ökse-Ç: 7.41, Ökse-B: 7.43 ve Ökse-K: 7.39 olarak ayarlandıktan sonra 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	43
Şekil 4.6: Endemik ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi	43
Şekil 4.7: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi	44
Şekil 4.8: Ticari ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	45
Şekil 4.9: Ticari ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	47
Şekil 4.10: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72 saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	49
Şekil 4.11: Ticari ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile gösterilmesi	51
Şekil 4.12: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi	52
Şekil 4.13: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin tripan blue boyaması ile gösterilmesi.....	53
Şekil 4.14: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ikili boyama ile gösterilmesi	54
Şekil 4.15: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin hematoksilen boyama ile gösterilmesi.....	56
Şekil 4.16: Endemik ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	60

Şekil 4.17: Endemik ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	64
Şekil 4.18: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	64
Şekil 4.19: Endemik ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi.	65
Şekil 4.20: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.	66
Şekil 4.21: Ticari ökse otu ekstraktlarının 24 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	67
Şekil 4.22: Ticari ökse otu ekstraktlarının 48 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	70
Şekil 4.23: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.	71
Şekil 4.24: Ticari ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi.	71
Şekil 4.25: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.	72
Şekil 4.26: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre soyu üzerine olan etkisinin tripan blue boyaması ile gösterilmesi.....	73
Şekil 4.27: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin ikili boyama ile gösterilmesi.	74
Şekil 4. 28: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin hematoksilen boyama ile gösterilmesi.	77
Şekil 4.29: Ökse-K ve Helixor-P ökse otu ekstraktlarının 24 ve 48 saat süreyle uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücre hatları üzerine apoptotik etkilerinin western blot metodu ile gösterilmesi.	
M: Marker, K: Kontrol, Ö-24: Ökse-K 24 saat uygulama, Ö-48: Ökse-K 48 saat uygulama, H-24: Helixor-P 24 saat uygulama, H-48: Helixor-P 48 saat uygulama..	78

RESİMLER DİZİNİ

Resim 4.1: MTT testinden önce pozitif kontrol MDA-MB-231 hücreleri	36
Resim 4.2: MTT testinden önce negatif kontrol MDA-MB-231 hücreleri	36
Resim 4.5: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)	38
Resim 4.6: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)	38
Resim 4.7: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	39
Resim 4.8: 0.5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	39
Resim 4.9: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	39
Resim 4.10: 0.5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)	39
Resim 4.11: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	39
Şekil 4.12: 0.5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	39
Resim 4.13: % 2.5 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	40
Resim 4.14: % 1.2 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	40
Resim 4.15: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)	41
Resim 4.16: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)	41
Resim 4.17: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	41
Resim 4.18: 0,5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	41
Resim 4.19: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	41
Resim 4.20: 0,5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	41
Resim 4.21: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	42
Resim 4.22: 0,5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	42
Resim 4.23: % 2.5 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)	42

Resim 4.24: % 1.2 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	42
Resim 4.25: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	45
Resim 4.26: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 Hücreleri (x20).....	45
Resim 4.27: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.28: 0,5 mg/ml Helixor A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.29: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.30: 0,5 mg/ml Helixor P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.31: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.32: 0,5 mg/ml Helixor M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10).....	46
Resim 4.33: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10).....	47
Resim 4.34: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	47
Resim 4.35: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	48
Resim 4.36: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	48
Resim 4.37: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	48
Resim 4.38: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10).....	49
Resim 4.39: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	49
Resim 4.40: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 Hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	49
Resim 4.41: 0,5 mg/ml Helixor A uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 Hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	49
Resim 4.42: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	50
Resim 4.43: 0,5 mg/ml Helixor P uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	50
Resim 4.44: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	50

Resim 4.45: 0,5 mg/ml Helixor M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	50
Resim 4.46: Hoechst ile 72 saat sonra boyanan canlı ve ölü kontrol MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	54
Resim 4.47: Propidium iyodür ile 72 saat sonra boyanan ölü kontrol MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	54
Resim 4.48: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)	54
Resim 4.49: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	54
Resim 4.50: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)	55
Resim 4.50: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	55
Resim 4.51: Hematoksilen ile 72 saat sonra boyanan kontrol MDA-MB-231 hücreleri	56
Resim 4.52: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hematosilen ile boyanan MDA-MB-231 Hücreleri (20x)	56
Resim 4.53: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hematosilen ile boyanan MDA-MB-231 Hücreleri (10x).....	56
Resim 4.54: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x20).....	57
Resim 4.55: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10).....	57
Resim 4.56: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10).....	57
Resim 4.57: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10).....	57
Resim 4.58: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	57
Resim 4.59: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	57
Resim 4.60: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	58
Resim 4.61: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x20)	58
Resim 4.62: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10).....	58
Resim 4.63: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10).....	58
Resim 4.64: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 20).....	58

Resim 4.65: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	59
Resim 4.66: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	59
Resim 4.67: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x).....	59
Resim 4.68: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MCF-7 hücreleri (x10)	61
Resim 4.69: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	61
Resim 4.70: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	61
Resim 4.71: 0.5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	61
Resim 4.72: 0.16 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	61
Resim 4.73: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	62
Resim 4.74: 0.5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	62
Resim 4.75: 0.16 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	62
Resim 4.76: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	62
Resim 4.77: 0.5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	62
Resim 4.78: 0.16 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	63
Resim 4.79: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MCF-7 hücreleri (x10)	67
Resim 4.80: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	67
Resim 4.81: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	67
Resim 4.82: 0.5 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	67
Resim 4.83: 0.16 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	68
Resim 4.84: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	68
Resim 4.85: 0.5 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	68

Resim 4.86: 0.16 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	68
Resim 4.87: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	69
Resim 4.88: 0.5 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	69
Resim 4.89: 0.16 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10).....	69
Resim 4.90: Hoechst ile 72 saat sonra boyanan canlı ve ölü kontrol MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.91: Propidium iyodür ile 72 saat sonra boyanan ölü kontrol MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.92: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.93: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.94: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.95: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MCF-7 hücreleri (10x).....	75
Resim 4.96: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x).....	76
Resim 4.97: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü - MCF-7 hücreleri (10x).....	76
Resim 4.98: Hematoksilen ile 72 saat sonra boyanan kontrol MCF-7 hücreleri.....	77
Resim 4.99: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Hematosilen ile boyanan MCF-7 Hücreleri (20x).....	77
Resim 4.100: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hematosilen ile boyanan MCF-7 Hücreleri (20x).....	77
Resim 4.101: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hematosilen ile boyanan MCF-7 Hücreleri (10x).....	77

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olup, kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Son yıllarda meme kanserinin tanı ve tedavisinde birçok ilacın kullanıma girmesine rağmen tedavinin etkinliği tatmin edici şekilde artmamıştır. Bu nedenle halen riskli bir hastalık olma özelliğini koruduğundan daha etkili tedavi şekillerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Meme kanseri tedavilerinin uzun, pahalı ve bazen organ kaybına neden olması ve hastalığın çabuk yayılabilmesi kadınlar arasında en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Meme kanserinde erken tanı çok önemlidir. Evreleme açısından heterojen bir grup olan meme kanserinin hangi evrede olduğu tespit edildikten sonra uygun tedavi seçeneğine başlanmalıdır. (Spears and Bartlett 2009).

Geleneksel tedavilerde başarı sınırlı olduğundan, kanser hastalarının çoğu komplementer ve alternatif tıptan köken alan tedavileri denenmektedir. Ökse otu (Mistletoe, *Viscum album* L.) preparatları komplementer/ alternatif kanser terapisinin en sık kullanılan formudur. Avrupa'da bu preparatlar sıklıkla standart kemoterapi yada radyoterapi ile birlikte adjuvan tedavi protokollerinde kullanılır. Son yıllardaki çalışmalar, ökse otu ekstraktlarının kültüre edilmiş insan tümör hücreleri ve lenfositlerinin apoptotik yolla ölümlerini indüklediğini ve immün sistemi uyardığını göstermektedir. Bu bulgular, pürifiye bileşenlerden ziyade tüm bitki ekstraktının etkili bir immünoaktivant ve anti tümör ajan olduğunu göstermektedir (Eggenschwiler et al., 2007).

Bu çalışmada, ülkemizde yetişen endemik ökse otunun alt türlerine ait tüm bitki ekstraktlarının, iki farklı meme kanseri hücre hattı üzerine apoptotik etkisi araştırıldı. Aynı zamanda bu etki, Almanya'da ticari olarak üretilen ve tedavi amacıyla kullanılan aynı alt türlere ait ekstraktların etkisi ile karşılaştırıldı. Daha ileri ki çalışmalar için başlangıç niteliğinde olan bu çalışma ile ökse otunun sitotoksik etkisinin ortaya konulması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Bütün dünyada görülme sıklığı gittikçe artmakta olan meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Aslan ve ark., 2007). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO)'ne göre dünya genelinde her yıl 1,2 milyon kişi meme kanseri tanısı almakta ve 500 000 kadarı bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Ries et al., 2007). National Cancer Institute (NCI), ABD genelinde 2008 yılı için hesaplanan yeni meme kanseri vaka sayısını kadınlarda 182.460, erkeklerde 1990 vaka; beklenen ölümleri ise kadınlarda 40.480, erkeklerde 450 vaka olarak rapor etmiştir. NCI 2000-2004 verilerine göre her sekiz kadından birinde hayatı boyunca meme kanseri gelişebileceği ve her otuz kadından birinin meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Curado et al., 2003). Meme kanserli hastalarda tüm evrelere göre 5 yıllık sağ kalım oranı, gelişmiş ülkelerde %73 iken, gelişmekte olan ülkelerde %53 olarak bildirilmektedir. Aradaki bu önemli fark, gelişmiş olan ülkelerde tarama mamografisi sayesinde erken tanı ve daha iyi tedavi olanakları ile açıklanabilir. Meme kanseri fatalite hızı gelişmiş olan ülkelerde %30 (190 000 ölüm / 636 000 olgu), az gelişmiş ülkelerde ise %43 (221 000 ölüm / 514 000 olgu) 'dür (Özmen ve ark., 2009).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre, Türkiye'de 2005 yılında kadınlarda en sık rastlanılan kanser türünün, %35,47'lik insidans ile meme kanseri olduğu bildirilmektedir. Diğer kanser türleri sırasıyla deri, tiroid ve akciğer kanserleridir. (<http://www.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi:21.3.2010) Ülkemizde mevcut verilere göre meme kanseri sıklığının, doğu bölgelerimizde 20/100 000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100 000 oranında olduğu tahmin edilmektedir (Özmen ve ark., 2009). Bu rakamlardan yola çıkılarak, Türkiye'de her yıl meme kanserine yakalanan kadın sayısının on bin kadar olduğu hesaplanabilir. Ülkenin doğusu ile batısı arasındaki sıklık farkı, Türkiye'nin batı bölgelerindeki yaşamın batı toplumlarındakine benzerliğinden ("*Westernizing life*") kaynaklanmaktadır. Kadınlarda erken menarş (<12 yaş), geç doğum (>30 yaş), geç menopoz (>55 yaş), daha fazla hormon replasman tedavisi alma, daha kısa laktasyon süresi ve beslenme alışkanlıklarındaki

değişiklikler, batı tipi yaşam biçiminin meme kanserinin insidans hızının artması ile ilgili öğeleri arasında sayılabilir (Özmen ve ark., 2009).

2.1.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

➤ **Yaş:** Meme kanseri için önemli risk faktörlerinden birisi ilerleyen yaştır. Meme kanseri tanısı konan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, %70'inin yaşının 50 yaş ve üzerinde olduğu ifade edilmekte ve riskin 4 kat daha fazla olduğunun altı çizilmektedir (Somunoğlu 2007).

➤ **Ailesel meme kanseri hikayesi:** Meme kanseri aile hikayesi olan kişilerde meme kanserinin ortaya çıkma yaşı daha erken olup, hastalık bilateral olmaya eğilimlidir ve hastalığın ortaya çıkışı özellikle annesinde meme kanseri olanlarda daha da belirgindir (Telo 2006). Yapılan 52 epidemiyolojik çalışmada 80 yıllık yaşam süresi boyunca meme kanseri oluşma riski %7.8 iken, birinci derece yakınında (anne, kızkardeş veya kız evlat) meme kanseri hikayesi bulunanlarda riskin %13.3 olduğu, iki tane birinci derece yakınında olması halinde ise riskin %21.1'e yükseldiği gösterilmiştir (Bryant 2004, Campbell 2002, Rogers et al., 2002, Williams et al., 2002, Smith et al., 2003).

➤ **Genetik Etkenler:** Tüm meme kanserlerinin %5-10'nu kalıtsaldır. Genetik meme kanseri olgularında özellikle BRCA-1(Breast cancer susceptibility gene-1), BRCA-2 (Breast cancer susceptibility gene-2), RB (Retinoblastoma) ve p-53 gen mutasyonları etkili olmaktadır. Bunlar, tümör supresör genlerdir ve tahmini olarak erken ortaya çıkan meme kanserlerinin ailesel grupta olanlarının yaklaşık %50'sinde önem taşıdıkları bildirilmiştir. BRCA-1 geni, 17. kromozom üzerinde bulunur, otozomal dominant geçiş gösterir, ailevi meme kanseri ve over kanserinde etyolojik rol oynadığı kabul edilmektedir. 13. kromozom üzerinde bulunan BRCA-2 geni ailevi olgularda hastalığın erken ortaya çıkışında ve bilateral hastalıkta rol oynamaktadır (Clamp et al., 2003). 70 yıllık yaşam süresi boyunca, BRCA-1 gen defektli kadınların %85'inde, BRCA-2 defektli olan kadınların ise %87'sinde meme kanserine yakalanma riski taşıdıkları bildirilmiştir (Bryant 2004). Resesif Retinoblastoma geni 13. kromozom üzerinde bulunur ve bu kromozomda heterojenitenin kaybı premenapozal meme kanserine neden olmaktadır. Kolon kanserinde olduğu gibi 17. kromozomdaki P53 supressör geni de meme kanseri

gelişimin de önemli bir gendir ve genin kaybı ile meme kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Yine erb-B-2 onkogeninin meme ve over kanseri prognozunu belirlemede önemli bilgiler verdiği gösterilmiştir (Clamp et al., 2003).

➤ **Kişisel Meme Kanseri Hikayesi:** Daha önce meme kanseri geçiren ve tedavi olan kadınların, diğer memelerinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (Manjer et al., 2000, Campbell 2002)

➤ **Doğurganlık Hikayesi:** Hiç doğum yapmamış ya da evlenmemiş kadınlarda meme kanseri görülme olasılığı 1,4 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Darendeliler 1997). Kadınların ilk hamileliği ve ilk çocuğunu doğurma yaşı meme kanserine yakalanma açısından önemlidir. Hamileliğin ilk üç aylık döneminde kan östradiol düzeyindeki hızlı artış, ilk hamilelikte, takip eden hamileliklere nazaran çok daha belirgindir. Artmış östradiol düzeyi kişi için kısa zamanda çok sayıda ovuluar dönem geçirmeye eşdeğerdir (Telo 2006). İlk hamileliğin yıllar boyunca prolaktin düzeyinin düşük kalmasını sağladığı gösterilmiştir. Doğum yapmış kadınlarda prolaktin düzeyinin, doğum yapmamış kadınlara göre daha düşük olmasının, erken yaşta ilk doğumun koruyucu etkisini kısmen açıklayabilir (Telo 2006). Tam bir gebelik yaşamayan bir kadında gebelik yaşayan bir kadına göre 1,5-2,5 kat risk artışı söz konusudur. Artmış çocuk sayısı da riskin azalacağı gösterilmiştir (Yoo et al., 2002). İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri görülme oranı 20 yaşından önce doğuranlara göre iki kat daha fazla olduğu bildirilmiş olup en fazla risk taşıyan grubun ise 35 yaşından sonra çocuk sahibi olan kadınların olduğu ve bunların hiç çocuk sahibi olmayanlardan da daha fazla risk taşıdıkları bildirilmiştir. (Russo et al., 2000, Campbell 2002; Clavel-Chapelon and Gerber 2002, Cuzick 2003; Özdemir ve Çalışkan 2002)

➤ **Laktasyon:** Postmenopozal kadınlardan, gebelik geçirmiş ve emzirmiş olanlarda meme kanseri riski 4-7 kat azalmıştır. Emzirme süresinin artması ile risk negatif bir ilişki içerisindedir (Yoo et al., 2002). Bir çalışmada 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riskin %11, iki sene veya daha fazla emzirenlerde ise %25 oranında azaldığı gösterilmiştir (Telo 2006).

➤ **Erken menarş:** Kadınların adet görmeye erken yaşta başlamaları, bununla birlikte ilerleyen yaşlarda menopoza girilmesi fertil çağı uzatmaktadır. Bu sırada

kadının daha uzun süre östrojen hormonu etkisi altında kaldığı bunun da meme kanseri gelişme riskini yükselttiğine işaret edilmektedir (Manjer et al., 2000, Campbell 2002; Clavel-Chapelon and Gerber 2002, Özdemir ve Çalışkan 2002, Cuzick 2003, Kruk and Aboul-Enein 2003).

➤ **Geç menapoz:** Geç menapoz da meme kanseri görülme olasılığını arttırmaktadır. 55 yaşından sonra menapoz girenlerde 45 yaş öncesi girenlere oranla 2–4 kat artmış meme kanseri riski gösterilmiştir (Bernstein et al., 1994, Berkey et al., 1999). Aktif menstruasyon dönemi 40 yıl ve daha fazla süren kadınların meme kanser riski, aynı dönemi 30 yıl ya da daha az olan kadınlara göre iki kat daha fazladır (Yoo et al., 2002).

➤ **Östrojen Replasmanı:** Menopoz nedeniyle uzun süre (10 yıldan fazla) östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri görülme riskinin yükseldiği ifade edilmektedir (Manjer et al., 2000, Clavel- Chapelon and Gerber 2002, Cuzick 2003, Driedger and Eyles 2001).

➤ **Doğum Kontrol Hapı Kullanılması:** Oral kontraseptifler (OKS) ve postmenopozal hormon replasman tedavisi gibi ekzojen seks steroidlerinin meme kanseri riski ile ilişkisi olduğu rapor edilmiştir. Östrojen içeren OKS'lerin ovulasyonu suprese ederken, meme hücrelerini de stimüle ederek, kanser riskini arttırdığına dair düşünceler hala çelişkilidir (Clamp et al., 2003). 10 yıl boyunca OKS kullanan genç bir kadında hiç OKS kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riski %36 artmaktadır (Telo 2006). Her ne kadar bu hapları kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma açısından bir risk artışı olduğu ileri sürülse de, 10 yıl önce doğum kontrol hapı kullanmayı bırakmış olan kadınlarda bu riskin tamamen ortadan kalktığına da işaret edilmektedir (Driedger and Eyles 2001, Clavel-Chapelon and Gerber 2002, Cuzick 2003).

Bunlarla birlikte çevresel faktörlerin de meme kanserine yakalanma riskini yükselten faktörler arasında sayılmasının mümkün olduğuna dikkat çekilmektedir.

➤ **İyonizan Radyasyon:** Puberte ve 30 yaş arası radyasyon tedavisi alanlarda belirgin meme kanseri riski mevcuttur. Bu meme dokusunun en aktif ve radyasyonun karsinojenik etkilerine en duyarlı olduğu dönemdir. Radyoterapinin bu yaşta risk arzeden bir faktör olması hormon temelinde gerçekleşmesine bağlı olabilir (Clemons et al., 2000).

➤ **Beslenme:** Meme kanserinde uluslararası farklılıklar risk olarak dietsel sebepleri akla getirmiştir. Çeşitli araştırmacılar yağdan fakir, meyve, sebze, lif ve kompleks karbonhidratlardan zengin beslenmenin meme kanseri için daha düşük risk olduğunu tespit etmişlerdir. Liften zengin gıdaların bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engelleyerek meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir (Scmizu et al., 1990).

➤ **Vücut Ağırlığı:** Postmenapozal meme kanseri gelişim riski, kilolularda veya obezlerde, zayıflara göre %30-%50 daha fazla bulunmuştur. Menapoz sonrası adipoz dokunun asıl olumsuz yanı androjenlerin aromatisasyonu ile östrojen üretmeleridir. (Ziegler et al., 1996, McTiernan 2003, Clamp et al., 2003). Premenapozal dönemde tam ters olarak obezite ile daha düşük meme kanseri riski olduğu gösterilmiştir (McTiernan 2003). Obez premenapozal kadınlarda uzamış menstruasyon sikluları ve anovuluar siklulara eğilim, hedef meme hücrelerinde net östrojen etkisinin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir (Ziegler et al., 1996)

Alkol: Epidemiyolojik birçok çalışmada orta yada ağır dereceli alkol alımıyla meme kanseri gelişim riskinin arttığı ve doza bağlı olarak riskin yükseldiği saptanmıştır (McTiernan 2003). Alkol tüketimi ne olursa olsun hem premenapozal hem de postmenapozal meme kanseri için artmış riskin olduğu gözlenmiştir. Alkol alımı; folat, beta-karoten ve vitamin C gibi besinlerin alımını asgariye indirdiğinden zararları belirgin hale getirmektedir. Alkolün, karsinojen detoksifikasyonunu inhibe ederek, karsinojenlerin karaciğerdeki klirensini bozarak, DNA hasarına yol açarak veya inaktif metabolitleri aktif hale getirerek, kokarsinojen olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Singletary and Gapstur 2001).

➤ **Sosyoekonomik durum:** Sosyoekonomik açıdan düşük düzeyde bulunan kişi ya da toplumlarda meme kanseri görülme oranı daha azdır. Sosyoekonomik yönden gelişmiş toplumlarda meme kanserinin daha fazla görülme nedenleri arasında doğurmama, emzirmeme, aşırı yağ tüketimi, alkol tüketimi sayılabilir (Özmen ve ark., 2009)

2.1.2. Meme Kanserinin Histopatolojik Sınıflaması

I- Meme başının Paget hastalığı

II- Meme duktusları karsinomu

A-Noninfiltratif

B-İnfiltratif

1-Prodüktif fibrozis ile birlikte olan adenokarsinoma

2-Medüller karsinom

3-Komodo karsinom

4-Kolloid karsinom

5-Papiller karsinom

6-Tübüler karsinom

III- Lobüler karsinom

A- Noninfiltratif

B- İnfiltratif

IV- Memenin nadir karsinomları

V- Meme sarkomu (Haagensen 1986)

2.1.3. Meme Kanserinin Evrelemesi

TNM Sistemi (American Joint Committee'ye göre evreleme)

T : Tümör

N : Nodül

M : Uzak metastaz

T0: Tümör çok küçük palpe edilebilir değil

T1: 2 cm'den küçük tümör, hiçbir fiziksel belirti yok

T2: 2 cm'den büyük tümör, deride çekilme ve meme başında retraksiyon

T3: Tümörün boyutları 5 cm veya 5 cm'den büyük, cilt infiltrasyonu, deri ödemi mevcut

T4: Tümörün boyutları belirsiz, cilt, meme başı retraksiyonu, ciltte ülserasyon, pektoral kaslara veya göğüs duvarına infiltrasyon mevcut

N0: Koltuk altı gangliyon palpe edilmiyor

N1: Koltuk altı gangliyon 1 veya 2 palpe ediliyor, mobil

N2: Gangliyon 2'den fazla, kısmen mobil

N3: Koltuk altı gangliyon dolu, fiske

M0: Metastaz yok

M1: Metastaz bir yerde

M2: Metastaz birden fazla yerde

Evre TIS : İn situ karsinom

Evre I : T1 N0 M0

Evre II : T0 N1 M0

T1 N1 M0

T2 N0 M0

T2 N1 M0

Evre III a : T0 N2 M0

T1 N2 M0

T2 N2 M0

T3 N0 M0

T3 N1 M0

T3 N2 M0

Evre III b : Herhangi T N3 M0

Evre IV : Herhangi T herhangi N M1 (Rohan et al., 1993)

2.1.4. Meme Kanseri Tedavisi

Meme kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler temel olarak;

1) Cerrahi: Kanserli dokuyu ve çevresindeki invazyon riski taşıyan bir miktar sağlıklı dokuyu alıp çıkartma işlemidir. Bazı durumlarda kanserli dokuyu cerrahi müdahale ile çıkarmak imkânsız olabilir. Bu durumda radyoterapi veya kemoterapi uygulanır.

2) Radyoterapi (Işın tedavisi): Uygun dozda ışın uygulayarak kanser hücrelerinin öldürülmesi işlemidir.

3) Kemoterapi: Kanser hücrelerini öldürmek ya da tümör büyümesini durdurmak üzere farklı ilaç veya ilaç kombinasyonlarının kullanılmasıdır.

4) Hormon Tedavisi: Kanser hücrelerinin büyümek için gereksinim duyduğu hormonları engellemek amacı ile uygun hormonların hastaya verilmesi yöntemidir.

5) Adjuvan Tedavi: Bağışıklık sistemini güçlendirici, asıl tedaviye destek olan yöntemler (Arı 2010).

2.1.5. Meme Kanserinde Kemoterapi

Meme kanserinde sistemik tedavinin esasını kemoterapi oluşturur. Tek başına kullanılan sitotoksik ajanların çoğu ile vakaların % 20-35'inde kısmi yanıt (nadiren tam) alınır. Remisyon sıklıkla 4-6 ay sürer. Kemoterapide genellikle birden fazla ilacın kombinasyonu kullanılır. Çünkü çoklu ilaç kullanımının kemoterapide daha etkili olduğu belirlenmiştir (Sayek 2004). Metotreksat (M) 5-fluorourasil (F), siklofosamid (C), epirubisin (E), adriamisin (A) başlıca antikanser ilaçlar olup, CMF, FAC, FEC, AC gibi kombinasyonları tedavide kullanılmaktadır. İkinci kademedeki kemoterapi ilaçları ise vinorelbin ve taksanlardır (dozetaksel, paklitaksel). Yine mitomisin C ve prednizon son evre hastalarda kullanılan ajanlardandır (Vaclavikova et al., 2003, Sayek 2004, Mavroudis et al., 2009).

2.2. *Viscum album* L. Hakkında Genel Bilgiler

Tıbbi bitkilerden biri olan ökse otu (*Viscum album*) saçak köklerinin yardımıyla köknar, çam, ladin gibi iğne yapraklı; elma, erik, kayısı, kiraz gibi meyve;

kavak kestane, kızılağaç, mese, söğüt gibi kış aylarında yapraklarını döken ağaçların veya çalılıarın üzerinde yetisen yarı parazit bir bitkidir. Dallar üzerinde kümeler halinde yetişir ve her mevsim yeşildir (Baytop 1984).

Ağustos-kasım aylarında meyve verir, meyveleri yaklaşık 1 cm çapında, küre veya armut şeklinde, etli, beyazımsı, şeffaf ve tek tohumludur. Meyvelerinin yapışkan, kaygan ve beyaz renkli olması nedeniyle Latince’de *Viscum album* olarak adlandırılmıştır. Türkçe’de ‘Ökse otu’ olarak adlandırılması ise, kuşları yakalamak amacıyla *Viscum album*’un meyvelerinde bulunan ‘vissin’ adlı yapışkan maddenin çubuklar üzerine sürülerek ökse yapımında kullanılmasındandır (Baytop 1984, Ergun ve Deliorman 1995).

Bu meyvelerin etli ve yumuşak olması, kuşlar tarafından beğenilerek yenmesine sebep olur (Mandacı 1998). Meyveleri yiyen kuşların dışkılarıyla birlikte ağaç dallarına düşen tohumlar üzerindeki yapışkan madde sayesinde dallara yapışmakta ve ortamdaki ürik asit sayesinde çimlenip gelişmektedir (Becker 1986). Dal üzerinde kabuk içlerine doğru emeçlerini salarak ksilem iletim demetlerinden besin maddelerini alarak gelişir. Konakçıdan su ve minareleri alırken, fotosentez yaparak kendi karbonhidratlarını üretir (Ergun ve ark., 1994, Becker 1986).

Avrupa’ da yetişen ve “European mistletoe” olarak isimlendirilen *Viscum album* L., Türkiye’de ökseotu, burç, purç, çekem, gevele, gökçe otu, gökçe, gövelek, güvelek, çampir, gelimkara, pura, biriç ve fitri isimleriyle bilinmektedir. Tüm dünyada genel olarak “mistletoe” adı kullanılır. Almanya’da “mitsel” haricinde kullanılan diğer isimler; “gemeine nistel”, “weisse mistel”, “alfolter”, “künt”: İngiltere’de “mistletoe”, “mistle”, “masslinn”, “allheal”; Fransa’da “gui”, “gui commun”, “morve”; İspanya’da “visco commun”, “almuerdago”, “alfueyo”; İtalya’da “visco”, vischio”, “scaaggine” isimleri kullanılmaktadır (Önay 2002).

2.2.1. *Viscum album* L.’un Sistematığı

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae

Clasis : Dicotyledoneae

Subclasis : Rosidae
Ordo : Santalales
Form : Loranthaceae
Genus : *Viscum album* L. (Davis 1982).



Şekil 1: *Viscum album* L.'nin Genel Görünümü.

2.1.2. *Viscum album* L.'un Genel Özellikleri

Ökse otu Kuzey Avrupa'dan, Kuzeybatı Afrika'ya; Avrupa'dan Doğuya; Güneybatı ve Orta Asya'dan Japonya'ya kadar geniş bir alanda yaşamaktadır. Türkiye'de de çok geniş bir dağılım göstermekte ve bütün bölgelerde yetişmektedir (Ergun ve ark., 1994, Miller 1982).

Ülkemizde *Viscum* cinsi, bir tür ve bu türe ait 3 alt tür ile temsil edilmektedir.

1. *Viscum album* ssp. *album*: Çoğunlukla yaprak döken diotik ağaçlar üzerinde yaşar. Tohumlar genellikle üç köşeli, meyve çoğunlukla küresel, yaprak boyu, eninin dört katından daha kısa. Yaprakları 1-3.7 cm boyunda, oblong, tam kenarlı, paralel damarlı, derimsi, sarı-yeşil renktedir. Meyve genellikle küre şeklinde etli, beyaz renkli, tek tohumlu. Edirne, Tekirdağ, Ankara, Çorum, Eskişehir ve Isparta'da yetişir (Ergun ve ark., 1994, Davis 1982).

2. *Viscum album* ssp. *abietis*: Abies türleri üzerinde yaşar. Tohumlar oblong, bombeli kenarlı, meyve çoğunlukla armut şeklinde, yaprak boyu, eninin dört katından biraz uzun veya kısadır. Meyve sarı, yaprak boyu eninin dört katından daha uzundur. Yapraklar 2.2-4.9 cm boyunda, oblong tam kenarlı 4-5 paralel damarlı,

derimsi, sarımsı- yeşil renktedir. Meyve ve tohum *Viscum album L. ssp. austriacum*'a benzer şekildedir. Bolu'da yetişir (Ergun ve ark., 1994, Davis 1982).

3. *Viscum album ssp. austriacum*: Çoğunlukla *Pinus* türleri üzerinde yaşar. Tohumlar oblong, bombeli kenarlı, meyve çoğunlukla armut şeklinde, yaprak boyu, eninin dört katından biraz uzun veya kısadır. Meyve beyaz, yaprak boyu, eninin dört katından daha kısa olup yaprakları 0.7-3.8 cm boyunda, oblong, tam kenarlı, 4-5 paralel damarlı, derimsi, yeşil renktedir. Meyve armutsu, etli, sarımsı renkli, tohum tek, oblong, bombeli kenarlıdır. Ankara'da yetişir (Ergun ve ark., 1994, Davis 1982).

Yurdumuzda yaygın olan ve daha çok ılıman bölgelerde, ormanlık alanlarda çeşitli ağaçların ve çalılıkların üzerinde yarı parazit olarak gelişen, 300-2000 m yüksekliklerde rastlanılan bitki, Akdeniz Bölgesinde Isparta'da; Gelendost-Eğridir arası, Eğridir Yukarı Gökdere Köyü-Sarı belen, Eğridir-Isparta yolu, Eğridir Yaka Köyü Kapızderesi üstü kayalık yer civarında bol miktarda bulunmaktadır (Ergun ve ark., 1994, Davis 1982).

Ökse otu çok eski bir tarihe sahiptir. Eski çağlarda Kuzey Avrupa'da yaşayan Druidler ve diğer Pagan milletleri; özellikle ökse otunun meşe ağaçlarını enfekte etmesi ve bu olayın nadir görülmesi sebebiyle, bitkiye karşı büyük saygı duymuşlardır. Bitkinin tuhaf bir şekilde toprakta değil de ağaçların üzerinde yetişmesi bitkiyi ilginç hale getirmiştir. O tarihten günümüze ökse otuna duyulan bu saygı Hristiyan geleneği olan Noel'de kapı girişlerine ökse otu asma geleneğine dönüşmüştür (Walker 1983). İlk olarak M.Ö 305 yılında Yunanlı botanikçi Theophrastus tarafından parazitik bir bitki olarak tanımlanmıştır. Carl Unnaeus'da 18. yy. da temel bir Avrupa türü olarak tanımlamış ve *Viscum album* olarak isimlendirmiştir (Gill 1953), 20. yüzyılın başlarında Avustralyalı tıp doktoru Rudolf Steiner (1861-1925) ökseotunun tedavi amaçlı kullanılması amacıyla değişik öneriler getirmiş ve alternatif (antroposofikal) tıp ilaçları geliştirmiştir. Rudolf Steiner, hastalara enjekte edilebilecek ökseotu özütleri çıkararak kanser hastaları üzerinde alışılmamış tedavi yöntemleri kullanmıştır. Steiner böylece ökse otunun özellikle kanser tedavisi ve modern bilim dünyasında ki araştırmalarda kullanılmasını sağlamıştır (Urech 1993). Steiner'in bu çalışmaları Almanca konuşan ülkelerde alternatif tedavi yöntemi olarak yaygınca kullanılmaya başlamıştır (Habeck 2003).

Ökse otundan elde edilen farklı ekstraktlar vazodilatör, sedatif, diüretik gibi farmakolojik özellikleri nedeniyle halk arasında şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, sinir bozukluğu, damar tıkanıklığı, romatizma ağrıları, çıban ve eklem iltihabı gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop 1984, Yesilada ve ark., 1998).

Ökse otu bitkisinden hazırlanan özütler tedavi amacıyla kullanılmak üzere Almanya, Avusturya ve İsviçre'deki çeşitli firmalar tarafından tüm dünyaya pazalanmaktadır. Bu ticari ürünler pek çok araştırmaya konu olmuş ve sahip oldukları aktiviteleri bilim çevrelerince de desteklenmiştir (Tablo 1). Özütün hazırlanma şekli ve bitkinin üzerinde yasadığı konakçı ağacın türüne göre bu özütlerin kimyasal içerik açısından farklılık gösterdiği vurgulanmaktadır.

Tablo 1. Uluslararası patentli ticari ökse otu (*V. album*) özütleri ve sahip oldukları aktiviteler.

Özüt	Aktivitesi	Kaynaklar
Iscador ®	Antikanser	Maier G and Fiebig HH. 2002, Van Huyen JP et al. 2002, Jach R et al. 2003, Kuttan G and Kuttan R. 1993
	Doğal öldürücü hücreleri indükleyici	Kovacs E and Kuehn JJ. 2002, Stoss M et al. 1999
	Kemoterapi ve radyasyonun etkisini azaltıcı	Harmsma M et al. 2004
	İmmünmodülatör (immün sistemi düzenleyici)	Van Huyen JP et al. 2002, Maier G and Fiebig HH. 2002
	Sitotoksik	Kuttan G and Kuttan R. 1993
	İmmünoisitümölan	Stoss M et al. 1999, Kast A and Hauser SP. 1990
Helixor ®	Anti -HIV	Van Huyen JP et al. 2002, Mueller EA and Anderer FA. 1990
	Antinoeplastik	Doser C et al. 1989
	Antikanser	Bussing A et al. 1999
	Doğal öldürücü hücreleri indükleyici	Harmsma M et al. 2004, Stein GM and Berg PA. 1999
	Sitotoksik	Kunze E et al. 1997
	İmmünoisitümölan	Zarkovic N et al. 2001, Bussing A et al. 1998
Plenosol ®	İmmünmodülatör	Bussing A et al. 1998
	Antikanser	Hajto T et al. 2005
Iserol ®	İmmünmodülatör	Hajto T et al. 2005
	İmmünmodülatör	Bussing A et al. 1998
Vysorel ®	İmmünmodülatör	Bussing A et al. 1998
Eurixor ®	İmmünmodülatör	Bussing A et al. 1998

2.1.3. *Viscum album* L. Genusunun Bileşikleri

Lektinler, alkaloidler, viskotoksinler, polisakkaritler, flavonoidler, fenolik asitler, poliholozitler, fenilpropanlar ve lignanlar ökse otundaki aktif bileşenlerdir. Bitkinin sitotoksik etkisinin ortaya konulduğu çalışmalarda lektinler ve viskotoksinler ön plana çıkmaktadır (Ergun ve Deliorman 1995).

2.1.3.1. Lektinler

Ökse otu ekstraktında, 1000'den fazla protein içinde en iyi tanımlanan lektinlerdir. Bunlar farklı şekerlere bağlanabilme özellikleri ile lektin I, II ve III olmak üzere 3 gruba ayrılır. Lektin I, Dgalaktoza bağlanır; lektin II, D-galaktoz ve Nasetil galaktozaminin her ikisine; lektin III, Nasetil galaktozamine bağlanır. Bu 3 çeşit lektinin, tümör hücre kültürlerinde oldukça toksik olduğu bildirilmiştir (Ziska et al., 1991).

Ökse otu lektinleri, heterodimerik bitki toksinlerindedir. A ve B zincirleri olmak üzere 2 farklı glikoprotein zincirden oluşurlar. İki zincir birbirine disülfid bağlarıyla bağlanmıştır. B zinciri 34 kDa molekül ağırlığında bir proteindir, seker bağlayan reseptörleri ile hücre yüzeyindeki seker uçlarına bağlanarak tüm lektinin hücre içine girmesini sağlar. A zinciri 29 kDa ağırlığındadır, tüm aminoasit zinciri tanımlanmış ve tip 2 ribozom inaktive eden proteinler olarak bilinen bitki toksinlerinden abrin ve ricinle ilişkili olduğu bulunmuştur. Tüm lektinin hücre içine girmesinden sonra, A zinciri 28S rRNA da tek adenzin rezidüsünü depürinize ederek 60S ribozomal alt üniteyi katalitik olarak inaktive eder. A zinciri de ricin gibi, sitotoksik etkisini protein sentezini inhibe ederek gösterir (Hajto et al., 2005).

Kore ökse otu (*Viscum album* var *Coloratum*), *Viscum album*'un alt türlerinden biridir. 2000 yılında Park ve ark. yaptıkları çalışma ile Kore ökse otundan izole edilen lektin II'nin, polisakkaritin ve viskotoksinin çeşitli kanser hücrelerine etkilerini araştırmışlar ve apoptozisi başlatmada en etkili olanın lektin II olduğunu bulmuşlardır. Aynı grup önceki çalışmalarında da, Kore ökse otu lektin II'nin özellikle kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü başlattığını ve normal lenfositlere herhangi bir etkisinin olmadığını tespit etmiştir (Park et al., 2000).

Değişik hücre tiplerinin lektinlerle inkübasyonları sonucunda; hücre şişmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleer DNA'da kırıkların oluşması gibi apoptotik değişimlerle bağlantılı hücre ölümleri gözlenmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda ökse otu lektinlerin programlı hücre ölümünü başlatan sinyal iletim yolları ve mekanizmaları henüz açıklanamamıştır (Mockel et al., 1997).

2.1.3.2. Viskotoksinler

Viskotoksinler, *Viscum album*'un sitotoksik proteinlerinden biridir. Hücre öldürücü etkileri olan viskotoksinlerin tümör hücrelerindeki sitolitik etkileri disülfür gruplarıyla hücre membran fosfolipitlerinin etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Ergun ve Deliorman 1995). Viskotoksinler, üç disülfür köprüsü ile 46 amino asitten oluşan tek polipeptit zincirine sahip bileşiklerdir. Bugüne kadar altı adet viskotoksin tanımlanmış ve izole edilmiştir. Bunlar. Viskotoksin A1, Viskotoksin A2, Viskotoksin A3, Viskotoksin B, Viskotoksin 1-Ps ve Viskotoksin U-Ps'dir (Ergun ve Deliorman 1995).

Toksik proteinler olan viskotoksinler, α ve β -thionin'lerle ilişkilidir. Viskotoksinlerin, insan granülosit ve lenfosit hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı deneylerde, zarın geçirgenliğinin arttığı, sitoplazma ve kromatidin azaldığı, kristallerin kaybedilmesi ile mitokondrilerin şiştiği, reaktif oksijen radikallerinin arttığı ve bu olayların devamında ikincil apoptosis olaylarının başlaması ile hücre ölümü gözlenmiştir (Büssing et al., 1999).

2.3. ÖKSE OTU (*Viscum album*) Ekstraktının Apoptosis Mekanizması

Apoptosis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulan, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücrelerin çevreye zarar vermeden güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Thompson 1999).

Yüksek organizmalarda hücre ölümü nekrozis ve apoptosiz olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen, apoptosiz hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelir

(Thompson 1999). Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken (cell swelling), apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozisde hücrelerin kromatin paterni hemen hemen normal iken apoptotik hücrede DNA, internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti (bç) veya bunun katları boyutunda küçük DNA parçaları oluşturacak şekilde ayrılır bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü yapısının 'ladder pattern' ortaya çıkmasına neden olur ve kromatin nükleus membranının çevresinde toplanmış (chromatin aggregation) ve yoğunlaşmış (chromatin condensation) şekildedir. Nekroza giden hücrenin plazma membran bütünlüğü kaybolurken apoptotik hücrelerin membranı sağlamdır; apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler, plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere (apoptotic bodies) parçalanır. Nekrozisde hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden inflamasyon reaksiyonu uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Huppertz et al., 1999, Willingham 1999, Barisic et al., 2003, Brouckaert et al., 2004).

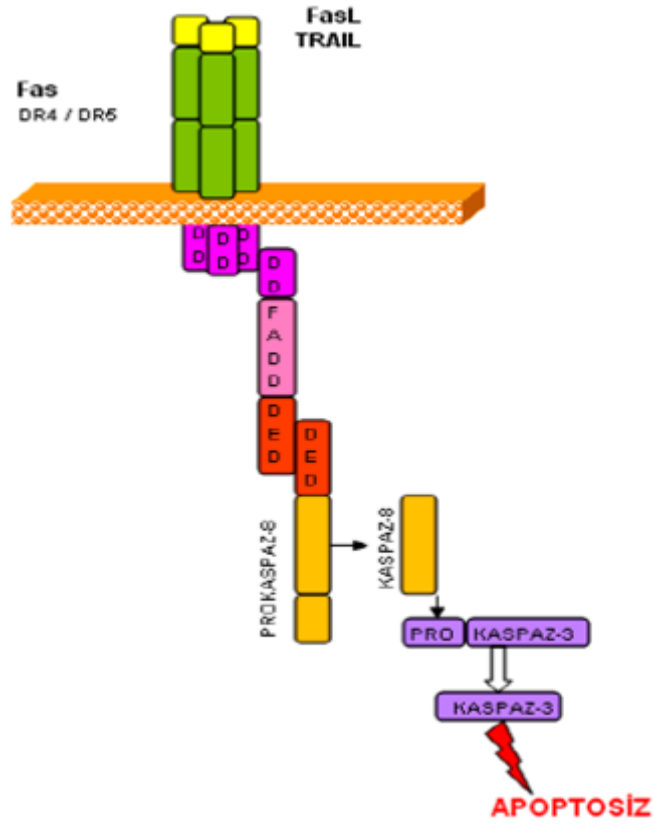
Apoptozisin moleküler mekanizması ile ilgili çalışmalar sonucu, kaspaz (caspase-cysteine containing aspartate specific proteases) ailesinin doğrudan ya da dolaylı yollardan apoptozisin hem biyokimyasal hem de morfolojik değişikliklerinden sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (Chang and Yang 2000). Memelilerde en az 12 adet oldukları belirlenen kaspazlar, başlatıcı (-8, -9, -10) ve sonlandırıcı (efektör) (-3, -6, -7) kaspazlar olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (Fadeel et al., 2000). Efektör kaspazlar, DNA tamir enzimi olan PARP, retinoblastoma ve MDM-2 gibi hücre siklusu düzenleyicileri, lamin, Gas2, gelsolin ve fodrin gibi hücre iskeleti ve nükleusun yapısal proteinleri, PKC- δ gibi yasamsal proteinleri ayrıştırarak inaktive eder ve hücre ölümüne neden olurlar (Enari et al., 1998). Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal, hücre içinden (DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, PH'da düşme, metabolik veya hücre siklus bozuklukları) veya hücre dışından (hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve UV

ısnlar) gelebilir. Hücre dışından gelen sinyaller ölüm reseptörleri ve adaptör proteinlerle, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile iletilirler. İletilen sinyaller başlatıcı kaspazları aktive eder, aktive olan başlatıcı kaspazlar ise zincirleme olarak diğer kaspazları aktive eder (Fadeel et al., 2000).

Zara bağlı reseptörlerden ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R) olarak adlandırılır ve proapoptotik sinyalleri hücre dışından hücre içine taşır. Tanımlanan 20'den fazla TNFR vardır ve bunlar ölüm domaininin bulunup bulunmamasına göre 2 gruba ayrılır (Locksley et al., 2001). Ölüm domaini bulunan reseptörler, sinyal iletimini kaspaz aktivasyonuna ve apoptozise neden olarak gerçekleştirirler. Örneğin; TNFR1 (p55, p60, CD120a) ve Fas (Apo-1, CD 95) ölüm domaini içeren TNFR ilişkili reseptörlerdir, akış aşağı proteinler olan TNF reseptör ilişkili ölüm domaini (TRADD) ve Fas ilişkili ölüm domain (FADD) proteinini aktive ederler. FADD, kaspaz -3 ve -8'i aktive ederek kaspaz aktivasyonunu sağlar, bu durum hedef proteinlerin yıkılmasına ve hücre içeriğinin bozulmasına neden olur (Chinnaiyan et al., 1995).

Hücre dışından gelen sinyallerin oluşturduğu apoptoziste ölüm reseptörleri görevlidir. Fas-fas ligand aracılı apoptozis, Fas (CD95, APO-1) hücre yüzey reseptörü aracılığı ile oluşur. Fas ligandın fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içine bakan kısmında bulunan ölüm domaini, Fas adaptör proteini (FADD) ölüm domaini ile birleşir ve ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Kompleks başlatıcı kaspaz olan prokaspaz-8'i aktifleştirir. Aktif hale gelen kaspaz-8, sonlandırıcı kaspaz olan prokaspaz-3'ü aktifleştirerek hücreyi apoptozise götürür (Şekil 2) (Wajant 2002).

TNF aracılı apoptoziste, bir sitokin olan TNF'nin TNF1 reseptörleri ile birleşmesi sonucunda, reseptörün ölüm domaini, TNFR adaptör proteinin (TRADD) ölüm domainine bağlanır. TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz-8/FLICE'i aktifleştirir ve apoptozise neden olur (Mountz and Zhou 2001).

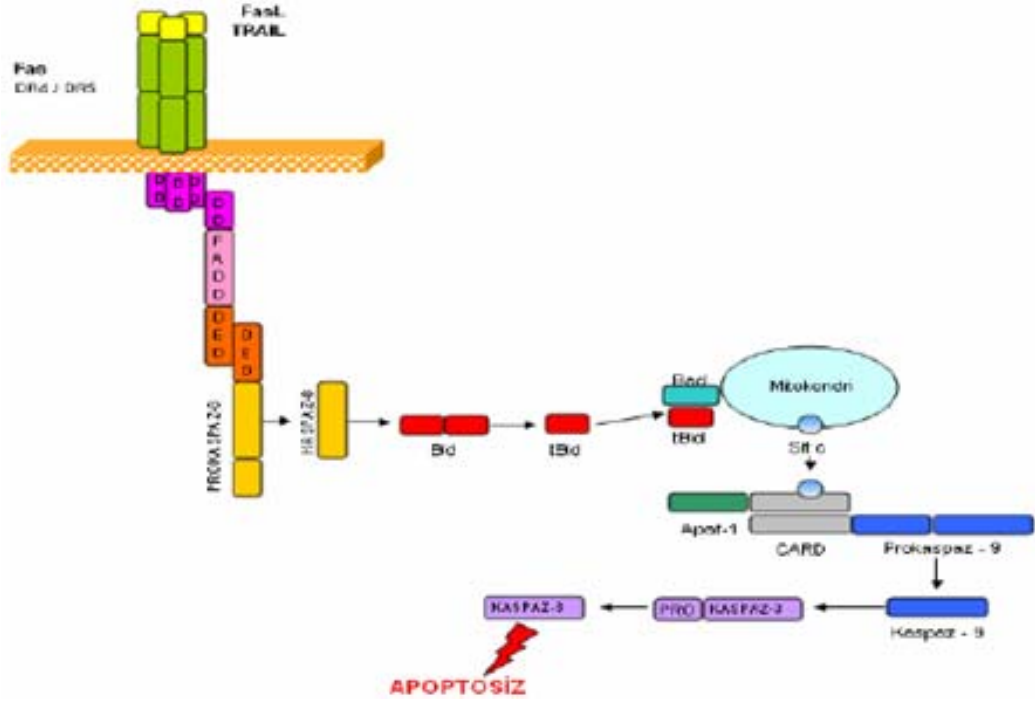


Şekil 2. Fas- fas ligand aracılı apoptozis

İç sinyallerle oluşan apoptoziste mitokondri önemli rol oynar. Kemoteropatik ajanların neden olduğu DNA hasarları, radyasyon ve büyüme faktörü eksikliği gibi apoptotik sinyaller mitokondrinin dış zarında geçirgenlik artışına neden olur. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin 2 zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c'nin salınımı Bcl-2 grubu proteinler tarafından düzenlenir. Grubun antiapoptotik üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-xL sitokrom c salınımını önlerken, proapoptotik üyeler olan Bax, Bad ve Bid salınımını artırır. Sitokrom c sitoplazmada, apaf- 1, kaspaz-9 ve ATP ile birleşir. Bu yapıya apoptozom adı verilir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozise neden olur (White and McCubrey 2001, Korsmeyer 1999).

Sitokrom c'nin sitozole salınımında CD95 (Fas) reseptörlerine ligand bağlanması ya da hücrelerin kemoteropatik ilaçlar ve UV ile muamele edilmesi gibi değişik apoptotik durumlar etkilidir. CD95 aracılı apoptozisde, reseptörden gelen sinyalle uyarılan kaspaz-8, Bcl-2 protein ailesine bağlı bir proapoptotik faktör olan Bid'i proteolitik olarak ayrıştırır. Aktif hale geçen Bid (tBid) mitokondriye taşınır,

zar üzerinde bulunan bir başka proapoptotik protein olan Bad'ı aktifleştirir, sitokrom c'nin salınımını sağlar ve apoptozomun oluşumuna neden olur. Apoptozom, sonlandırıcı kaspaz-3'ü aktifleştirerek hücreyi apoptozise götürür (Şekil 3) (Esposti 2002, Rossi and Gaidano 2003).



Şekil 3. Fas reseptörleri ile sitokrom-c salınımı

Ökse otu lektinlerinin tümör hücreleri üzerindeki yıkıcı etkilerinin, JNK'nın aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir (Park et al., 2000). Ökse otu lektin II'nin, zaman ve doza bağlı olarak, DNA'da kırıklar meydana getirerek agaroz jelde merdiven görüntüsü almasına ve U937 hücrelerinde kaspaz -3, -8 ve -9'un aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca ökse otu lektin II ile muamele edilen U937 hücrelerinde, kaspazların katalitik aktivasyonu ile bağlantılı olarak, PARP ve PKC- δ 'ın her ikisinin de ayrıştığı bildirilmiştir (Kim et al., 2000). Kemoteropatik ilaçlar, Fas/CD95 sinyal yolunu uyararak veya reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşmasını indükleyerek apoptozise neden olur (Simizu et al., 1998). İlginçtir ki; lektin II'nin hem kaspaz-8/FLICE hem de kaspaz-9'u aktive ettiği bulunmuştur. Kaspaz-8-proteazın aktivasyonu, CD95 gibi ölüm reseptörlerinin lektin II'nin neden olduğu apoptoziste yer alabileceğini düşündürmüştür. Fakat ökse otu lektin II'nin neden olduğu apoptoziste Fas ve Fas ligandın (FasL) ekspresyonunda bir

değişiklik gözlenmemiştir. Böyle bir durumda da Fas'ın lektin II'nin kendisi tarafından oligomerize edilebileceği ihtimalinin hariç tutulmuş olabileceği üzerinde durulmuştur. Kaspaz-9 proteaz ise apoptozisin sitokrom c yolunun uç kaspazıdır. Bu yol mitokondriyal hasarı kaspaz aktivasyonuna bağlar. Lektin II'nin apoptozise neden olan ROS'un oluşumunu indükleyerek kaspaz-9'u aktive ettiği düşünülmektedir. Kim et al. (2001)'nin bu konuda yaptığı çalışmada; lektin II ile muamele edilen U937 hücrelerinde önemli ölçüde hücre içi hidrojen peroksit (H₂O₂) meydana geldiği görülmüştür. Artan H₂O₂'in hücre içinde oksidatif stresi arttırdığı ve ROS'un temizlenmesi ile lektin II'nin neden olduğu apoptozisin inhibe edildiği gözlenmiştir. Ayrıca lektin II'nin neden olduğu apoptozisin, redükte glutatyon (GSH), asetilsistein (NAC), ebselen, mn (III) tetrakis (4-benzoic asid), porforin klorid (mnTBP), katalaz ve pirolidin ditokarbamet (PDTC) gibi antioksidanlar tarafından da inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu antioksidanlar aynı zamanda lektin II ile muamele edilmiş insan leukemia (HL-60), Jurkat ve Molt gibi T hücrelerinde de apoptozisi önlemişlerdir. Buradaki bulgular, ROS'un ökse otu lektin II'nin neden olduğu apoptoziste kritik bir role sahip olabileceği yönündedir. Ökse otu lektin II'nin ROS oluşumuna neden olduğu mekanizma henüz tam olarak açıklanamamasına rağmen, Kore ökse otu lektin II tarafından oluşturulan hücre içi H₂O₂'in, JNK/SAPK aktivasyonunu, sitokrom c çıkışını ve kaspaz aktivasyonunu içeren hücre içi sinyal yolunu uyardığı bilinmektedir (Kim et al., 2003)

Bantel et al. (1999)'nin yaptığı benzer bir çalışmada, ökse otu lektin I (ML I) ile muamele edilen hücrelerde kaspaz -3, -8 ve -9 aktive olmuş ve devamında apoptotik hücre ölümü gerçekleşmiştir. Kaspaz -8'in aktive olması CD95 yolunun ML I'in neden olduğu apoptoziste yer alabileceğini düşündürmüştür. CD95'in uyarılması için de ligandının veya direkt lektinin reseptörle çapraz bağlanması gerekmektedir. ML I'in neden olduğu apoptoziste CD95'in varlığını ispatlamak için, CD95'e direnç için seçilmiş Jurkat T hücre klonları kullanılmıştır. Bu hücrelerde meydana gelen apoptozisin yabancı tipte hücrelerle benzer olması, ML I'in neden olduğu sitotoksitede CD95'in yer almadığını göstermiştir. Çalışmanın devamında, ML I ile muameleden sonra mitokondri kontrol yolunun başlatılıp başlatılmadığı araştırılmış ve kaspaz -9'un proteolitik aktivasyonu ile ilişkili olarak ML I'in sitokrom c'nin salınımına neden olduğu bulunmuştur. Normalde CD95 ile uyarılan

kaspaz 8'in aktivasyonundan sonra Bid sitokrom c salınımına neden olurken, hücrenin ML I'le muamelesinden sonra Bid'in parçalandığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu bulgular, ML I'in kaspaz -3, -8 ve -9'u aktive ettiğini ve apoptozisi ölüm reseptörlerinden bağımsız olarak mitokondri kontrol yoluyla uyardığını göstermektedir (Bantel et al., 1999).

Ökse otu lektinin apoptozisi indüklemesi kanser tedavisinde ilginç bir teröpatik strateji sağlar. Park et al. yaptıkları çalışmalarda ökse otu lektin II ile muamele edilmiş transforme kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla apoptotik hücre ölümü için daha hassas oldukları bulunmuştur (Park et al., 2000). Flow sitometrik analizler sonucunda, lektin II'nin normal nötrofil ve lenfositlerin apoptozisini indüklemediği belirlenmiştir. Lektin II yalnızca U937 hücrelerinde değil aynı zamanda hastalardan alınan akut leukemik hücrelerde, HL-60, Jurkat, RAW 264.7 ve insan kolon kanseri DLD1 hücrelerinde de apoptozisi indüklemiştir. (Mockel et al., 1997) Siegle et al. pürifiye edilmiş lektin II'nin insan akciğer hücresi A549'da doksorubisin, sisplatin ve taksol gibi standart kanser ilaçları ile kombine edilerek sitotoksitesinin artırılması yönünde kullanılabileceğini belirterek ökse otu terapisi için yeni klinik bir bakış açısı önermektedir (Siegle et al., 2001). Ökse otu lektinlerinin apoptotik sürecin aktivasyonunu sağlayacak antikanser özelliklerinin olduğunu belirten önemli kanıtlar bulunmasına rağmen, apoptotik mekanizmanın işleyişi hakkında henüz çok az bilgi elde edilebilmiştir (Kim et al., 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Ekstraktların Hazırlanması

Ticari ökse otu ekstraktları olan Helixor® A (50mg/ml), Helixor® P (50mg/ml) ve Helixor® M (50mg/ml), Helixor Heilmittel (Germany) firmasından alındı.

Endemik ökse otları ise Isparta-Çünür mahallesinden badem (*Amygdalis orientalis*) dalları üzerinden (*Viscum album* ssp. *album*)(Ökse-B), Isparta-Keçiborlu ilçesinden Çam (*Pinus nigra*) dalları üzerinden (*Viscum album* ssp. *austriacum*) (Ökse-Ç) ve Antalya-Akseki toros dağlarından Köknar (*Abies concolor*) dalları üzerinden (*Viscum album* ssp. *abietis*) 2007 yılı Ocak ve Şubat aylarında toplandı. Bitkiler Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tür tayini yapıldıktan sonra herbaryuma kaydedildi.

Ökse otları kurutulduktan sonra toz edilmiş yaprak ve sap kısımları (30 g) 120 ml % 96'lık etanolle (Merck, Darmstadt, Germany) Soxhlet aleti kullanılarak 24 saat süreyle ekstrakte edildi. Ekstrakt 0.22µm enjektör filtre (Millipore, Millex GP Ireland) ile süzülde, sıvı ekstrakt daha sonra soğutuldu ve rotary evaporator kullanılarak 30-45°C'de yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan ekstrakt Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde (BİBAM) liyofilizatörde liyofilize hale getirildi ve -20°C'de saklandı (Khan et al., 1988, Çelikler ve ark., 2008).

Endemik ökse otu ekstraktları hassas terazide 150 mg tartıldı, hücre hattına uygun 3 ml besiyeri içinde çözüldü (Ökse-K, 1.5ml etil alkol (Merck, Darmstadt, Germany) içinde 3 dak. vortexle çözüldükten sonra 1.5 ml besiyeri ilave edildi), 0.22µm filtre (Millipore, Millex GP Ireland) ile süzülerek steril hale getirildi.

Her bir ekstrakt TİK (Test edilen ilaç konsantrasyonu) olarak belirlenen altı farklı (1,675 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,05mg/ml, 0,0016 mg/ml ve 0,0005 mg/ml) konsantrasyonda hazırlandı. TİK farmakokinetik ve klinik değerlendirme bilgileri ile belirlenmiş ve kabul edilmiş ilaç konsantrasyon birimidir. TİK test edilen ilaçların standart bir dozuna bağılı olarak *in vivo* erişilebilir plazma konsantrasyonları ile ilişkilidir ve doz bağımlı etkilerinin tanımlanmasını sağlar. İlaçlar için önce 800

% TİK dozu hesaplanır ve sitotoksosite testlerinde 200% TİK, 100% TİK, 50% TİK, 25% TİK, 12.5% TİK ve 6.12% TİK' konsantrasyonları kullanılır. 200% TİK suprafarmakolojik dozdur, 100% TİK yaklaşık plazma konsantrasyonudur ve 25- 0 % TİK düşük dozlardır. Bitki ekstraktları için 800 % TİK ise DMSO veya alkol ile hazırlanmışsa % 0.1, sulu ekstrakt ise % 10 oranında hazırlanır.

3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanser hücre soyları kriyovial (Cryogenic vial, Corning, ABD) kaplar içerisinde -196 °C'de sıvı nitrojen tankında saklandı. Kullanılan hücre hatlarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir.

- MDA-MB-231 Hücre soyu:**
- ▶ İnsan meme kanseri hücre hattı
 - ▶ Östrojen reseptörü (-)
 - ▶ E-kaderin (-)
 - ▶ Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
 - ▶ Yüksek oranda yayılabilir

- MCF-7 Hücre soyu:**
- ▶ İnsan meme kanseri hücre soyu
 - ▶ Östrojen reseptörü (+)
 - ▶ E-kaderin (+)
 - ▶ Kaspaz 2: (+/-), Kaspaz 3: (-)
 - ▶ Daha az oranda yayılabilen

Hücreler çoğaltılmak amacıyla sıvı nitrojen tankından alınarak 56 °C'deki sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 5 ml besiyeri içeren falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tup 92159, Biolab, Macaristan) yavaşça aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj (Hettich Rotina 35R, Almanya) edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonları 25 cm²'lik kültür kabına (25

cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde (Sanyo, Japonya) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenecek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Kültür kabı her gün mikroskop (İnverted microscope, CKX41, Olympus, Almanya) altında kontrol edildi ve hücrelerin kültür kap yüzeylerini tamamen kaplamış (konfluent) olduklarında tripsinizasyon işlemi ile daha büyük hacimli 75 cm² kültür kaplarına (75 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. Tripsinizasyon işlemi için konfluent hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin serumdan arındırılmak için Tuzlu Fosfat Tamponu (PBS, Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) ile yıkandı. PBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücelere 0.5 ml tripsin solüsyonu eklenerek 37⁰C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Mikroskop altında hücre kabından ayrıldığı kontrol edilen hücelere 5 ml besiyeri ortamı eklenerek hücre süspansiyonu falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene cnical bottom Screw cap tup 92159, Biolab, Macaristan) aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Elde edilen Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 9 ml besiyeri eklendi. 10 ml'lik hücre süspansiyonları 75 cm²'lik kültür kabına aktarıldı. 37⁰C'de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşımcaya kadar çoğaltılmaları sağlandı.

3.3. Kullanılan Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması

MDA-MB-231 Hücre soyu için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Newborn calf serum (Hyclone USA), %1 L-glutamin (292.3 mg/ml) (EuroClone Europe), %1 Penisilin-G (100 U/ml)-Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA) içeren RPMI 1640 (Hyclone, USA) solüsyonu kullanıldı.

MCF-7 insan meme kanseri hücre soyu için %10 Fetal bovin serum (Biochrom AG, Berlin, Almanya), %1 Penisilin-G (100 U/ml) Streptomisin (100µg/ml), (Hyclone, USA) içeren RPMI 1640 (Hyclone, USA) solüsyonu kullanıldı.

3.4. Hücrelerin Sayılması

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe alındı. Üzerine eşit miktarda Tripan Blue (Trypan Blue Solution % 0.5, Biological Industries, Israil) boyası konarak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 12 µl alıp Toma lamına konarak lamın ortasında bulunan 16 bölme sayıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml medyumda ne kadar hücre olduğu bulundu.

3.5. Metiltiazoltetrazolium (MTT) Canlılık Metodu

MTT metodu ile bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Yaşayan hücrelerde mitokondride bulunan ‘‘süksinat dehidrogenaz’’ enziminin aktivitesi gözlenirken, ölen hücrelerde gözlenmemektedir. Total dehidrogenaz aktivitesi ile canlı hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu Mosmann (1983) tarafından gösterilmiştir. Böylece, ortama konulan ekstraktlara yanıt olarak eğer hücreler ölürse, enzim aktivitelerinin azaldığı veya kaybolduğu gözlenmektedir. Bunun için, hücreler bu enzimlerin değişime uğrattığı 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolimbromid (MTT) maddesine maruz bırakılmaktadır. Canlı hücrelerde mitokondride bulunan bu enzimin aktivitesi ile MTT boyasının tetrazolium halkası parçalanmakta, bunun sonucunda soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe (kristallerine) dönüşmektedir. Ardından bu kristaller SDS (eritici tampon) kullanılarak suda çözünür hale getirmekte ve oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile ölçülmektedir. Başlangıçta aynı sayıda ekilmiş ve hiç ekstrakt uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile oranlanarak ekstrakt uygulanmış hücrelerdeki ölüm oranı (yüzdesi) hesaplanmaktadır.

MTT testi için, 96 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Test plates, 96 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) 133 µl besiyeri içinde 200 TİK, 100 TİK, 50 TİK, 25 TİK, 12,5 TİK ve 6 TİK konsantrasyonlarında hazırlanan ekstrakt konsantrasyonları hazırlandı, üzerine MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 200µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Ekstrakt uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saat

inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün negatif kontrolü (minimum canlılık, MI) olarak kullanıldı. Pozitif kontrol (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Ökse-K % 50 oranında alkolle çözülerek hazırlandığı için % 2,5 ve % 1,5 alkol uygulanarak kontrol hazırlandı

MTT kimyasalı 5 mg/ml PBS tamponu içerisinde pH 7.2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. 24, 48 ve 72 saat sonra MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine her bir kuyucuğa 25 µl MTT çözeltisi eklendikten sonra hücreler 37°C'de 4 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

Oluşan formazon bileşiklerini çözünür hale getirebilmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 100µl olacak şekilde eklenerek 18 saat, 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (FLASHScan S12, Analytik Jena AG, Almanya) 570nm dalga boyunda ölçüldü. Okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin % canlılık oranları hesaplandı.

% Canlılık hesabı:

MTT testi sonunda yaşayan hücrelerde koyu mavi farmazon kristalleri gözlemlendi, buna karşılık ölen hücrelerde bu kristaller gözlenmedi. Ekstrakt uygulanan hücrelerin canlılıkları (Örnek C) ekstrakt uygulanmamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplandı (Ökse-K için alkol uygulanan kontrol hücreleri referans alındı) ve bu değer %100 canlılık (Maksimum canlılık, MaxC) olarak belirlendi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanan hücreler, minimum canlılık seviyesinin (Minimum canlılık, MinC) hesaplanmasında referans olarak alındı. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde inkübasyon süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{ÖrnekC} - \text{MinC}) / (\text{MaxC} - \text{MinC})].$$

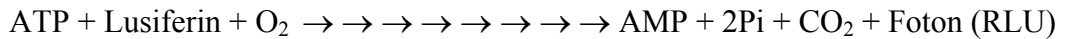
3.6. ATP Canlılık Testi

ATP testi hücre içerisindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanan yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir (Andreotti et al., 1995). İntraselüller

ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir.

MTT testi için, 96 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Test plates, 96 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) 133 µl besiyeri içinde 200 TİK, 100 TİK, 50 TİK, 25 TİK, 12,5 TİK ve 6 TİK konsantrasyonlarında hazırlanan ekstrakt konsantrasyonları hazırlandı, üzerine MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 200µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Ekstrakt uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün negatif kontrolü (minimum canlılık, MI) olarak kullanıldı. Pozitif kontrol (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonların sonunda intraselüler ATP içeriği ATP-TCA kiti (DCS Innovative Diagnostica-Systeme, Hamburg, Almanya) kullanılarak belirlendi. ATP-kitinin içinde yer alan hücre lizis tamponu kullanılarak (50µl/kuyucuk) hücre içerisindeki ATP elde edildi. Oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyonu takiben kuyucukların içerisinden 50'şer µl alınıp luminometrik ölçüme uygun beyaz plaklara (Microfluor 2 white, flat bottom 96 well microtiter plates, Thermolab Systems, İngiltere) aktarıldı. Üzerlerine 50µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Sonuçta, elde edilen ATP miktarı aşağıda formüle edildiği şekilde lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verildi. Böylece ilaç uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin RLU değerlerine göre ekstraktların sitotoksik etkileri hakkında bilgi edinildi.

Lusiferaz



3.7. Tripan Blue Boyama Yöntemi

Tripa boyama için 6 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Test plates, 6 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) 200 TİK ekstrakt konsantrasyonları hazırlandı, üzerine MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 2 ml besiyeri

içerisinde 500×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 72 saat sonra tripan boyama prosedürü uygulandı.

▶ Altı kuyucuklu plaklara ekili hücrelerin üzerlerindeki süpernatantlar falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tube 92159, Biolab, Macaristan) toplandı.

▶ Hücrelerin üzerine 1 ml PBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) ilave edilip kalan hücrelerde toplanarak aynı falkon tüplere konuldu.

▶ Hücre kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 200 µl tripsin ilave edildi. 4 dakika 37°C derecede bekletildi.

▶ 2 ml besiyeri ilave edilip aynı falkon tüplere toplandı.

▶ 4 dakika santrifüj edilip süpernatantı atıldı.

▶ Üzerlerine hücre hattına uygun besiyeri ilave edildi,

▶ Elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe alındı. Üzerine eşit miktarda Tripan Blue (Trypan Blue Solution % 0.5, Biological Industries, İsrail) boyası konarak iyice karışması sağlandı.

▶ Bu karışımdan 12 µl alıp Toma lamına konarak boyanmış (ölü) ve boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak % ölüm oranları hesaplandı.

$$\% \text{ Ölüm Oranı} = \frac{\text{Ölü hücre sayısı/ml}}{\text{Toplam hücre sayısı/ml}} \times 100$$

Toplam hücre sayısı/ml

3.8. Hematoksilen Boyama Yöntemi

Hematoksilen boyama için 6 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Test plates, 6 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) 200 TİK ekstrakt konsantrasyonları hazırlandı, üzerine MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 2 ml besiyeri içerisinde 500×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 72 saat sonra hematoksilen boyama prosedürü uygulandı.

▶ Altı kuyucuklu düz plaklara ekili hücrelerin üzerlerindeki süpernatantlar falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tube 92159, Biolab, Macaristan) toplandı.

▶ Hücrelerin üzerine 1 ml PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) ilave edilip kalan hücrelerde toplanarak aynı falkon tüplere konuldu.

▶ Hücre kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 200 µl tripsin ilave edildi. 4 dakika 37°C derecede bekletildi.

▶ 2 ml besiyeri ilave edilip aynı falkon tüplere toplandı.

▶ 4 dakika santrifüj edilip süpernatantı atıldı.

▶ pellet üzerine 1 ml PBS ilave edilip tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlandı.

▶ Sitosantrifüj lam'ları (poli L lizimli!) etiketlendi, hücrelerin toplanacağı bölge işaretlendi, sitosantrifüj içine yerleştirildi, ardından 1 ml'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklendi.

▶ 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edildi.

▶ Lam'lar çıkartılır ve oda ısısında bir gece kurumaya bırakıldı.

▶ Lam'lar şaleye dizilir, önceden buzdolabında soğutulan % 100 metanol ilave edilerek 15 dak. buzdolabında bekletilir

▶ Lam'lar PBS ile 3x5 dak. yıkanır.

▶ Lam'ların üzerini tamamen kaplayacak şekilde hematoksilen damlatıldı ve 5 sn. bekletildikten sonra önce musluk suyundan sonra distile sudan geçirildi.

▶ Gliserol damlatıp lamelle kapatıldı. Lamelin çevresine kapatıcı sürülerek hava alması engellendi. Mikroskop altında incelendi.

3.9. İkili Boyama (Double Staining) Yöntemi

İkili boyama için 6 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Test plates, 6 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) 200 TİK ekstrakt konsantrasyonları hazırlandı, üzerine MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri sayılarak 2 ml besiyeri içerisinde

500x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde (3 tekrarlı) 6 kuyucuklu plaklara ekildi. 72 saat sonra ikili boyama prosedürü uygulandı.

Stok çözeltileri: Stok çözeltiler PBS içinde hazırlandı.

RNAse (Ribonuclease A, R-500, Sigma) 100 mg / ml

PI (Propidium Iodide, P-4170, Sigma) 100 µg / ml

Hoechst dye (33342, Appllichem Biochemica) 200 µg / ml

Çalışma çözeltisi: 10 ml PBS içine;

100 µl PI stok

100 µl RNAse stok

500 µl Hoechst (33342) stoktan ilave edilerek hazırlandı.

▶ Altı kuyucuklu düz plaklara ekili hücrelerin üzerlerindeki süpernatantlar falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tube 92159, Biolab, Macaristan) toplandı.

▶ Hücrelerin üzerine 1 ml PBS (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) ilave edilip kalan hücrelerde toplanarak aynı falkon tüplere konuldu.

▶ Hücre kültür kaplarındaki hücrelerin üzerine 200 µl tripsin ilave edildi. 4 dakika 37°C derecede bekletildi.

▶ 2 ml besiyeri ilave edilip aynı falkon tüplere toplandı.

▶ 4 dakika santrifüj edilip süpernatantı atıldı.

▶ Üzerlerine 100 µl double staining çalışma çözeltisi ilave edilip, karıştırıldı.

▶ Falkon tüpler alüminyum folyo ile kaplandı, karanlıkta 15-20 dakika 37 derecede inkübe edildi.

▶ Temiz bir lam üzerine bu solüsyondan 17 mikrolitre konularak lamelle kapatıldı

▶ Lamelin çevresine kapatıcı sürülerek hava alması engellendi. İnvirt mikroskop (Inverted microscope, CKX41, Olympus, Almanya) altında incelendi.

3.10. Western Blot Yöntemi

Western blot, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir

3.10.1. Hücre Lizisi

Hücre lizisi için 25 cm²'lik kültür kabında (25 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) konfluent olan hücreler 200 TİK ekstrakt konsantrasyonları ile muamele edildi. 24 ve 48 saat sonra kültür kaplarında ekili hücrelerin üzerindeki süpernatantlar buz üzerindeki falkon tüplere toplandı. Kültür kaplarına 10 ml soğuk PBS (+4⁰C) konuldu ve scraperla (Grainer Bio-one, Almanya) hücreler kültür kaplarından kazınarak falkon tüplere toplandı. 1000g'de 5 dak. +4⁰C'de santrifüj edildikten sonra süpernatantı atıldı. Hücreler daha sonra 300 µl lizis solüsyonu konularak ependorf tüplere aktarıldı ve 15 saniye sonikasyona konularak homogenizasyon sağlandı. Isı banyosunda 65 ⁰C'de 15 dak bekletildi ve -20'ye kaldırıldı.

Lizis solüsyonu:

<u>Madde</u>	<u>Stok</u>	<u>Final</u>
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	2.038 ml	62.5 mM
Üre	18.2 g	6 M
Gliserol (%100)	5 ml	%10
SDS (%10)	10 ml	%2
Bromophenol blue (%1)	62.5 ul	%0.00125
B-mercaptoethanol	2.5 ml	%5

3.10.2. Örnek yüklemesi

Örnekler sample bufferla birlikte hazırlandığı için doğrudan aşağıda belirtilen miktarlarda jele yüklenir. Örnekler 300 µL lizis solüsyonu içinde bulunur.

Aşağıda belirtilen hacimlerde yükleme yapılır:

<u>Örnek no</u>	<u>Yüklenen (µl)</u>	<u>Örnek</u>
1	5	Marker
2	20	MCF-7 Konrol
3	20	MCF-7 Ökse-K 24 saat
4	20	MCF-7 Ökse-K 48 saat
5	20	MCF-7 Helixor-P 24 saat
6	20	MCF-7 Helixor-P 48 saat
7	20	MDA-MB-231 Konrol
8	20	MDA-MB-231 Ökse-K 24 saat
9	20	MDA-MB-231 Ökse-K 48 saat
10	20	MDA-MB-231 Helixor-P 24 saat
11	20	MDA-MB-231 Helixor-P 48 saat
12	5	Marker

3.10.3. Elektroforez

Jel: Invitrogen NuPAGE Novex Mini Gel, Bis-Tris %4-12 gradient (NP0322BOX), 12 kuyucuklu jel kullanılır.

Marker: Amersham High Range Rainbow MW Markers (RPN756E) (örnek no 1 & 12)

Running buffer:

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (for Bis-Tris Gels only) (20X) (NP0002)

Ultrapure su (dH₂O) ile 20 kat sulandırılır. pH ayarlanmaz.

20 ml MES Running Buffer

380 ml dH₂O

Güç kaynağı: Labnet Power Station 200

Elektroforez süresi 1 saat ve voltaj 150 V'tur.

Elektroforez sonrasında jelin sol üst köşesi kesilerek transfer öncesinde dH₂O bulunan kapta kısa bir süre bekletilir.

3.10.4. Transfer

Dry blotting yapılır. Invitrogen iBlot cihazı kullanılır. Protokole uygun olarak düzenek kurulur. Alttan üste: bakır anot ve nitro selüloz membran (ikisi birlikte), jel, bakır katot ve sünger cihaza yerleştirilir. Cihazın kapağı kapatılır. P3 (Program 3)'te 8 dakika boyunca transfer gerçekleştirilir

Transfer cihazı: iBlot™ Gel Transfer Device (IB1001)

Sarf malzeme: iBlot™ Transfer Stack, Mini (Nitrocellulose, 0.2 µm) (IB3010-02)

3.10.5. Deteksiyon

Deteksiyon kiti: Invitrogen, Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System (WB7106)

Blocker/Diluent (Part A) - Concentrated buffered saline solution containing detergent

Blocker/Diluent (Part B) - Concentrated Hammersten casein solution

Wash Solution (16X) - Concentrated buffered saline solution containing detergent

Secondary Antibody Solution - Ready-to-use solution of alkaline phosphatase-conjugated, affinity purified, anti-rabbit IgG, goat conjugate

Chemiluminescent Substrate - Ready-to-use solution of CDP-Star® chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase

Chemiluminescent Substrate Enhancer - Nitro-Block-II. enhancer for blots on NC membranes

Primer antikor: Cell Signalling, PARP (46D11) Rabbit mAb (9532)
1:1000 oranında 10 ml "blocking solution" a eklenerek
hazırlanır.

Shaker: Mini Rocker MR-1

Film: Thermo Scientific - CL-XPosure Film (#34090)

Invitrogen deteksiyon kiti protokolü takip edilir:

Blocking solution:

14 ml dH₂O
4 ml Blocker/Diluent (Part A)
ml Blocker/Diluent (Part B)

Yıkama solusyonu:

150 ml dH₂O
10 ml Wash Solution (16X)

Substrat solusyonu:

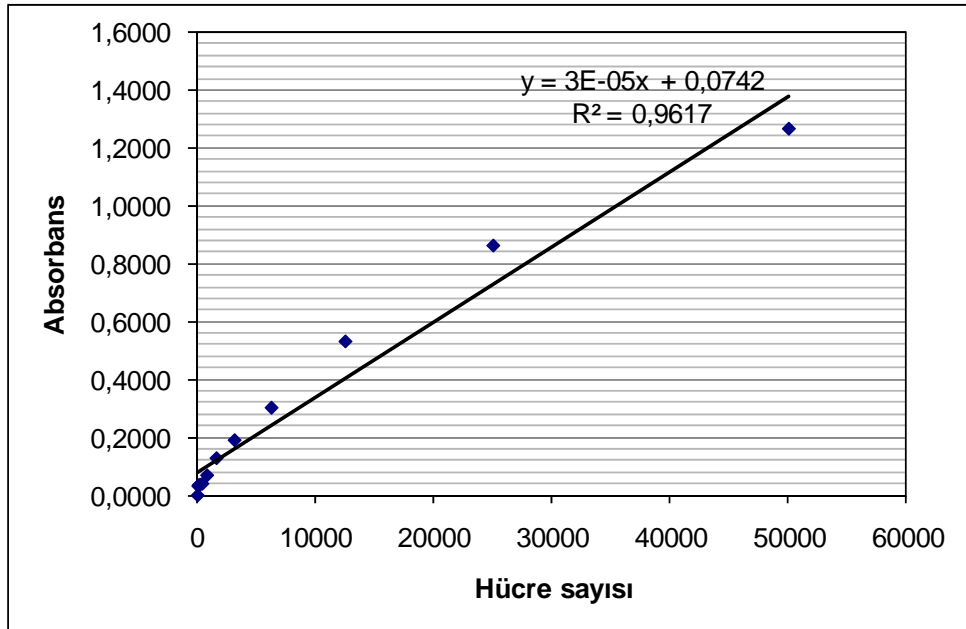
2.375 ml Chemiluminescent Substrate
0.125 ml Chemiluminescent Substrate Enhancer

- 2x5 dk 20 ml dH₂O yıkaması
- 30 dk 10 ml Blocking solution ile shakerda inkübasyon
- 2x5 dk 20 ml dH₂O yıkaması
- 1 saat 10 ml primer antikor solusyonu shakerda inkübasyon
- 4x5 dk 20 ml yıkama solusyonu ile elde yıkama
- 30 dk 10 ml Secondary Antibody Solution eklenir ve shakerda inkübe edilir
- 4x5 dk 20 ml yıkama solusyonu ile elde yıkama
- 3x2 dk 20 ml dH₂O yıkaması
- Hazırlanan Substrat solusyonunun tamamı membran üzerine yavaşça dökülür.
- Karanlıkta 5 dakika inkübe edilir
- Karanlıkta üzerine film kapatılarak görüntüleme yapılır (1 saat).

4. BULGULAR

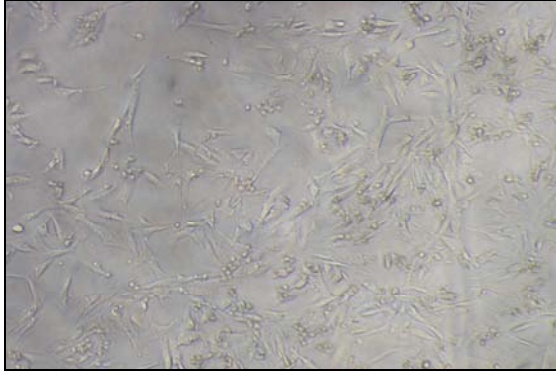
4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Sitotoksosite MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları

Sitotoksosite bulgularında, MTT metoduna uygun olan hücre sayısını belirlemek için MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı. Farklı sayılarda MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testiyle verdiği absorbanslar ölçüldü. Böylece total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğrusal ilişki olduğu belirlendi (şekil 4.1.). Alınan sonuçlara uygun sayıda hücreler sitotoksosite testlerinde kullanıldı. Bu sonuçlar MCF-7 hücreleri için de referans olarak alındı.

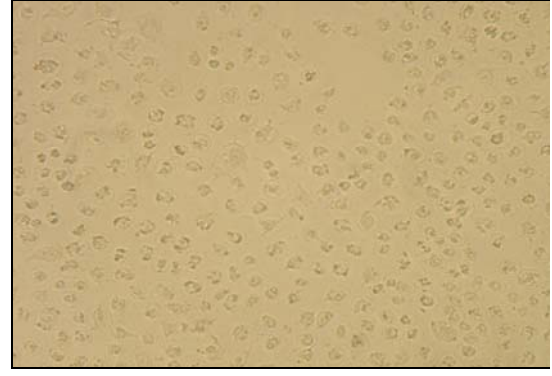


Şekil 4.1. MTT metodu ile MDA-MB-231 hücrelerinin 570 nm'de verdikleri absorbans değerleri.

Hücrelerde ökse otu ekstraktları uygulamalarından sonra olabilecek değişimleri değerlendirebilmek ve hataları en aza indirebilmek amacıyla pozitif (maksimum canlılık) ve negatif (minimum canlılık) kontrol hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin genel görünümü referans olarak alınan MDA-MB-231 hücreleri için resim 4.1. ve resim 4.2.'de görülmektedir.

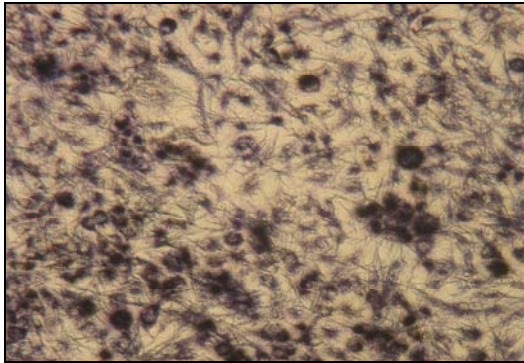


Resim 4.1: MTT testinden önce pozitif kontrol MDA-MB-231 hücreleri

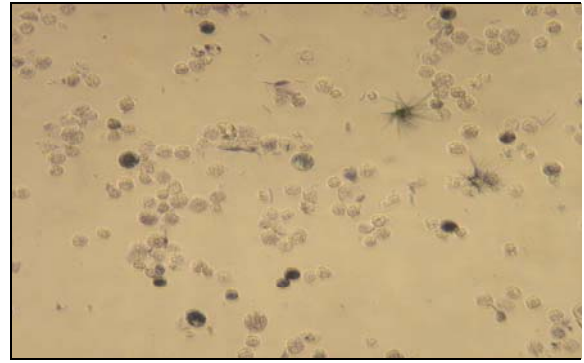


Resim 4.2: MTT testinden önce negatif kontrol MDA-MB-231 hücreleri.

Ayrıca MTT testi sonucunda oluşan koyu mavi renkli formazon bileşiklerinin pozitif ve negatif kontrol gruplarında genel görünüşleri resim 4.3 ve resim 4.4’de görülmektedir.



Resim 4.3: MTT testinden sonra oluşan pozitif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü.



Resim 4.4: MTT testinden sonra oluşan negatif kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristallerinin görünümü.

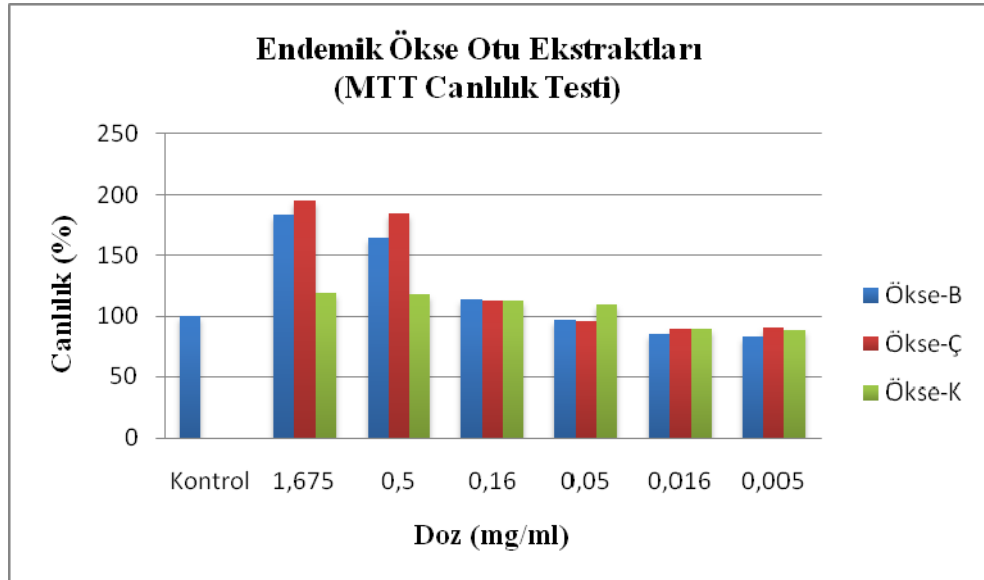
4.1.1. MTT metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ökse otu ekstraktlarının, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT testi yapıldı. Hücelere endemik ökse otu ekstraktlarının altı farklı dozu 1.675, 0.50, 0.16, 0.05, 0.016, 0.05 mg/ml uygulandı. Üç ayrı plak’a ekilen hücre dizileri 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ortaya çıkan % canlılıklar

sırasıyla şekil 4.2, 4.3 ve 4.4’de gösterildi. MTT testi uygulamasından 48 ve 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazan kristallerinin görüntüleri 10x ve 20x objektif ile inverted mikroskop altında fotoğraflandı.

4.1.1.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları

Hücelere 24 saat süreyle endemik ökse otu ekstraktları uygulandığında ortaya çıkan MTT sonuçları şekil 4,2’de gösterildi. Mikroskopik incelemede ekstraktların tüm dozlarının MDA-MB-231 hücrelerinin büyümelerini engellemediği gözlemlendiği halde MTT canlılık testi sonuçlarında 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarda interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu gözlemlendi (şekil 4.2).

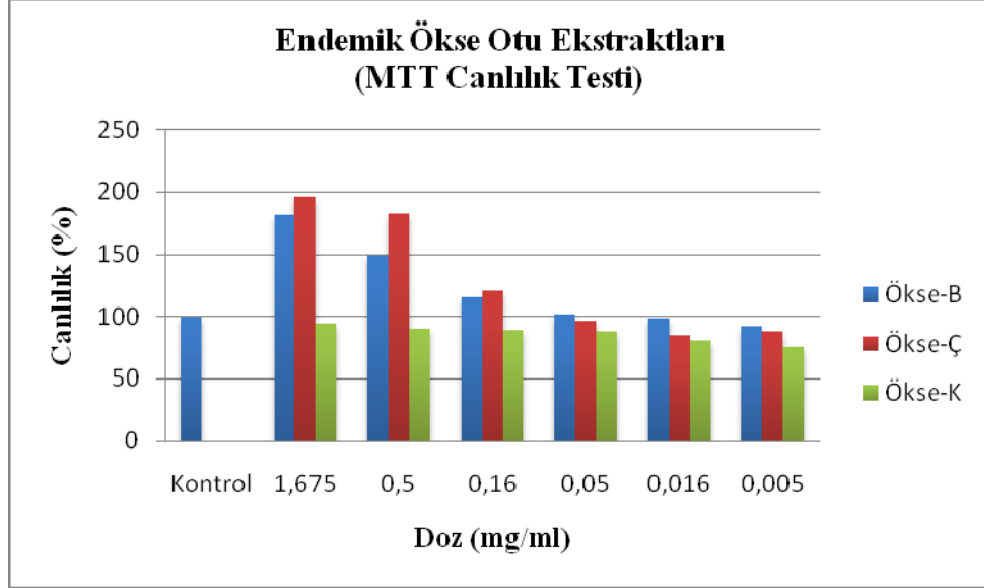


Şekil 4.2. Endemik ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

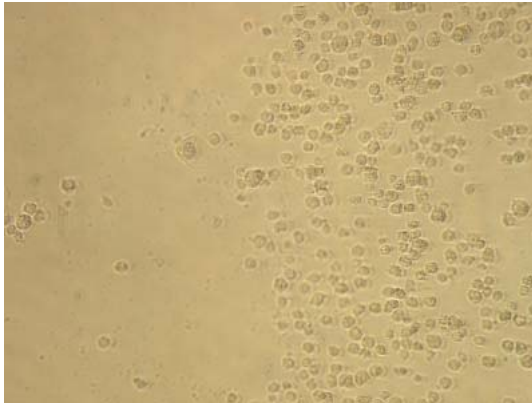
4.1.1.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları

Ekstraktların uygulanmasından 48 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 4.3’de gösterildi. Mikroskopik inceleme sonucu yalnız Ökse-K ekstraktının 1.675 mg/ml dozunda sitotoksik etki gözlenirken her üç ekstraktın da 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarının uygulandığı kuyucukların taban yüzeyinde kirlilik ve tortu gözlemlendi (resim 4.5-4.12). MTT sonuçlarına göre bu üç dozda yine interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu

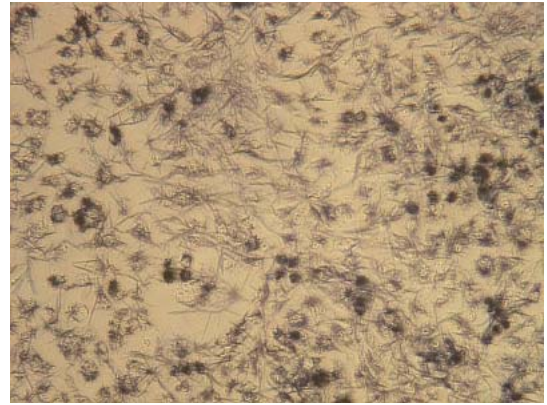
gözlendi (şekil 4.3). Ökse-K % 50 oranında alkolle çözülerek hazırlandığı için % 2,5 ve % 1,5 alkol uygulanarak kontrol hazırlandı. Mikroskopta incelendiğinde 48 saat sonunda alkol kontrollerinin maksimum canlılık görülen kontrol hücrelerinden farklı olmadığı görüldü (resim 4.13 ve resim 4.14).



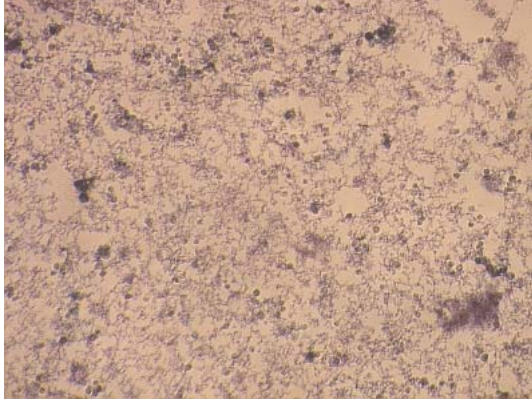
Şekil 4.3: Endemik ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



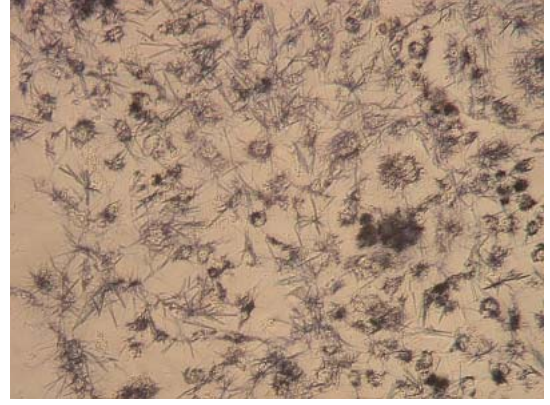
Resim 4.5: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)



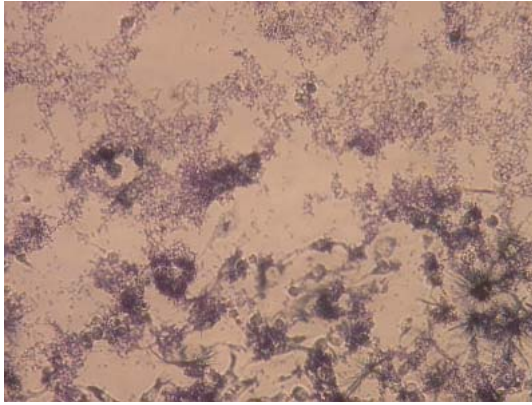
Resim 4.6: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)



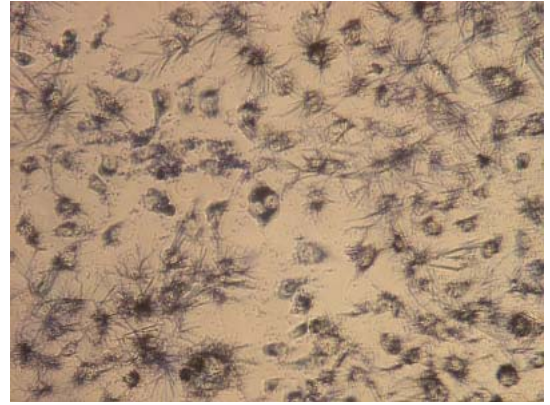
Resim 4.7: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



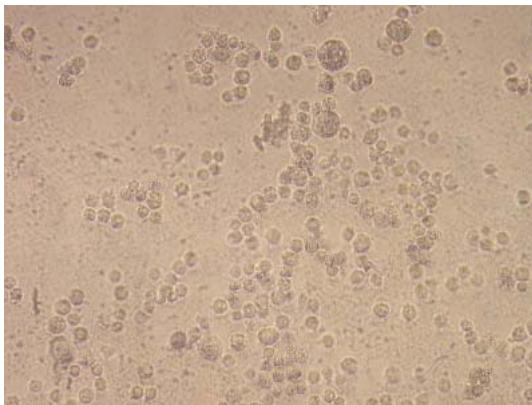
Resim 4.8: 0.5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



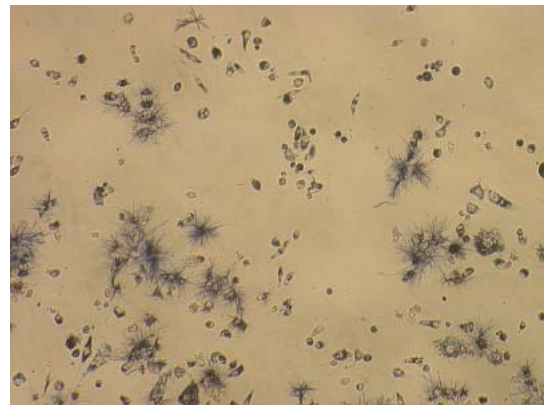
Resim 4.9: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



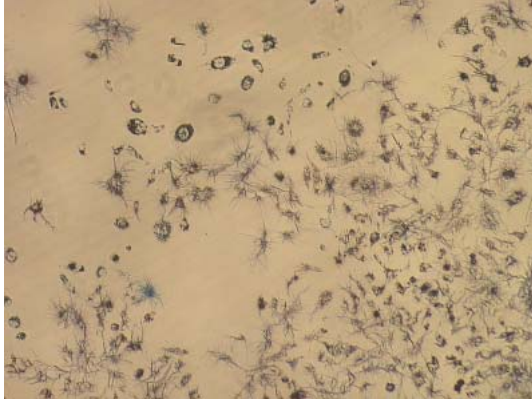
Resim 4.10: 0.5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)



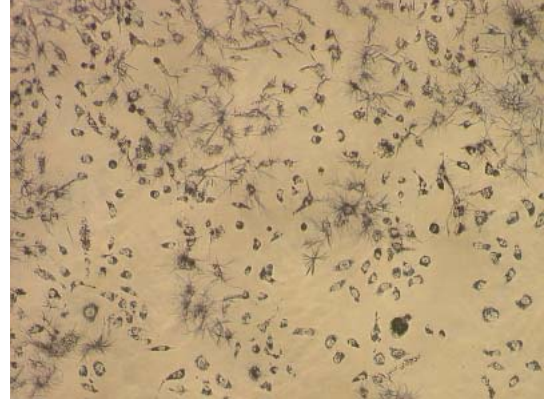
Resim 4.11: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Şekil 4.12: 0.5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



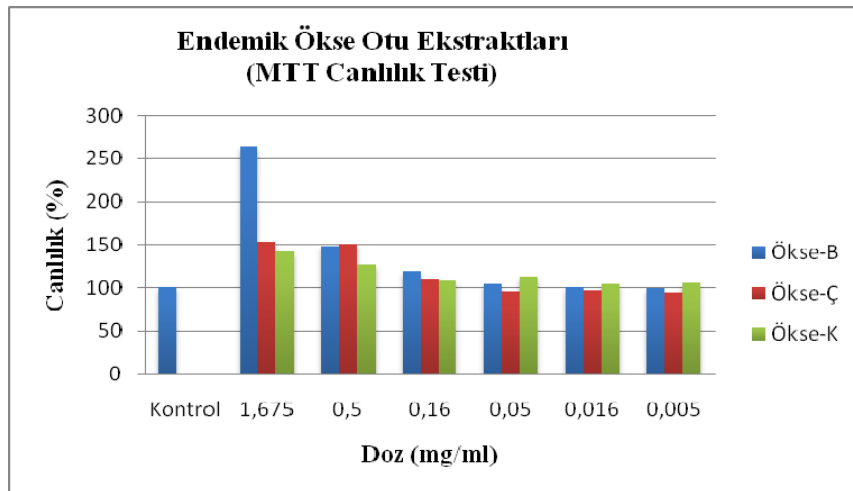
Resim 4.13: % 2.5 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



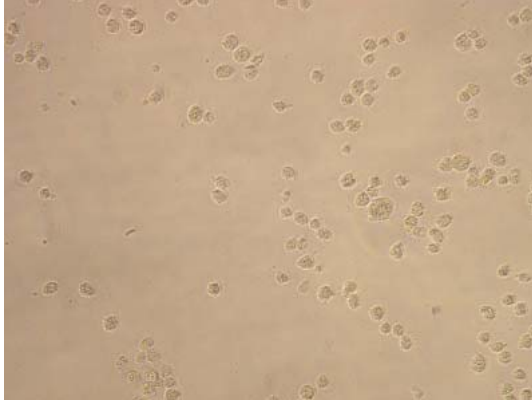
Resim 4.14: % 1.2 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

4.1.1.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları

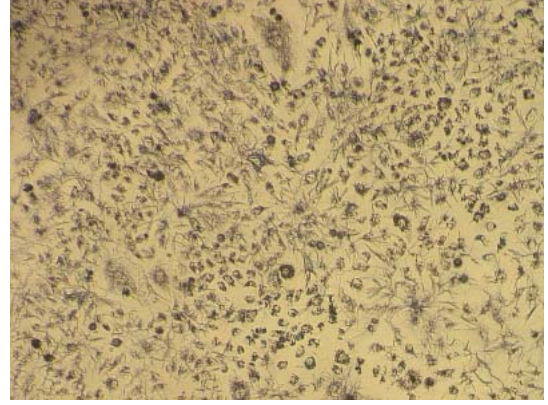
Uygulamadan 72 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları Şekil 4.4'de gösterildi. Mikroskobik incelemede her üç ekstraktın da 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarının uygulandığı kuyucuklarda özellikle Ökse-Ç ekstraktının 1.675 mg/ml dozunun uygulandığı kuyucukta (resim 4.19) kirliliğin daha da arttığı gözlemlendi. MTT sonuçlarına göre bu üç dozda yine interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Mikroskobik görüntü sonuçlarına göre ise sitotoksik etki Ökse-B ve Ökse-K ekstraktlarının 1.675 ve 0.50 mg/ml dozlarında gözlenirken (resim 4.17, 4.18, 4.21, 4.22) 72 saat sonunda da alkol kontrollerinin maksimum canlılık görülen kontrol hücrelerinden farklı olmadığı görüldü (resim 4.23, 4.24).



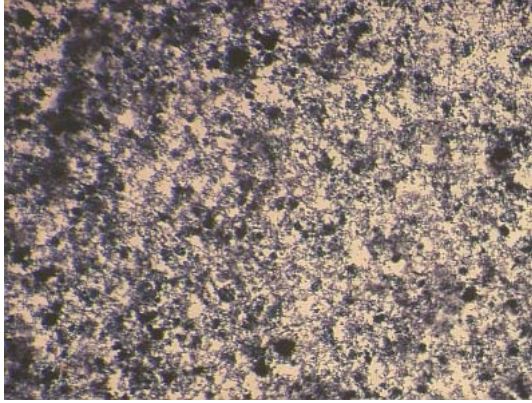
Şekil 4.4: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



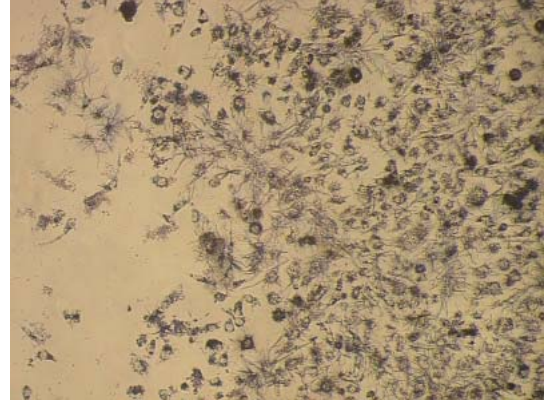
Resim 4.15: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)



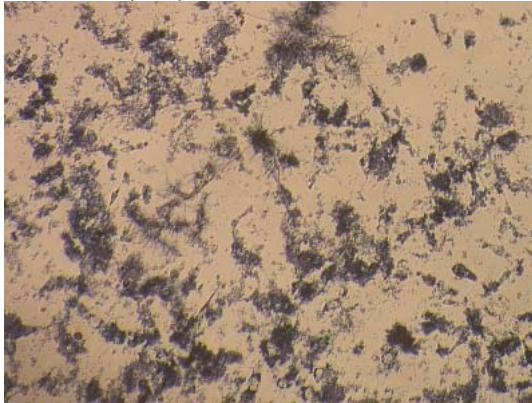
Resim 4.16: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x20)



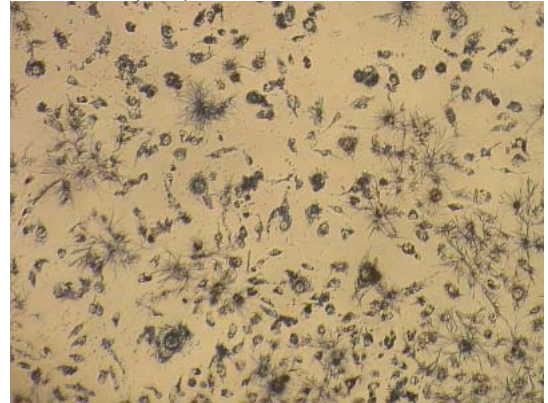
Resim 4.17: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



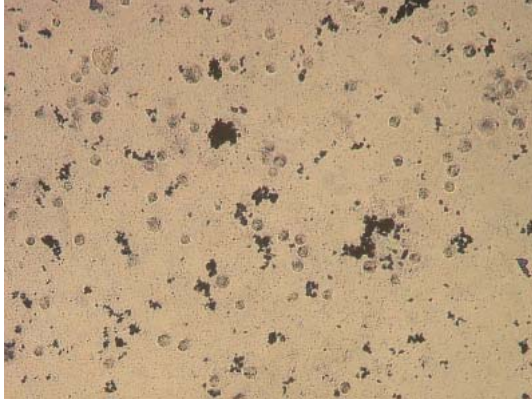
Resim 4.18: 0,5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



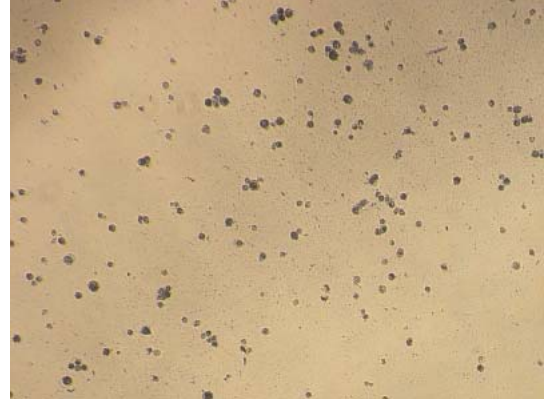
Resim 4.19: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



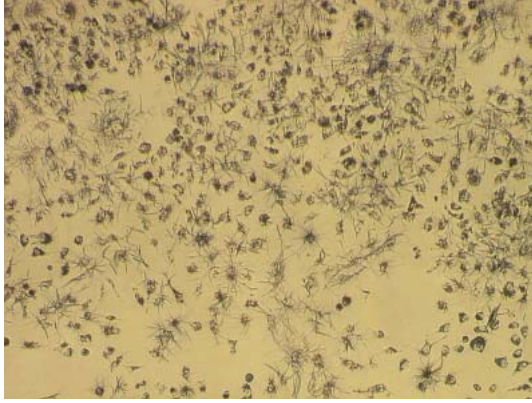
Resim 4.20: 0,5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



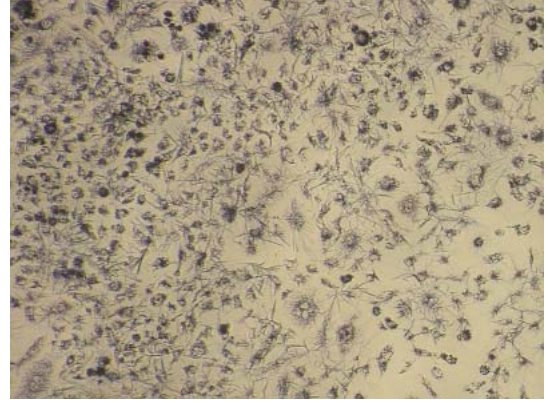
Resim 4.21: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.22: 0,5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



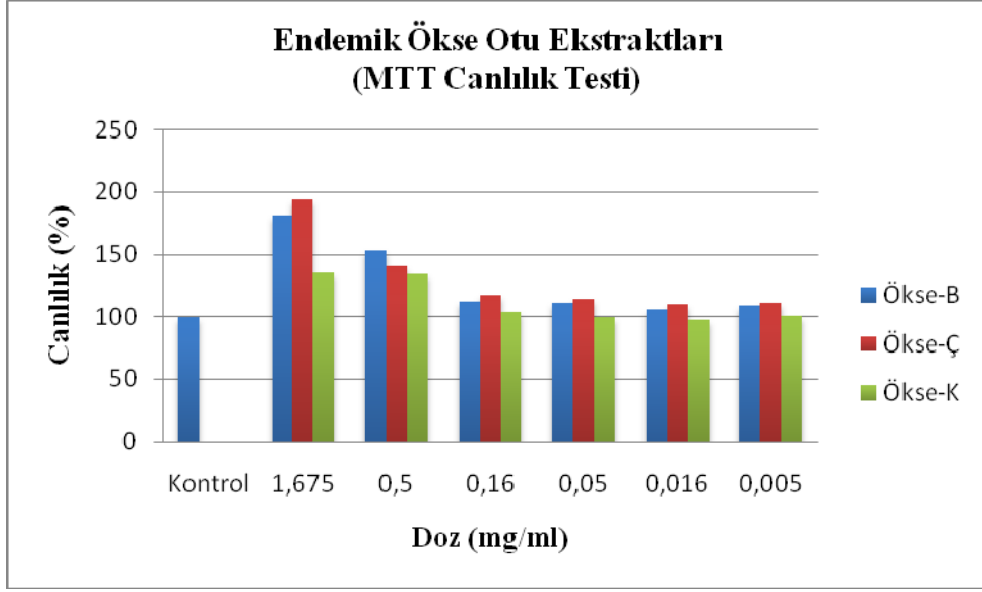
Resim 4.23: % 2.5 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.24: % 1.2 Alkol uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

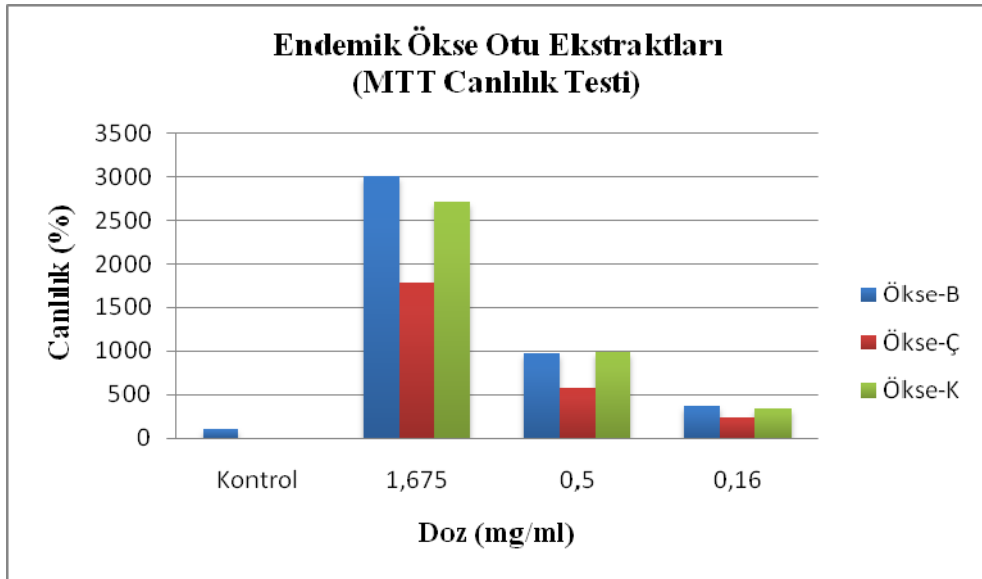
4.1.1.4. İnterferansın Araştırılması

İnterferansın oluşmasında endemik ökse otu ekstraktların PH'larının etkili olabileceği düşünülerek PH'ları ölçüldü; Ökse-B: 7.80, Ökse-Ç: 7.83 ve Ökse-K: 7.39 olarak bulundu. PH'ları sırasıyla 7.41, 7.43 ve 7.39 olarak ayarlandı ve yeni bir plak'a ekstraktların yine altı farklı dozu (1.675, 0.50, 0.16, 0.05, 0.016, 0.05 mg/ml) uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 4.5'da gösterildi. Buna göre her üç endemik ökse otu ekstraktının 1.675, 0.50 ve 0.16mg/ml dozlarında interferans gözlemlendi ve bu üç dozda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 4.5: Endemik ökse otu ekstraktlarının PH'ları Ökse-Ç: 7.41, Ökse-B: 7.43 ve Ökse-K: 7.39 olarak ayarlandıktan sonra 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

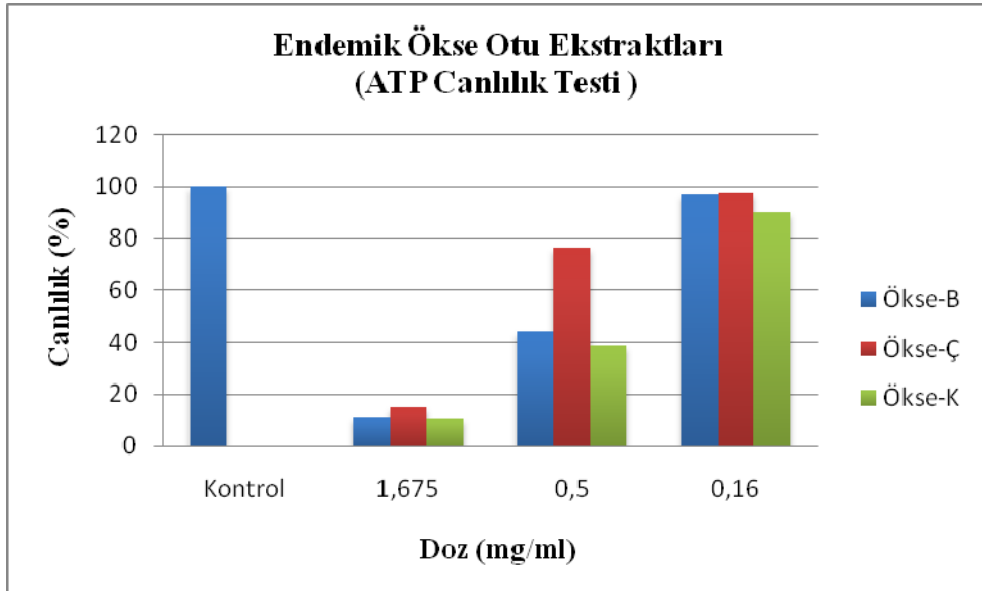
İnterferansın, ekstraktların PH'larından kaynaklanmadığı tespit edilince neden kaynaklandığını anlamak için hücre hattı ilave etmeden yalnız endemik ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu 1.675, 0.50, 0,16 mg/ml yeni bir plak'a uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Üç dozda % canlılığın kontrol hücrelerinden çok daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Endemik ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi.

4.1.2. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ökse otu ekstraktlarının, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. Yüksek üç dozu 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml uygulanan endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 4.7’de gösterildi. Buna göre 1.675 mg/ml dozda üç endemik ökse otu ekstraktında sitotoksik etki gözlenirken, 0.50 mg/ml dozda Ökse-K’nın Ökse-B’ye oranla, 0,16 mg/ml dozda Ökse-K’nın diğerlerine oranla daha sitotoksik olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.7: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.

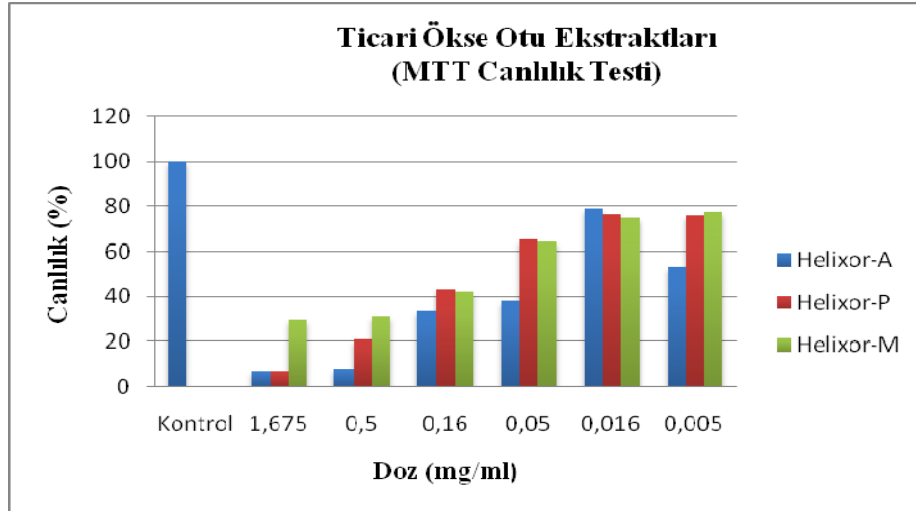
4.1.3. MTT Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücrelere ticari ökse otu ekstraktlarının altı farklı dozu 1.675, 0.50, 0.16, 0.05, 0.016, 0.05 mg/ml uygulandı. 3 ayrı plak’a ekilen hücre dizileri 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ortaya çıkan % canlılıklar sırasıyla şekil 4.8, 4.9, 4.10’da gösterildi. Fotoğraflama

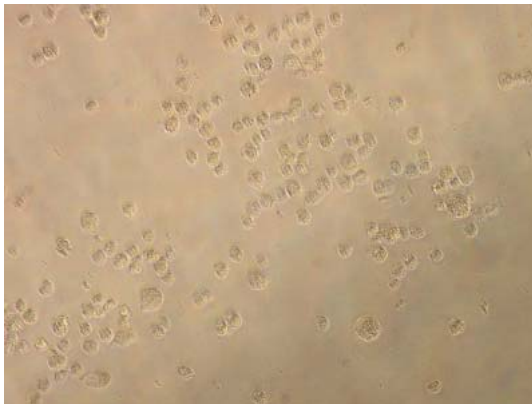
işlemi 24. saatte MTT testi uygulamasından önce, 48 ve 72. saatte MTT uygulamasından sonra (MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazan kristalleri) 10x ve 20x objektif ile inverted mikroskop altında yapıldı.

4.1.3.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları

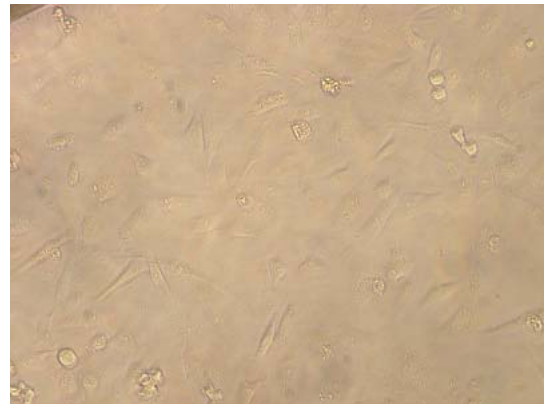
Hücelere 24 saat süreyle ticari ökse otu ekstraktları uygulandığında ortaya çıkan MTT sonuçları şekil 4.8’de gösterildi. Mikroskopik incelemede ekstraktların MDA-MB-231 hücrelerinin büyümelerini engellemediği (resim 4.27-4.32) gözlemlendiği halde MTT canlılık testi sonuçlarında özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8).



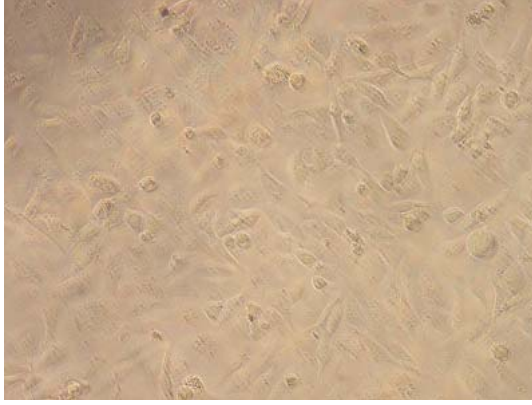
Şekil 4.8: Ticari ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



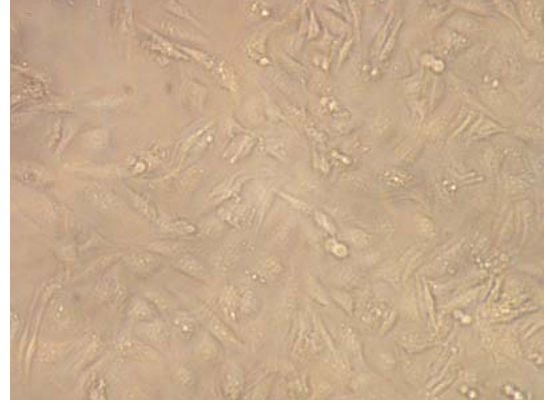
Resim 4.25: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



Resim 4.26: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 Hücreleri (x20)



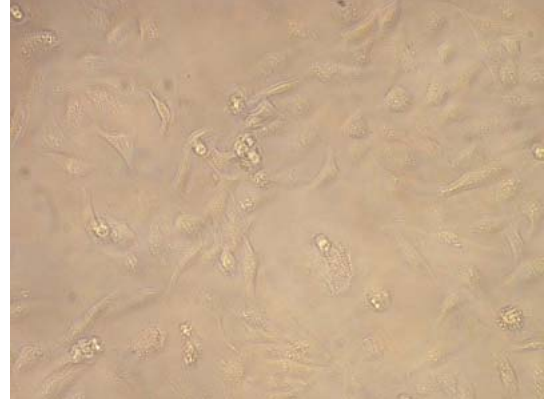
Resim 4.27: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



Resim 4.28: 0,5 mg/ml Helixor A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



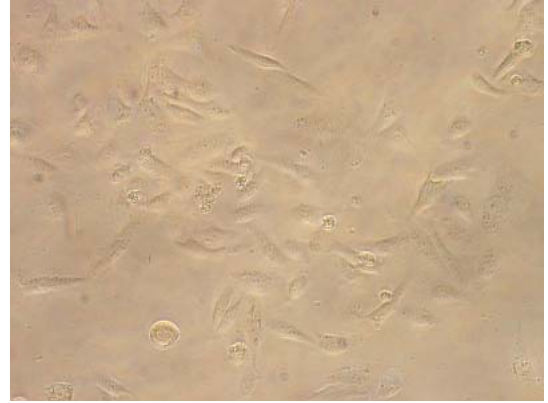
Resim 4.29: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



Resim 4.30: 0,5 mg/ml Helixor P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



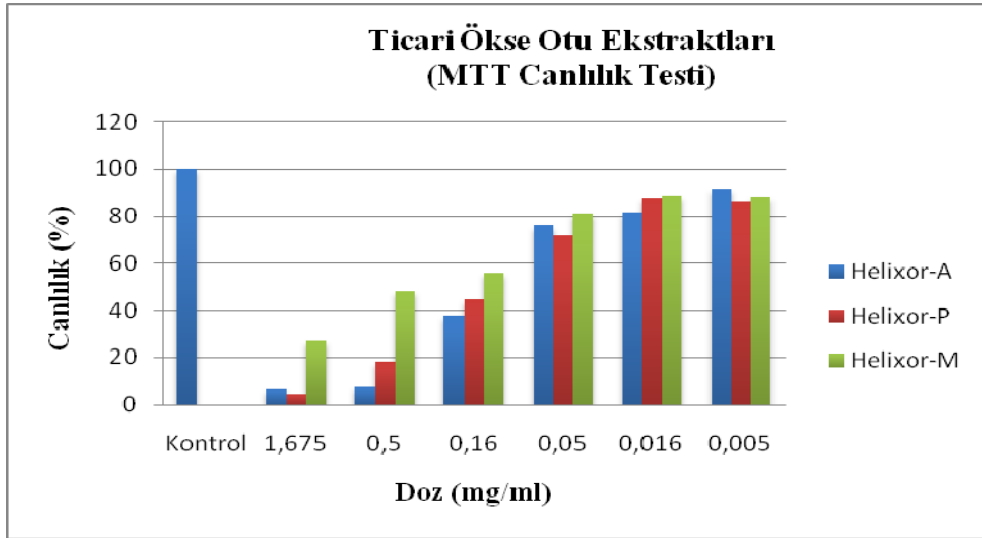
Resim 4.31: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)



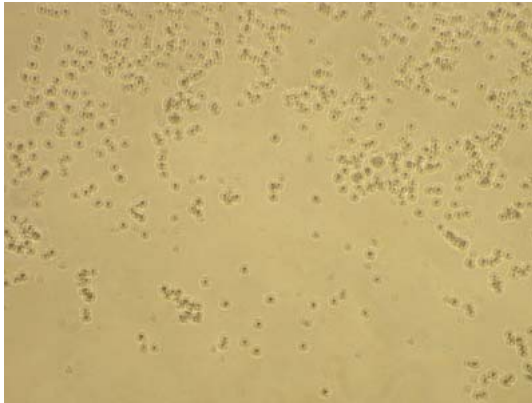
Resim 4.32: 0,5 mg/ml Helixor M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 Hücreleri (x10)

4.1.3.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları

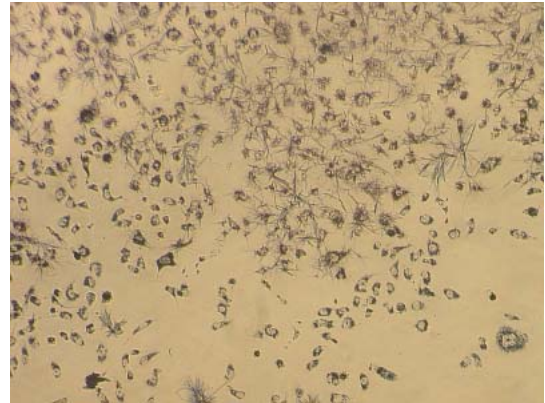
Ekstraktların uygulanmasından 48 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları Şekil 4.9'da gösterildi. Mikroskopik inceleme sonucu yalnız Helixor-P'nin 1.675 mg/ml dozunda (resim 4.36) kontrole oranla hücre sayısında biraz azalma gözlenirken 24 saat sonraki MTT grafiğinde görüldüğü gibi her üç ekstraktın da özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (şekil 4.9).



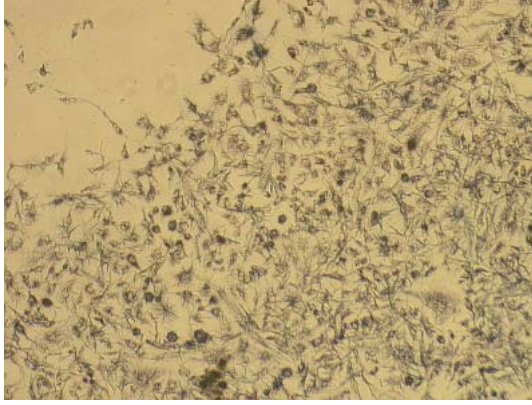
Şekil 4.9: Ticari ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



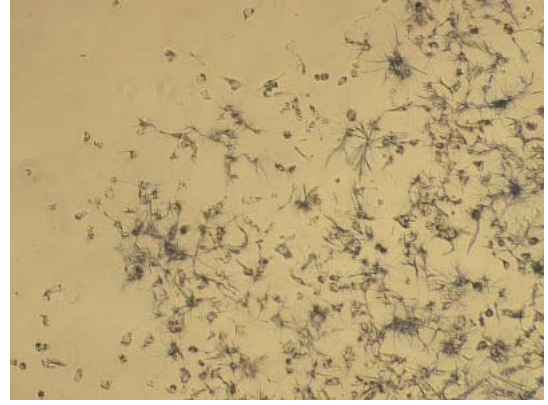
Resim 4.33: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)



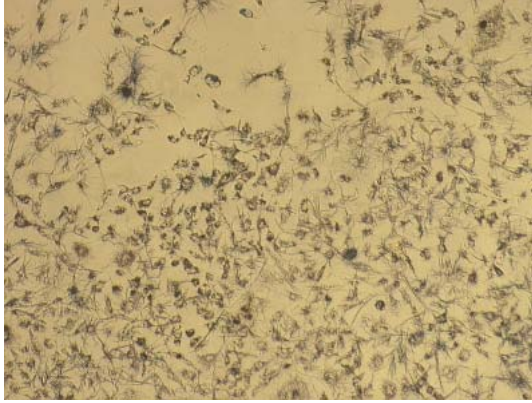
Resim 4.34: 48 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.35: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



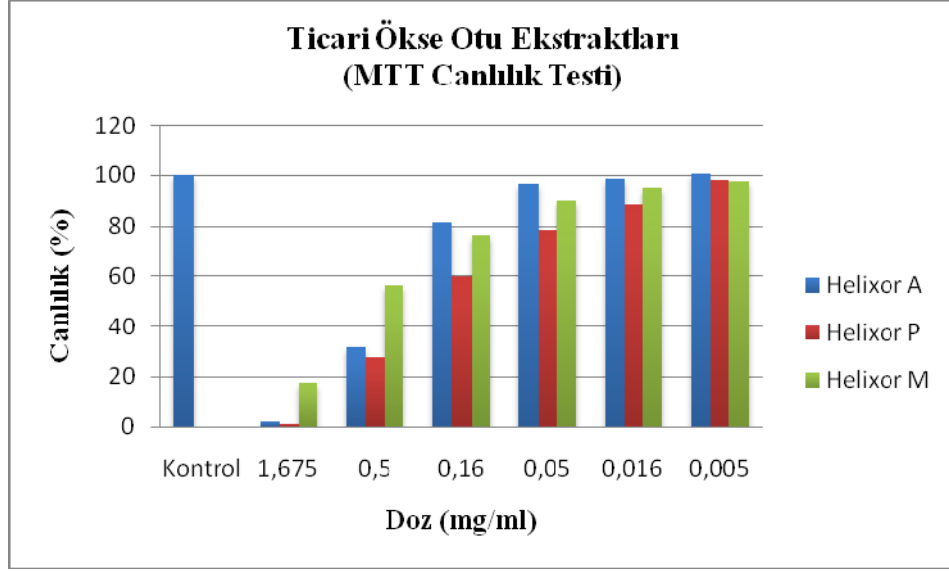
Resim 4.36: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



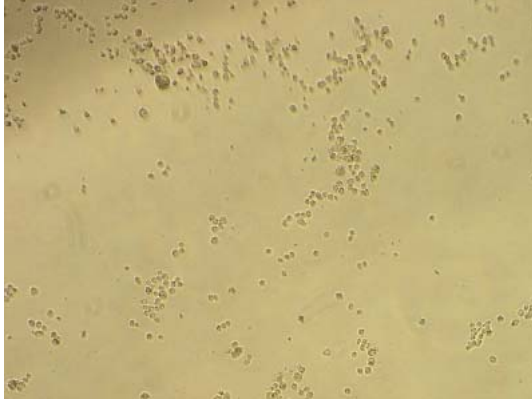
Resim 4.37: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 48 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

4.1.3.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları

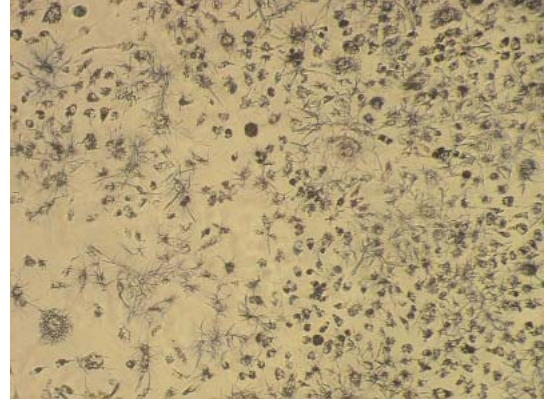
Uygulamadan 72 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 4.10'de gösterildi. Mikroskopik incelemede her üç ekstraktın da 1.675 mg/ml dozlarında (Şekil 4.40, 4.42, 4.44) ve Helixor-A ve Helixor-P'nin 0,5 mg/ml dozunda (Şekil 4.41, 4.43) kontrole oranla hücre sayısında azalma gözlemlendi. 24 ve 48 saat sonraki MTT testinde olduğu gibi her üç ekstraktın da özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (şekil 4.10).



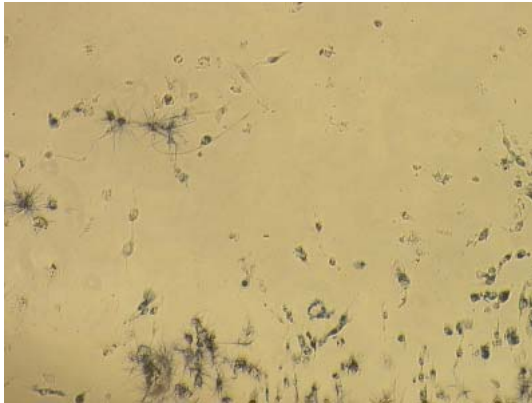
Şekil 4.10: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72 saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



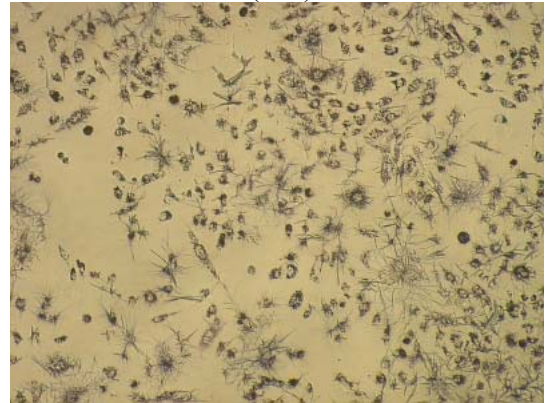
Resim 4.38: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x10)



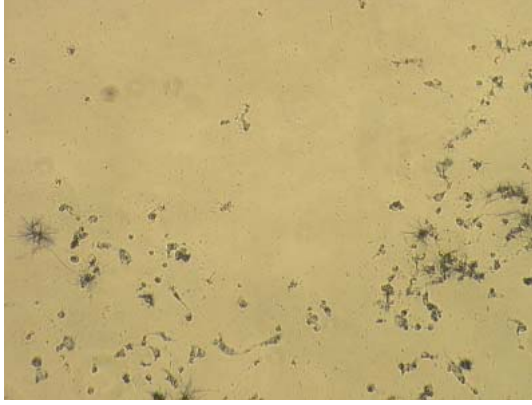
Resim 4.39: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



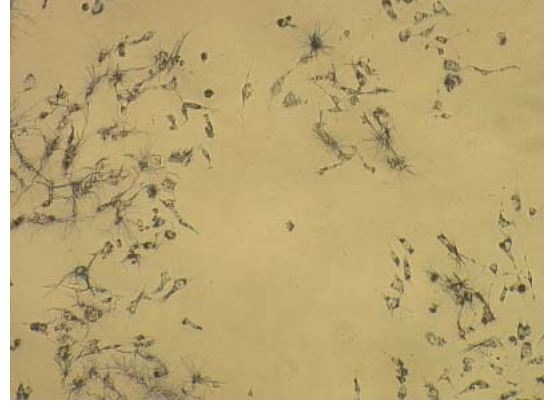
Resim 4.40: 1.675 mg/ml Helixor A uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 Hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



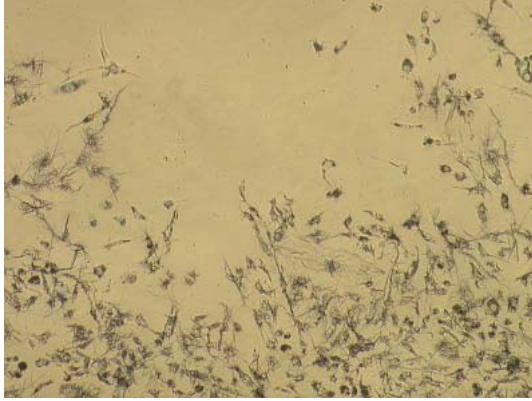
Resim 4.41: 0,5 mg/ml Helixor A uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 Hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



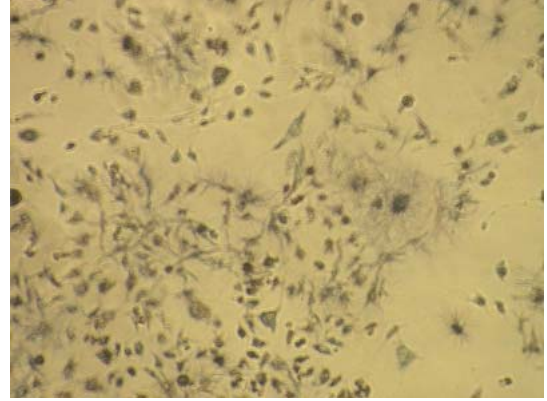
Resim 4.42: 1.675 mg/ml Helixor P uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.43: 0,5 mg/ml Helixor P uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



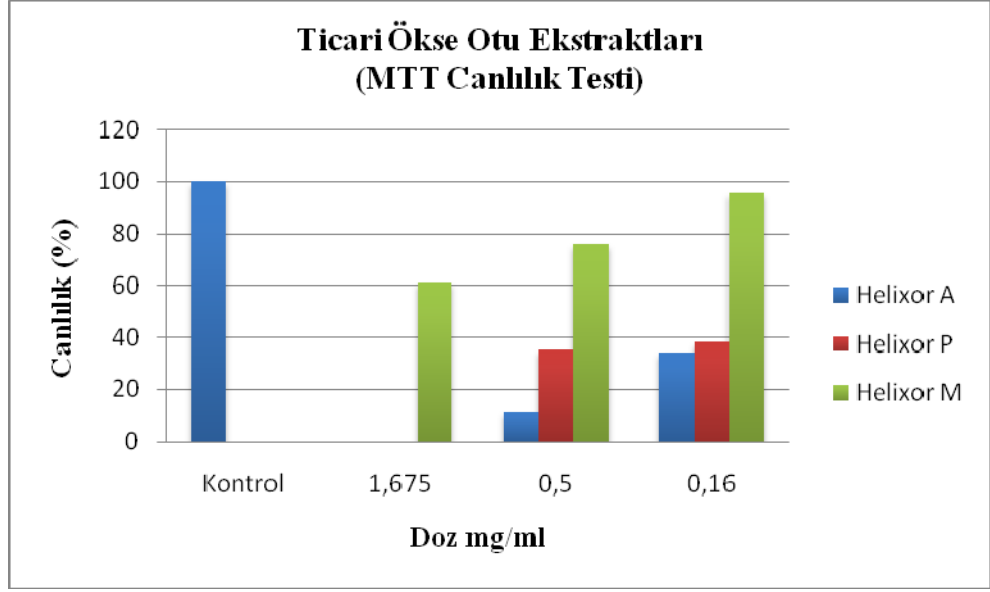
Resim 4.44: 1.675 mg/ml Helixor M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.45: 0,5 mg/ml Helixor M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

4.1.3.4. İnterferansın Araştırılması

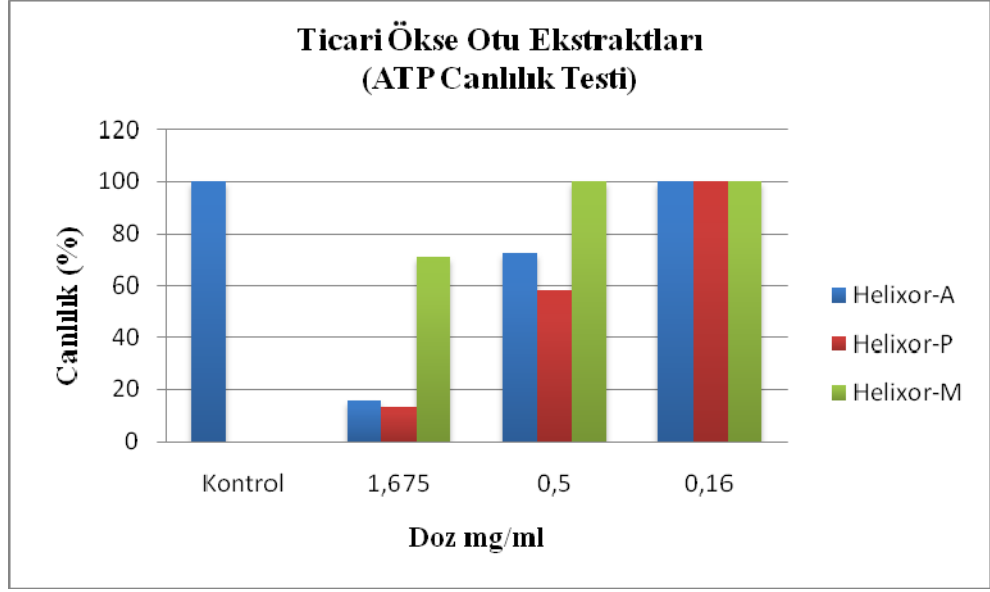
Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ticari ökse otu ekstraktlarında 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MTT testinde % canlılığın kontrole oranla düşük olmasının nedenini araştırmak amacıyla, hücre hattı ilave etmeden yalnız ticari ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu (1.675, 0.50, 0,16 mg/ml) yeni bir plate uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Tüm ekstraktlarda üç dozda da yine % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Ticari ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile gösterilmesi.

4.1.4. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ticari ökse otu ekstraktlarının, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. Yüksek üç dozu (1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml) uygulanan ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre soylarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 4.12’de gösterildi. Buna göre 1.675 mg/ml dozda Helixor-A ve Helixor-P’de sitotoksik etki gözlenirken, 0.50 mg/ml dozda Helixor-P’nin Helixor-A’ya oranla, daha sitotoksik olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.12: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.

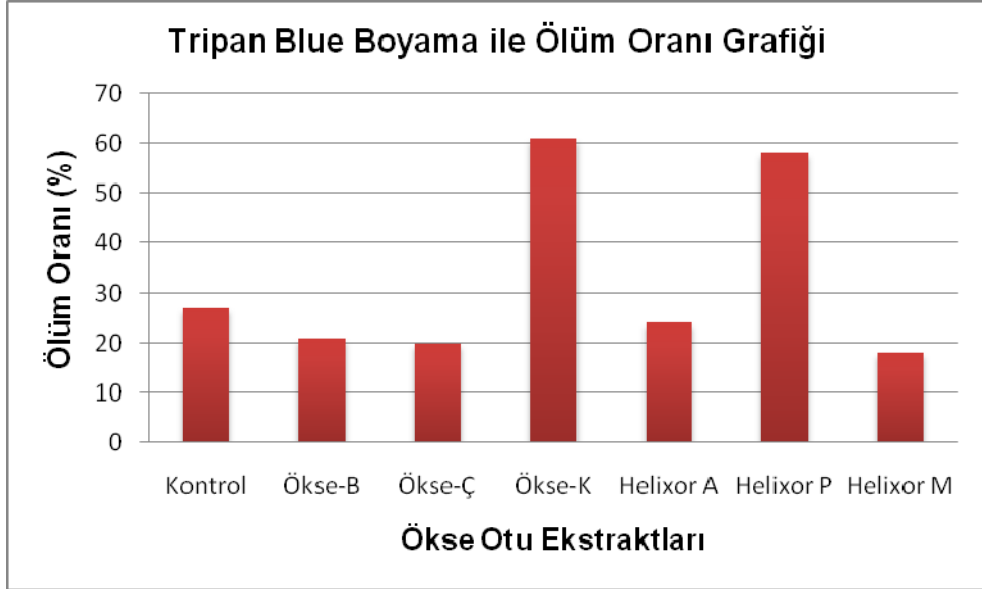
4.2. Ökse Otu Ekstraktlarının MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Mikroskopta Tespiti

Ökse otu ekstraktlarının uygulanması ile gerçekleşen hücre ölümünün apoptozis veya nekrozis ile mi ortaya çıktığını belirlemek amacıyla hücre ölümü gözlenen MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri hücrelerinin mikroskopta tespiti için tripan blue ile boyama, ikili boyama (hoechst boya ve propidium iyodür) ve hematoksilen boyama yapıldı.

4.2.1. Tripan Blue Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT ve ATP canlılık testlerine ek olarak hücreler tripan blue ile boyandı. Hücrelere endemik ve ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozu uygulandı ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra boyanmış (ölü) ve boyanmamış (canlı) hücreler toma lamı üzerinde inverted ışık mikroskop yardımıyla sayılarak % ölüm oranları hesaplandı. Grafik (şekil 4.13) incelendiğinde Ökse-B, Ökse-Ç, Helixor-A ve Helixor-M ile muamele

edilen hücrelerde % 20 oranında ölüm tespit edildi. Ökse-K ile muamele edilen hücrelerde ölüm oranı % 69 iken Helixor-P'de % 58 bulundu.

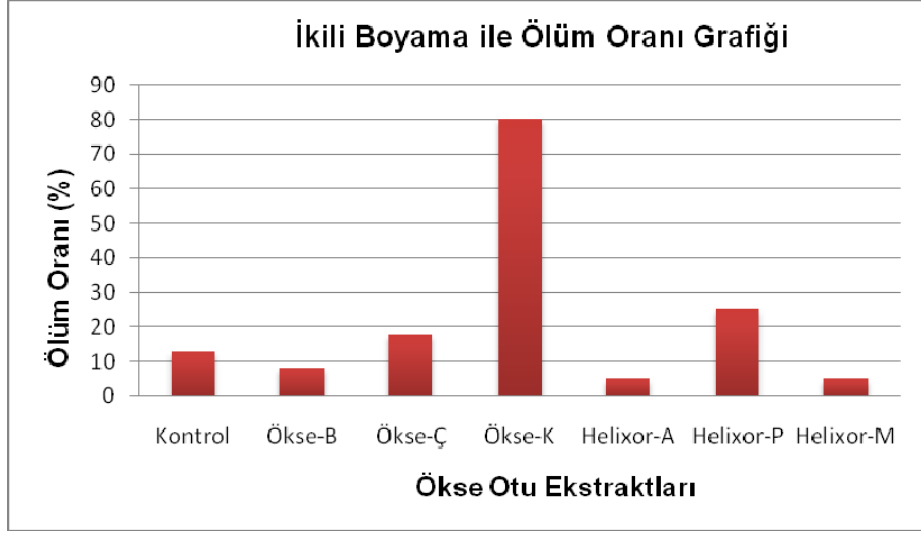


Şekil 4.13: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin tripan blue boyaması ile gösterilmesi.

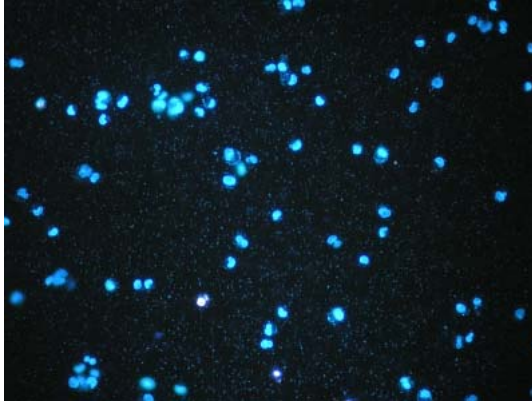
4.2.2. İkili Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozunun uygulandığı MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri hücrelerinde 72 saat sonunda canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen Hoechst boyası ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya propidium iyodür beraber kullanıldı. Nukleusları Hoechst boyasıyla mavi renk boyanmış canlı ve ölü hücreler ile nukleusları propidium iyodür boyasıyla kırmızı renk boyanmış ölü hücreler floresan mikroskopunda sayılarak % ölüm oranları hesaplandı, grafik şekil 4.14'da gösterildi. Boyanan hücrelerin fotoğraflanması 10x ve 20x objektif ile floresan mikroskobu altında yapıldı (resim 4.46-4.50).

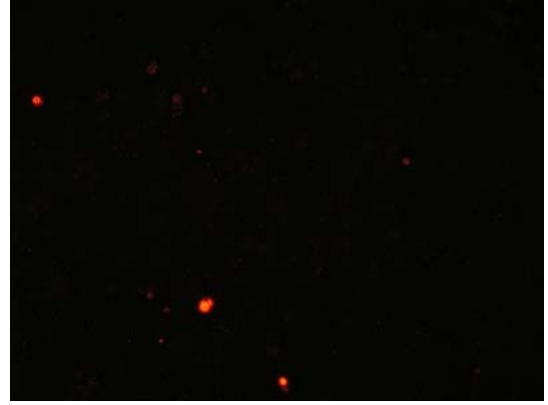
Ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor A ve Helixor M'nin uygulanan dozlarında endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-B ve Ökse-Ç'ye oranla ölüm yüzdeleri daha düşük gözlemlendi. Ökse-K uygulanan hücrelerde ise Helixor-P uygulanan hücrelere oranla ölüm yüzdesi fazla bulundu (Şekil 4.14).



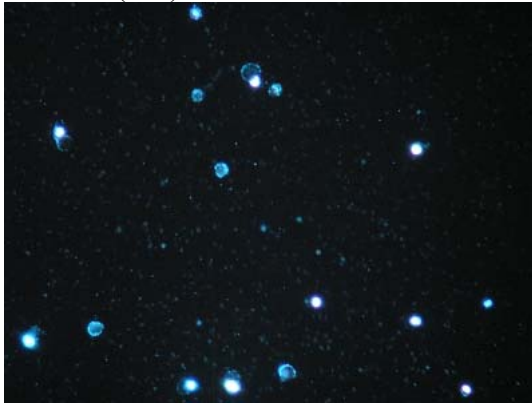
Şekil 4.14: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ikili boyama ile gösterilmesi.



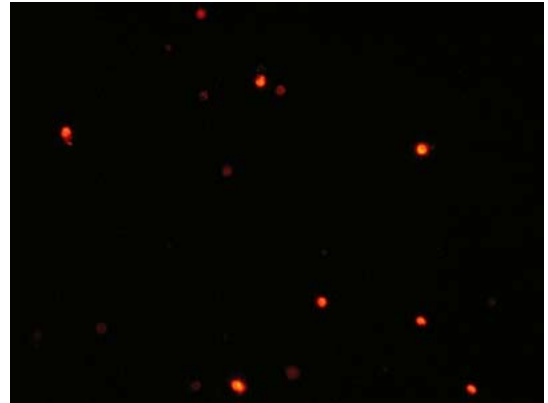
Resim 4.46: Hoechst ile 72 saat sonra boyanan canlı ve ölü kontrol MDA-MB-231 hücreleri (10x)



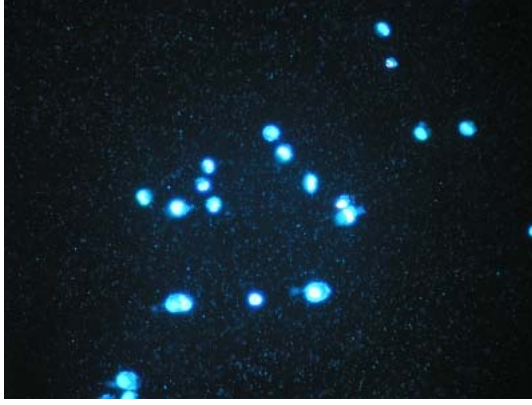
Resim 4.47: Propidium iyodür ile 72 saat sonra boyanan ölü kontrol MDA-MB-231 hücreleri (10x)



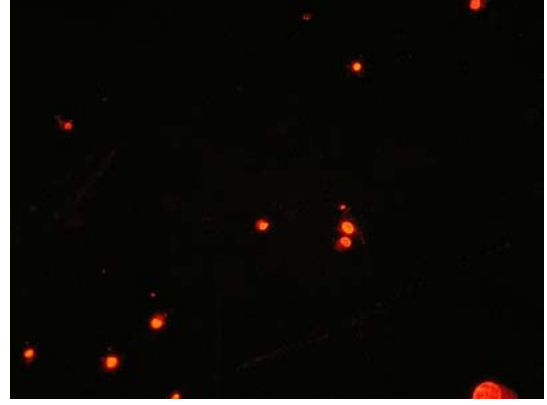
Resim 4.48: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)



Resim 4.49: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)



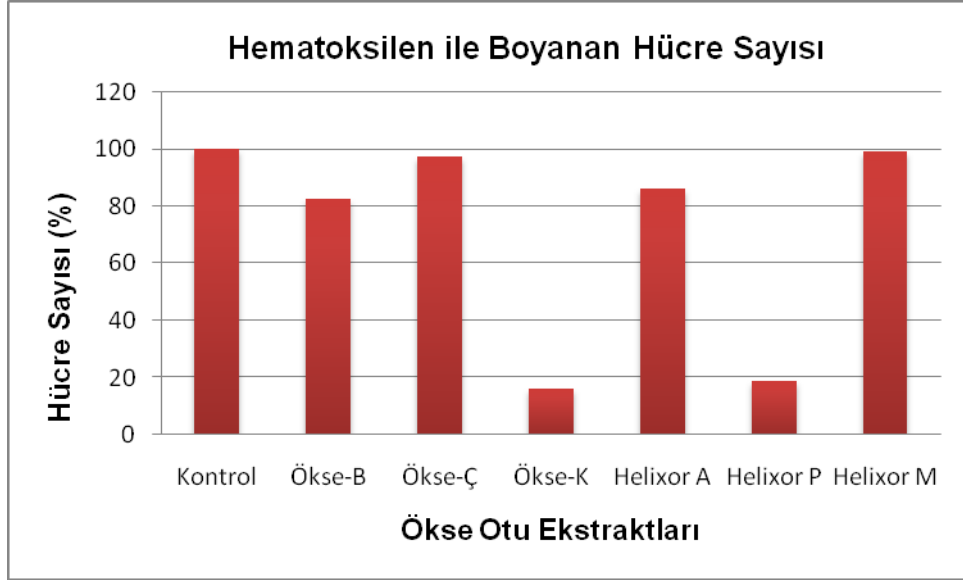
Resim 4.50: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)



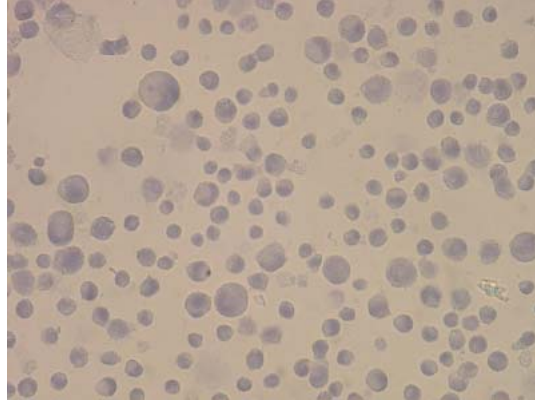
Resim 4.50: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MDA-MB-231 hücreleri (10x)

4.2.3. Hematoksilen Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

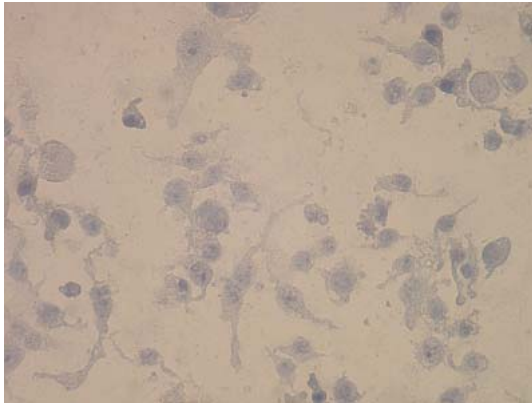
Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozu uygulanan MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri hücreleri 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda 6 kuyucuklu plaklarda fotoğraflandı. Resim 4.58-4.60'da görüldüğü gibi her üç Helixor'un etkisi 24. saatte başlarken endemik ökse otu ekstraktlarının etkisi 72. saatte görülmektedir (resim 4.61-4.63). Ökse otu ekstraktlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat sonunda morfolojilerini incelemek amacıyla hematoksilen boyama yapıldı. Nükleusları düzgün ve mavi renk boyanmış hücreler ışık mikroskopunda sayılarak % oranları hesaplandı, grafik şekil 4.15'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre, endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-Ç ve ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor M'nin uygulanan dozlarında kontrol hücrelerine oranla hücre sayısında bir değişiklik gözlenmezken Ökse-B ve Helixor-A'da hücre sayısının azaldığı, bu azalmanın özellikle Ökse-K ve Helixor-P'de çok fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca Ökse-B, Ökse-Ç, Helixor A ve Helixor M ekstraktlarının uygulandığı hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla hücre morfolojilerinde değişim gözlenmedi. Ökse-K uygulanan hücrelerde hücre zarları parçalanmış ve nükleusları kontrole oranla daha koyu mavi boyanmıştı (Şekil 4.52). Helixor-P uygulanan hücrelerde ise hücre zarlarının tamamıyla parçalandığı gözlemlendi (Şekil 4.53).



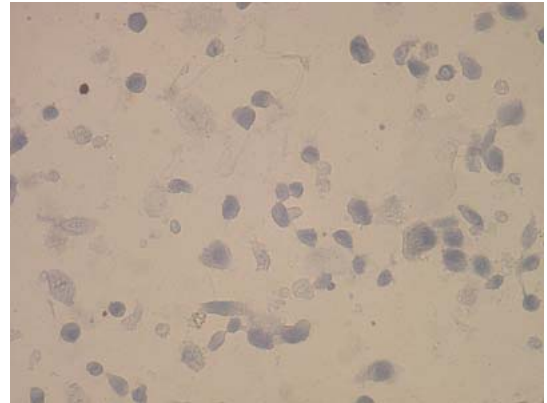
Şekil 4.15: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin hematoksilin boyama ile gösterilmesi.



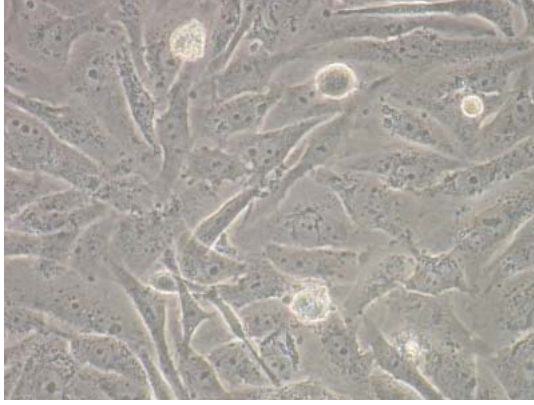
Resim 4.51: Hematoksilin ile 72 saat sonra boyanan kontrol MDA-MB-231 hücreleri



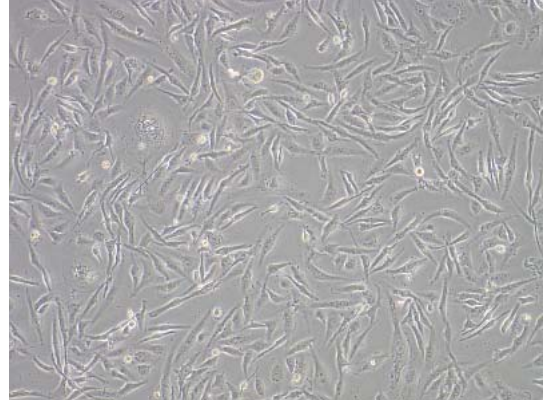
Resim 4.52: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hematoksilin ile boyanan MDA-MB-231 Hücreleri (20x)



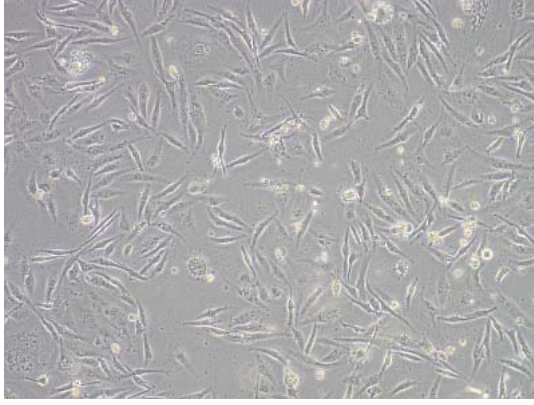
Resim 4.53: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hematoksilin ile boyanan MDA-MB-231 Hücreleri (10x)



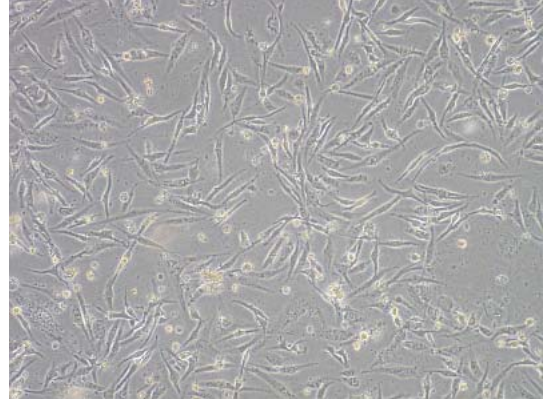
Resim 4.54: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x20)



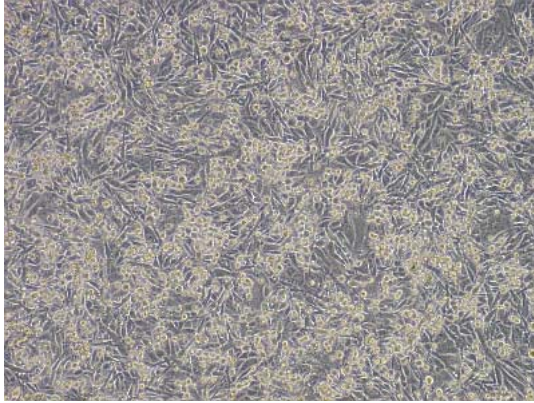
Resim 4.55: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10)



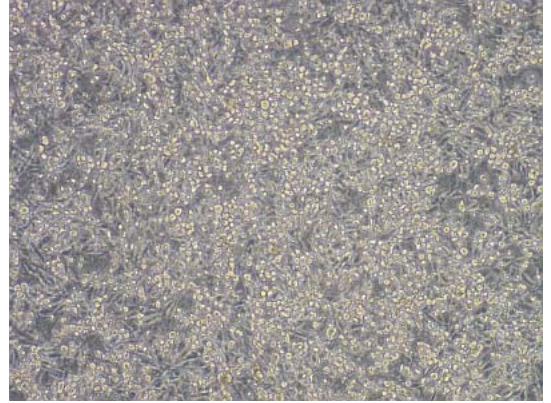
Resim 4.56: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10)



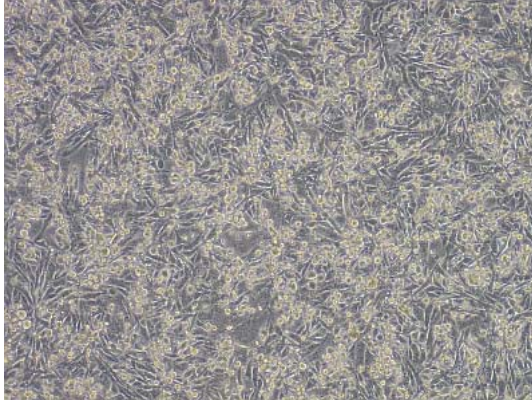
Resim 4.57: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10)



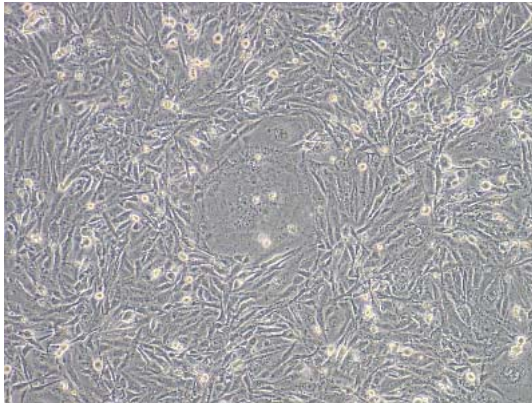
Resim 4.58: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)



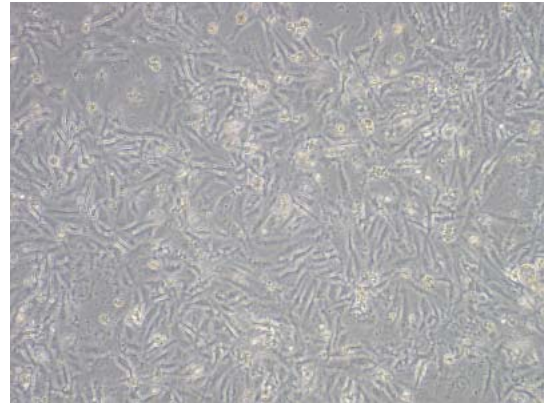
Resim 4.59: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)



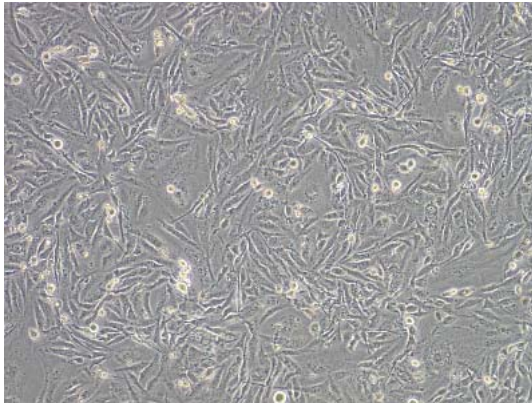
Resim 4.60: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)



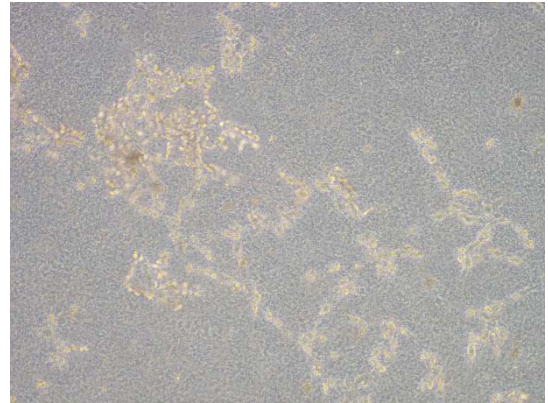
Resim 4.61: 72 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MDA-MB-231 hücreleri (x20)



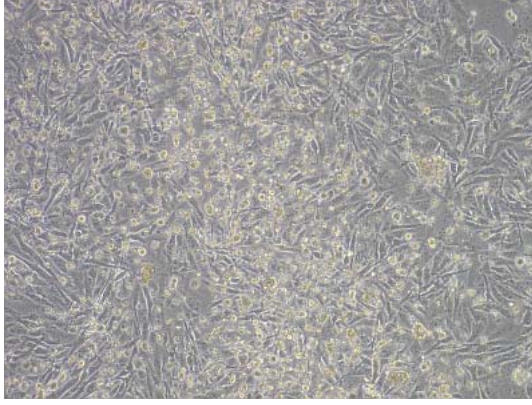
Resim 4.62: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10)



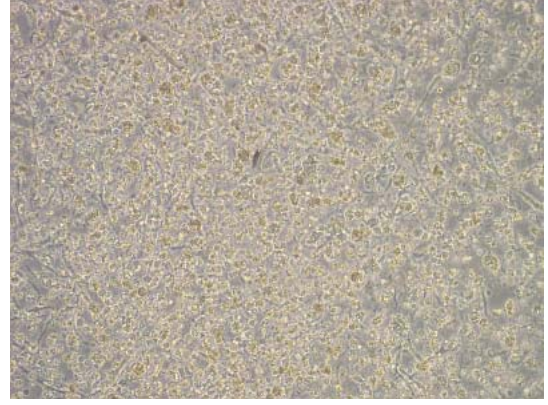
Resim 4.63: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 10)



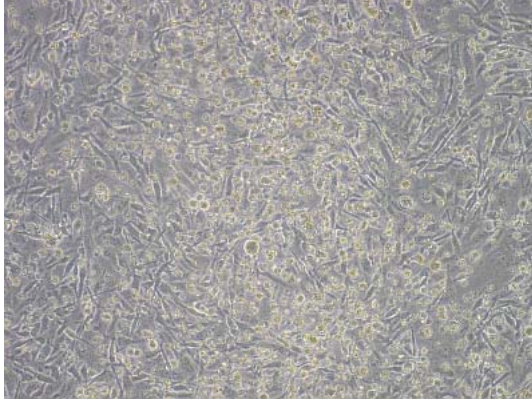
Resim 4.64: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (x 20)



Resim 4.65: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)



Resim 4.66: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)



Resim 4.67: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 72 saat sonra MDA-MB-231 hücreleri (10x)

4.3. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Sitotoksisite MTT ve ATP Canlılık Testi Bulguları

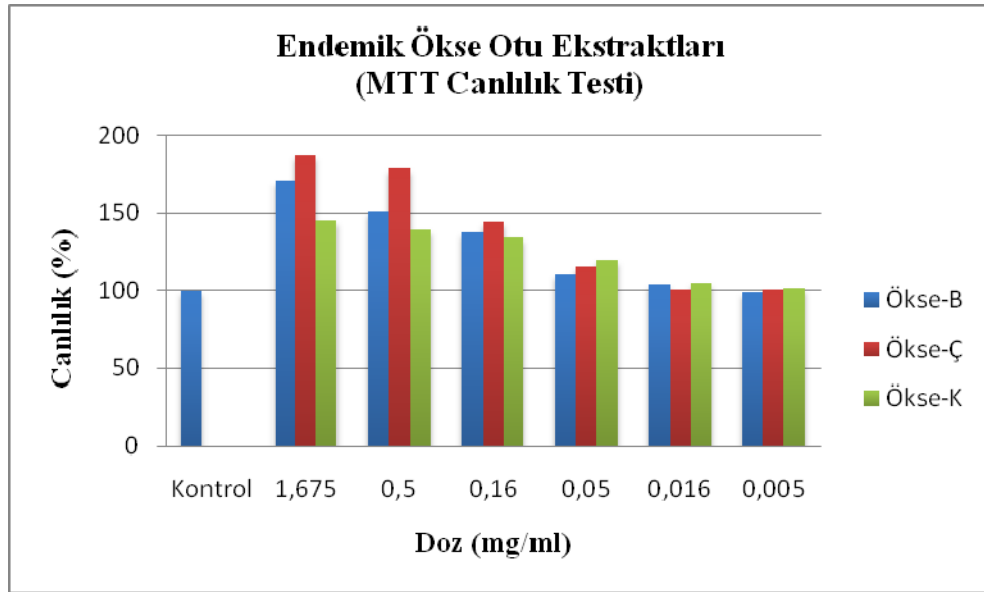
4.3.1. MTT metodu ile MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ökse otu ekstraktlarının, MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücelere endemik ökse otu ekstraktlarının altı farklı dozu 1.675, 0.50, 0.16, 0.05, 0.016, 0.05 mg/ml uygulandı. Üç ayrı plak'a ekilen hücre hatları 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ortaya çıkan % canlılıklar sırasıyla şekil 4.16, 4.17, 4.18'de gösterildi. MTT testi uygulamasından 24 saat sonra

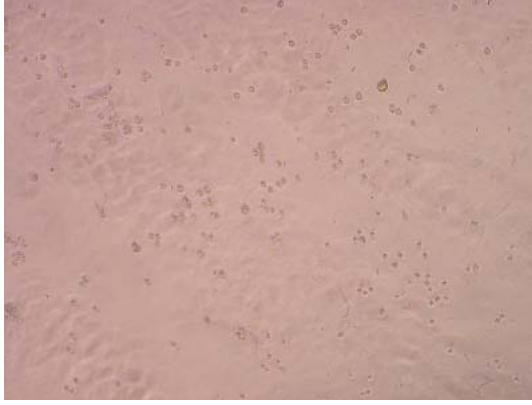
MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazan kristallerinin görüntüleri 10x ve 20x objektif ile inverted mikroskop altında fotoğraflandı.

4.3.1.1. 24 saatlik inkübasyon bulguları

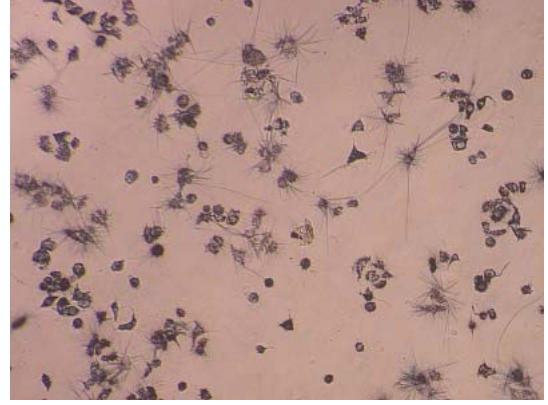
Hücelere 24 saat süreyle endemik ökse otu ekstraktları uygulandığında ortaya çıkan MTT sonuçları şekil 4.16'da gösterildi. Mikroskopik incelemede her üç ekstraktın da 1.675 ve 0.50 mg/ml dozlarının MCF-7 hücrelerinin büyümelerini tamamen engellediği gözlemlendi (resim 4.70, 4.71, 4.73, 4.74, 4.76, 4.77). Ökse-B ve Ökse-K'nın 0.16 mg/ml dozlarında % 50 büyümenin engellendiği, Ökse-Ç'nin aynı dozunda diğer iki ekstrakta oranla etkinin daha az olduğu gözlemlendi (resim 4.72, 4.75, 4.78). MTT canlılık testi sonuçlarında MDA-MB-231 hücreleri ile benzer şekilde 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarda interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu gözlemlendi (şekil 4.16).



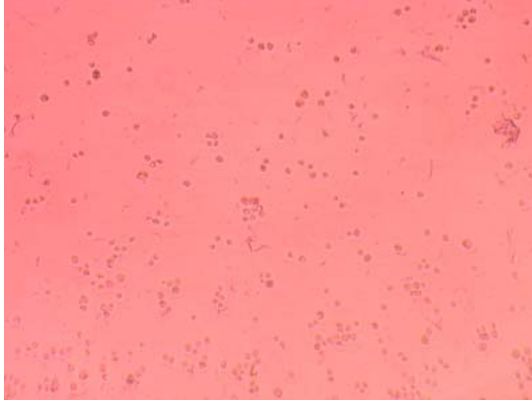
Şekil 4.16: Endemik ökse otu ekstraktlarının 24. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



Resim 4.68: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MCF-7 hücreleri (x10)



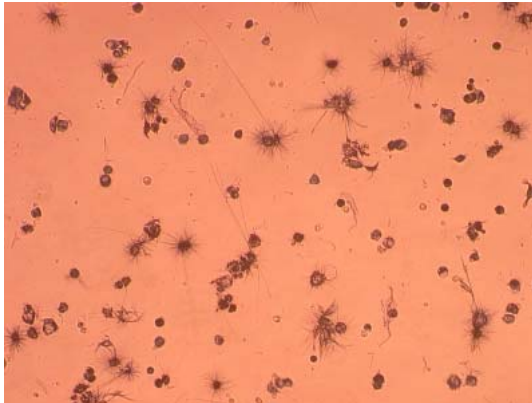
Resim 4.69: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



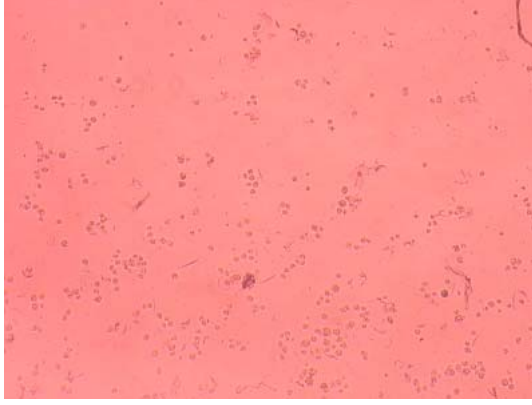
Resim 4.70: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



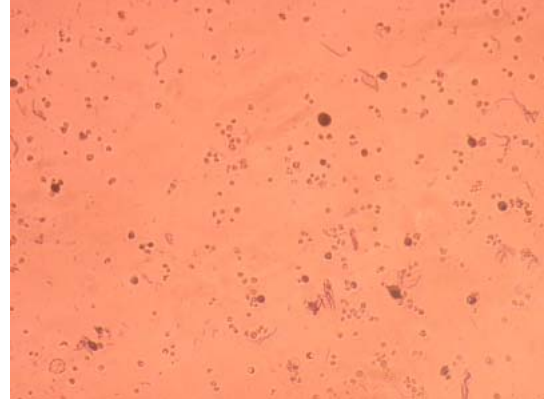
Resim 4.71: 0.5 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



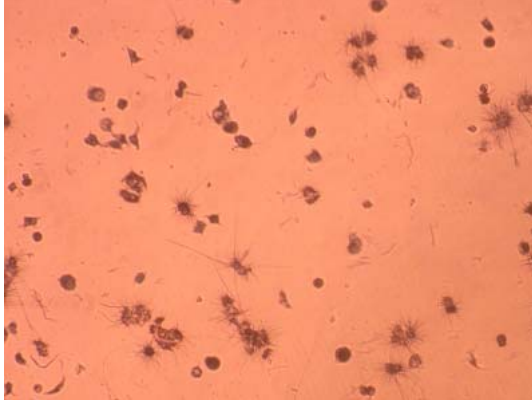
Resim 4.72: 0.16 mg/ml Ökse-B uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



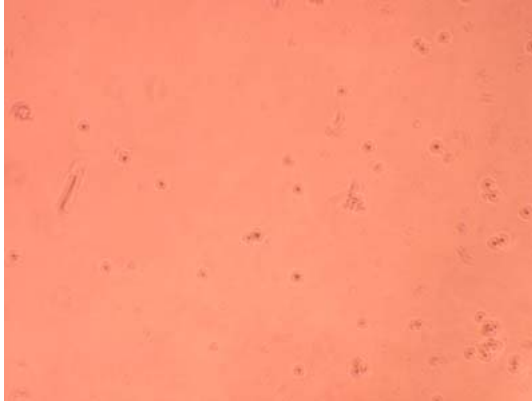
Resim 4.73: 1.675 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



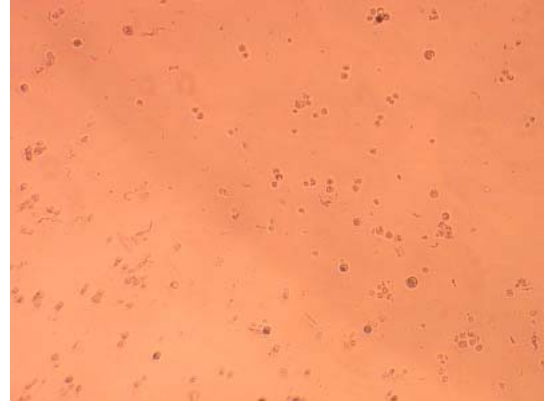
Resim 4.74: 0.5 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



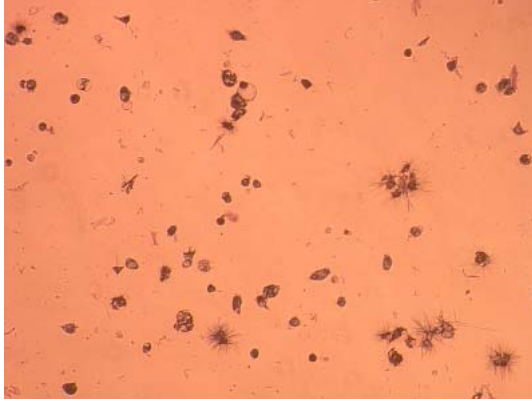
Resim 4.75: 0.16 mg/ml Ökse-Ç uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.76: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



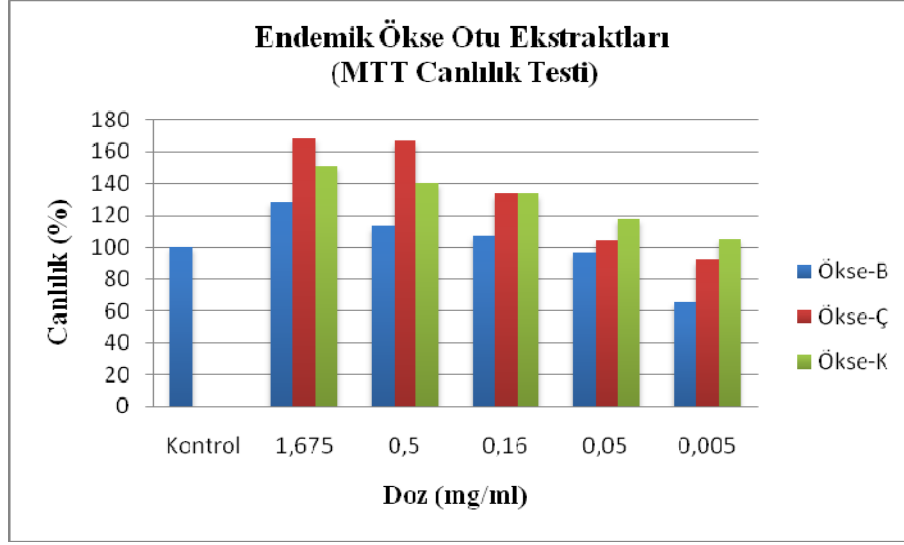
Resim 4.77: 0.5 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.78: 0.16 mg/ml Ökse-K uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

4.3.1.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları

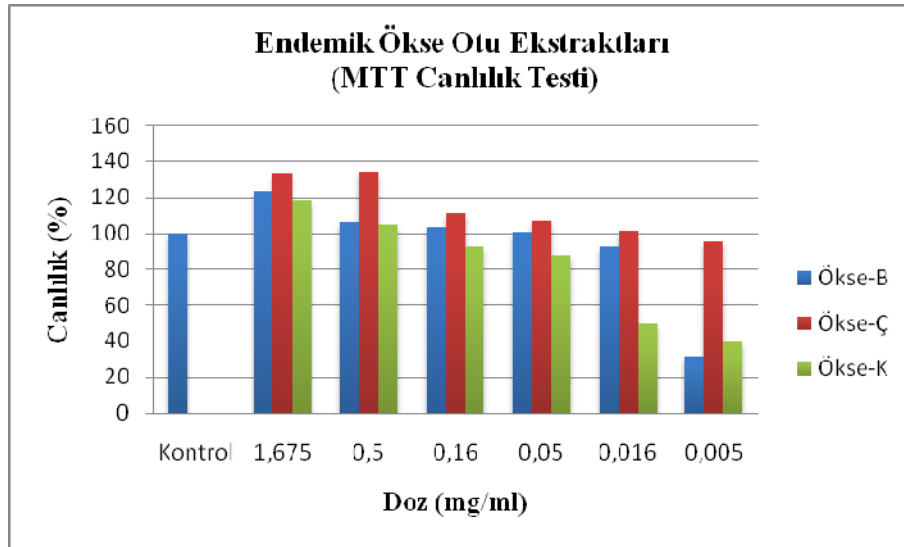
Ekstraktın uygulanmasından 48 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları Şekil 4.17’de gösterildi. Mikroskopik inceleme sonucu her üç ekstraktın 1.675 ve 0.50 mg/ml dozlarının MCF-7 hücrelerinin büyümelerini tamamen engellediği gözlenirken 0.16 mg/ml dozda 24 saatlik inkübasyon bulgularıyla orantılı olarak toksik etkinin biraz daha arttığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyona ait mikroskopik görüntülerde olduğu gibi her üç ekstraktın da 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarının uygulandığı kuyucukların taban yüzeyinde kirlilik ve tortu gözlemlendi. MTT sonuçlarına göre bu üç dozda toksik etki gözlenmesine rağmen yine interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla fazla olduğu gözlemlendi (şekil 4.17).



Şekil 4.17: Endemik ökse otu ekstraktlarının 48. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

4.3.1.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları

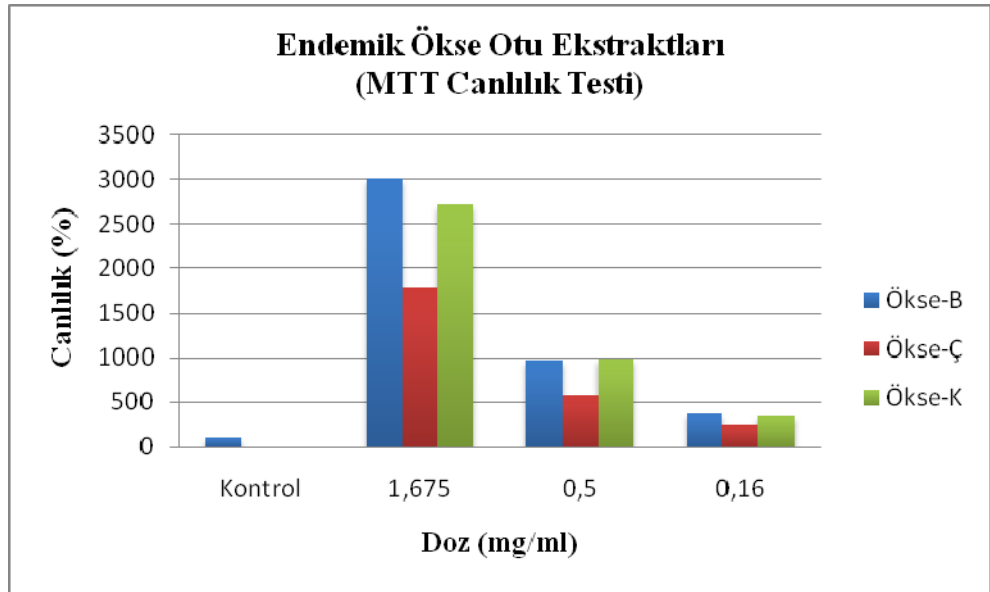
Uygulamadan 72 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 4.18'de gösterildi. Mikroskopik incelemede her üç ekstraktın 1.675, 0.50 ve 0.16 mg/ml dozlarının uygulandığı kuyucuklarda MCF-7 hücrelerinin büyümelerini tamamen engellediği gözlenirken kuyucuklarda kirliliğin daha da arttığı gözlemlendi. MTT sonuçlarına göre bu üç dozda yine interferanstan dolayı % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.18: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

4.3.1.4. İnterferansın Araştırılması

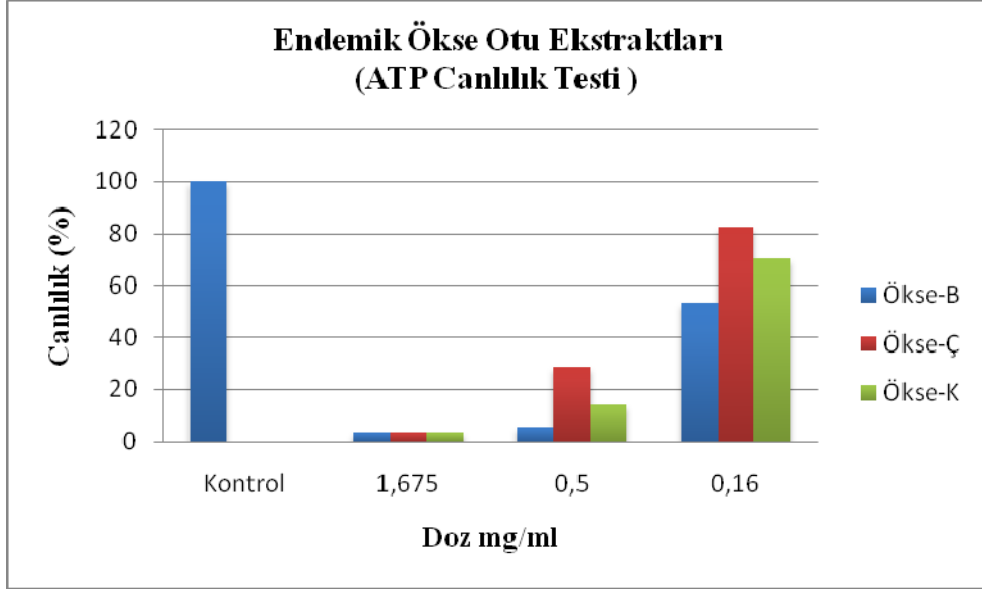
Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ökse otu ekstraktlarında 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sonucu MTT testinde % canlılığın kontrole oranla yüksek olmasının nedenini araştırmak amacıyla, hücre hattı ilave etmeden yalnız endemik ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu 1.675, 0.50, 0,16 mg/ml yeni bir plate uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Üç dozda yine % canlılığın kontrol hücrelerinden çok daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Endemik ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi.

4.3.2. ATP Canlılık Metodu ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Endemik Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ökse otu ekstraktlarının, MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. Yüksek üç dozu (1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml) uygulanan endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hatlarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 4.20'de gösterildi. Buna göre 1.675 mg/ml dozda üç endemik ökse otu ekstraktında sitotoksik etki gözlenirken, 0.50 mg/ml ve 0,16 mg/ml dozlarda Ökse-B'nin diğerlerine oranla daha sitotoksik olduğu gözlemlendi.



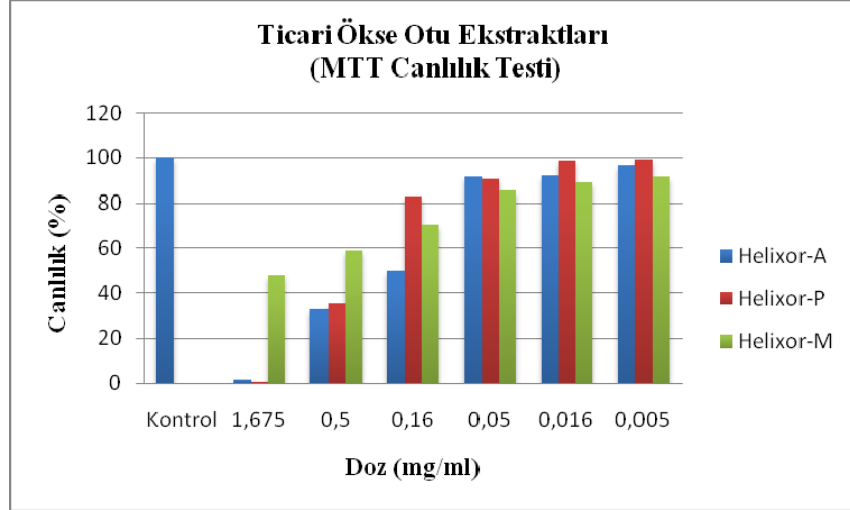
Şekil 4.20: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.

4.3.3. MTT metodu ile MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

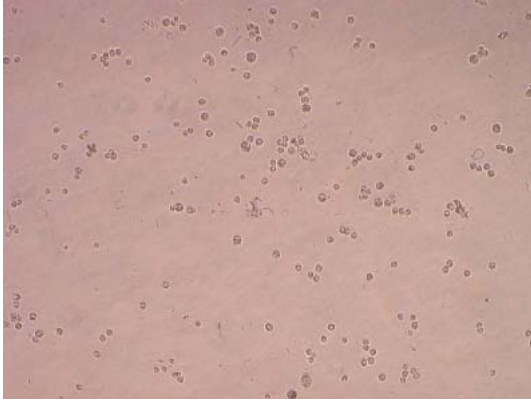
Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının, MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi yapıldı. Hücrelere ticari ökse otu ekstraktlarının altı farklı dozu 1.675, 0.50, 0.16, 0.05, 0.016, 0.05 mg/ml uygulandı. Üç ayrı plak'a ekilen hücre dizileri 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ortaya çıkan % canlılıklar sırasıyla şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'de gösterildi. Fotoğraflama işlemi 24. saatte MTT testi uygulamasından sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazan kristalleri 10x objektif ile inverted mikroskop altında yapıldı.

4.3.3.1. 24 Saatlik İnkübasyon Bulguları

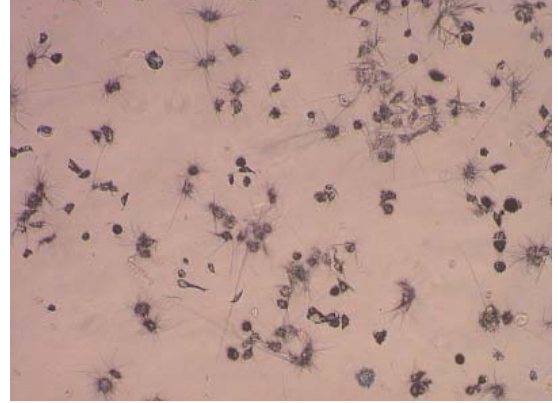
Hücrelere 24 saat süreyle ticari ökse otu ekstraktları uygulandığında ortaya çıkan MTT sonuçları şekil 4.21'de gösterildi. Mikroskopik incelemede ekstraktların MCF-7 hücrelerinin büyümelerini engellemediği (resim 4.81-4.89) gözlemlendiği halde MTT canlılık testi sonuçlarında özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21).



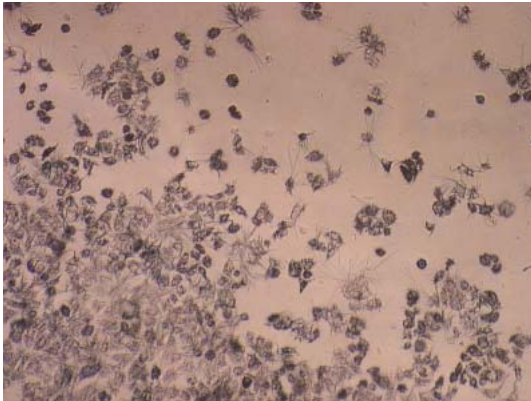
Şekil 4.21: Ticari ökse otu ekstraktlarının 24 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.



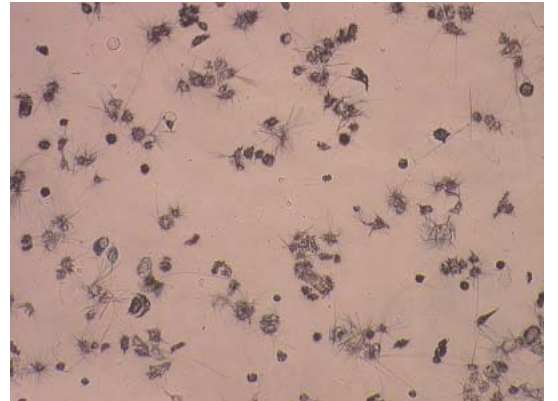
Resim 4.79: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum inhibisyon (MI) görülen kontrol MCF-7 hücreleri (x10)



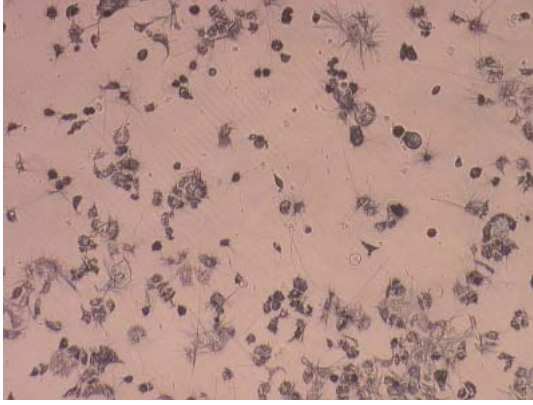
Resim 4.80: 24 saatlik inkübasyon sonunda maksimum canlılık (MO) görülen kontrol MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



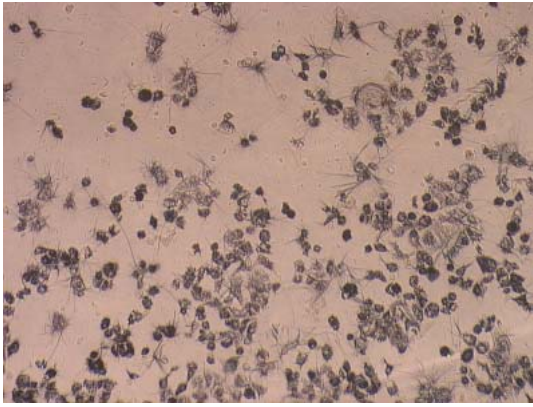
Resim 4.81: 1.675 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



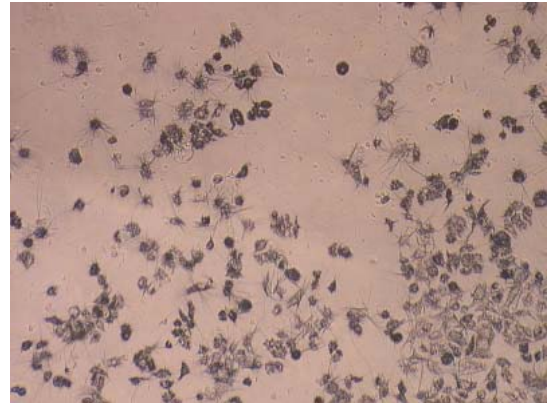
Resim 4.82: 0.5 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



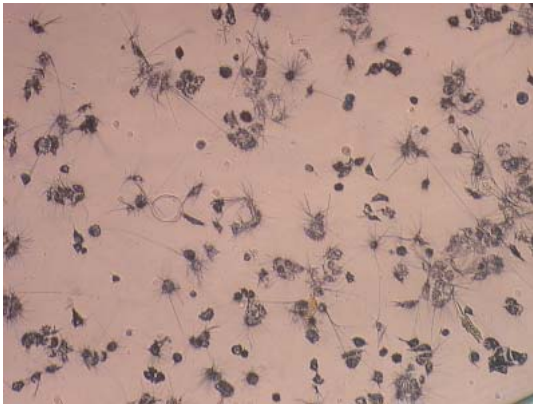
Resim 4.83: 0.16 mg/ml Helixor-A uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



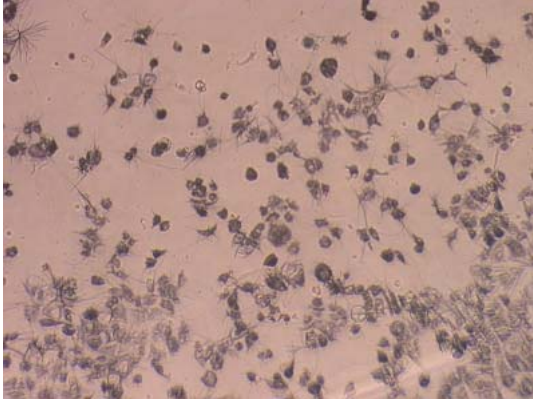
Resim 4.84: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



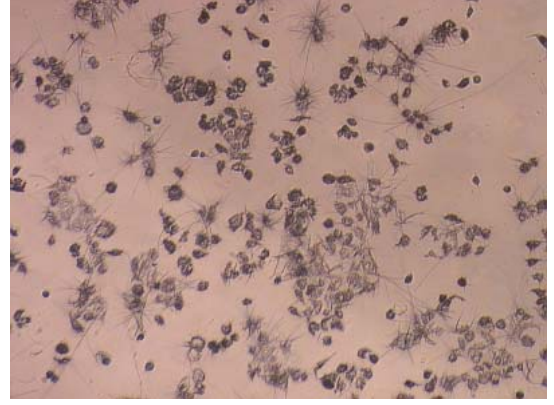
Resim 4.85: 0.5 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



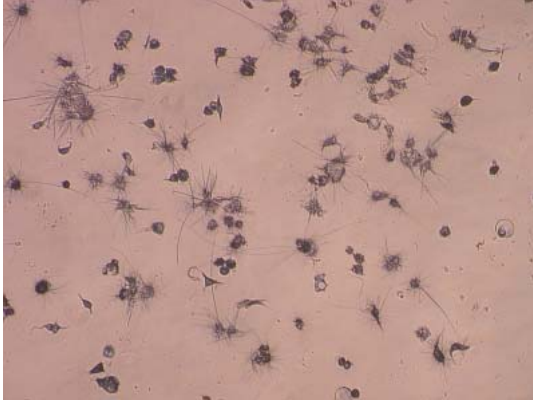
Resim 4.86: 0.16 mg/ml Helixor-P uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.87: 1.675 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



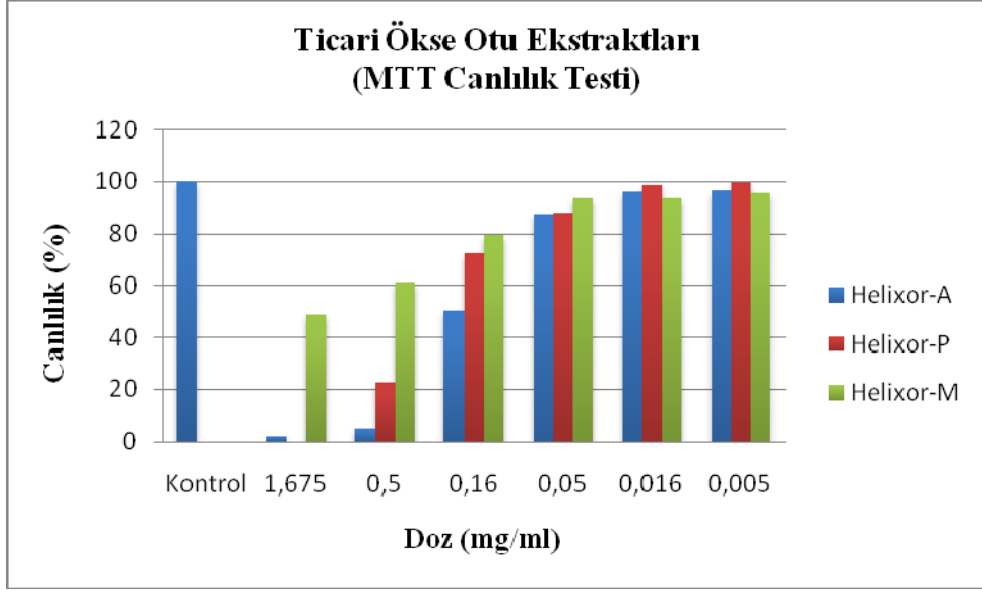
Resim 4.88: 0.5 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)



Resim 4.89: 0.16 mg/ml Helixor-M uygulamasından 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde gözlenen formazon kristalleri (x10)

4.3.3.2. 48 Saatlik İnkübasyon Bulguları

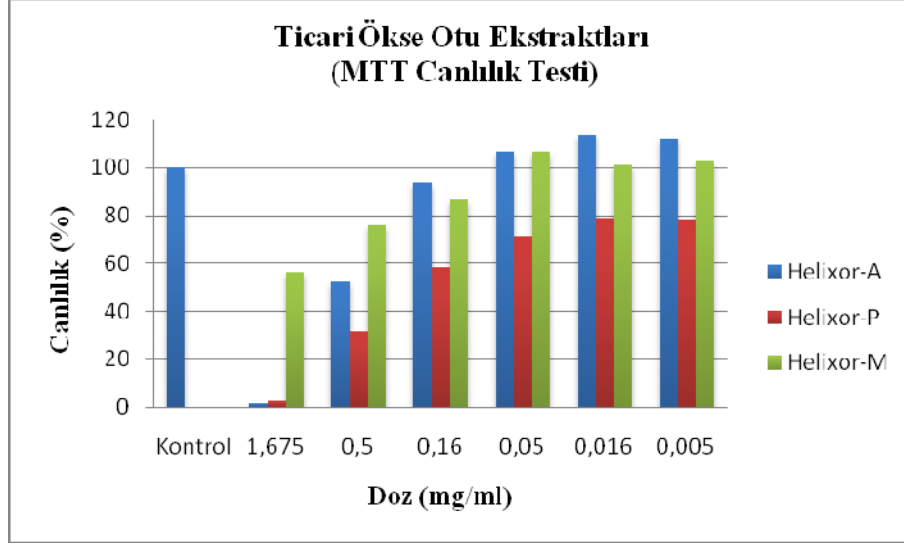
Ekstraktların uygulanmasından 48 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 4.22’de gösterildi. Mikroskopik inceleme sonucu yalnız Helixor-P’nin 1.675 mg/ml dozunda kontrole oranla hücre sayısında biraz azalma gözlenirken 24 saatlik inkübasyon sonrası MTT grafiğinde olduğu gibi her üç ekstraktın da özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (şekil 4.22).



Şekil 4.22: Ticari ökse otu ekstraktlarının 48 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

4.3.3.3. 72 Saatlik İnkübasyon Bulguları

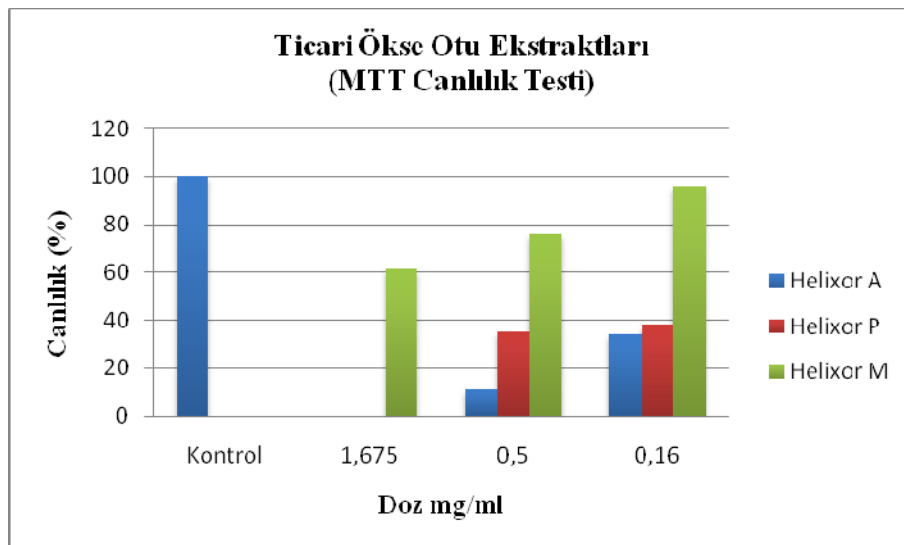
Uygulamadan 72 saat sonra ortaya çıkan MTT canlılık testi sonuçları şekil 23’de gösterildi. Mikroskopik incelemede her üç ekstraktın 1.675 mg/ml dozlarında ve Helixor-P’nin 0,5 ve 0,16 mg/ml dozunda diğer iki ekstrakta oranla hücre sayısında azalma gözlemlendi. 24 ve 48 saat sonraki MTT grafiğinde olduğu gibi her üç ekstraktın da özellikle 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında olmak üzere tüm dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (şekil 23).



Şekil 4.23: Endemik ökse otu ekstraktlarının 72 saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

4.3.3.4. İnterferansın Araştırılması

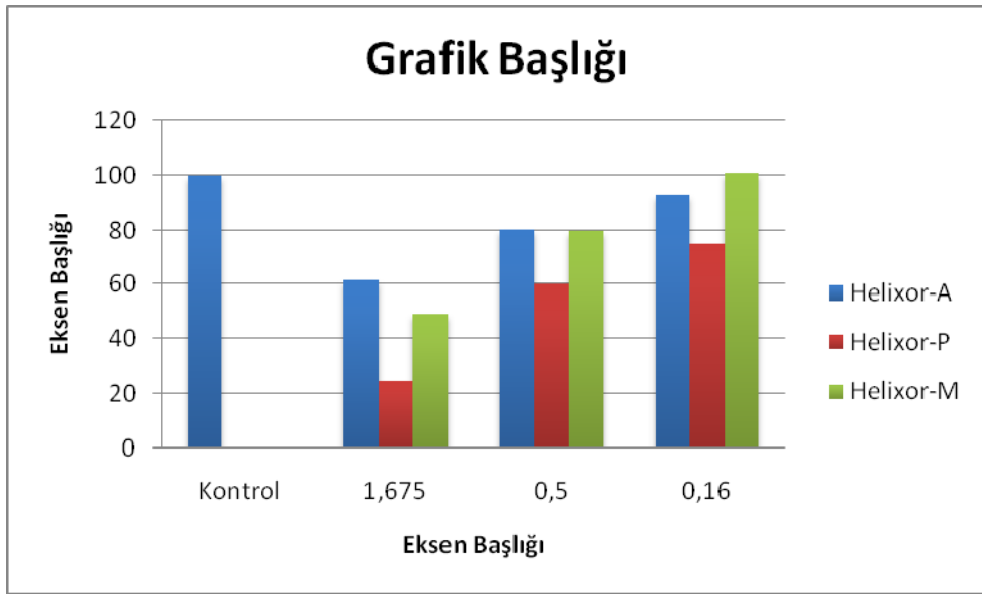
Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675, 0.50 ve 0,16 mg/ml dozlarında 24, 48 ve 72 saat sonrası MTT grafiğinde % canlılığın kontrole oranla düşük olmasının nedenini araştırmak amacıyla, hücre hattı ilave etmeden yalnız ticari ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu 1.675, 0.50, 0,16 mg/ml yeni bir plate uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Tüm ekstraktlarda üç dozda da % canlılığın kontrol hücrelerine oranla çok düşük olduğu gözlemlendi (şekil 4.24).



Şekil 4.24: Ticari ökse otu ekstraktlarının hücre ilave edilmeden 24 saat sonra MTT testi ile ölçülmesi.

4.3.4. ATP Canlılık Testi ile MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Ticari Ökse Otu Ekstraktlarının Etkileri

Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ticari ökse otu ekstraktlarının, MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan sitotoksik etkisini belirleyebilmek için ATP canlılık testi yapıldı. Yüksek üç dozu (1,675, 0,50 ve 0,16 mg/ml) uygulanan ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hatlarında intrasellüler ATP miktarına olan etkisi şekil 4.25’de gösterildi. Buna göre her üç dozda Helixor-P’nin diğerlerine oranla daha sitotoksik olduğu gözlemlendi.



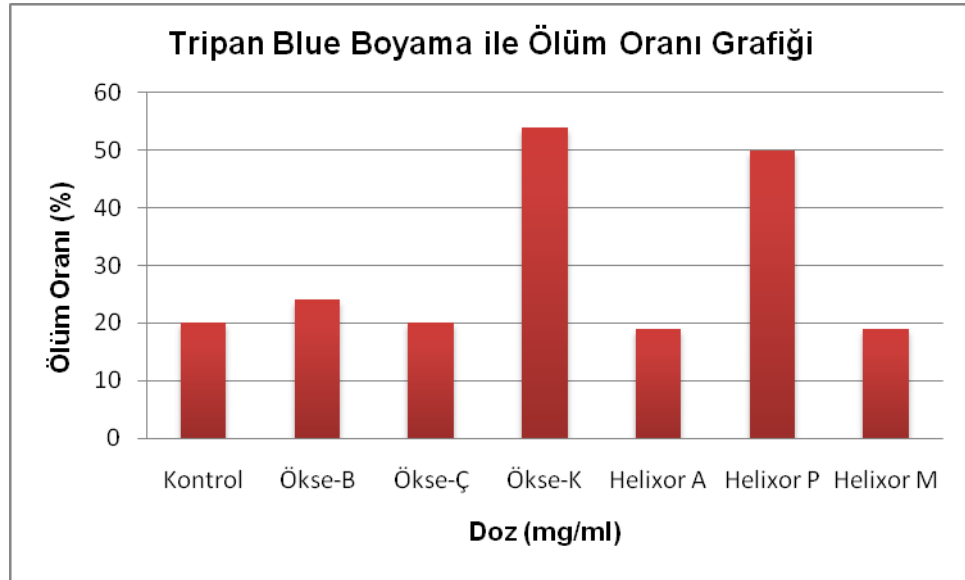
Şekil 4.25: Ticari ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin ATP testi ile gösterilmesi.

4.4. Ökse Otu Ekstraktlarının MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkilerinin Mikroskopta Tespiti

Ökse otu ekstraktlarının uygulanması ile gerçekleşen hücre ölümünün apoptozis veya nekrozis ile mi ortaya çıktığını belirlemek amacıyla hücre ölümü gözlenen MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücrelerinin mikroskopta tespiti için tripan blue ile boyama, ikili boyama (hoechst boya ve propidium iyodür) ve hematoksilen boyama yapıldı.

4.4.1. Tripan Blue Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarının canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT ve ATP canlılık testlerine ek olarak hücreler tripan blue ile boyandı. Hücelere endemik ve ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozu uygulandı ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Daha sonra boyanmış (ölü) ve boyanmamış (canlı) hücreler toma lamı üzerinde invert mikroskop yardımıyla sayılarak % ölüm oranları hesaplandı. Grafik (şekil 4.26) incelendiğinde Ökse-B, Ökse-Ç, Helixor-A ve Helixor-M ile muamele edilen hücrelerde % 20 oranında ölüm tespit edildi. Ökse-K ile muamele edilen hücrelerde ise ölüm oranı % 54 iken Helixor-P'de % 50 bulundu.



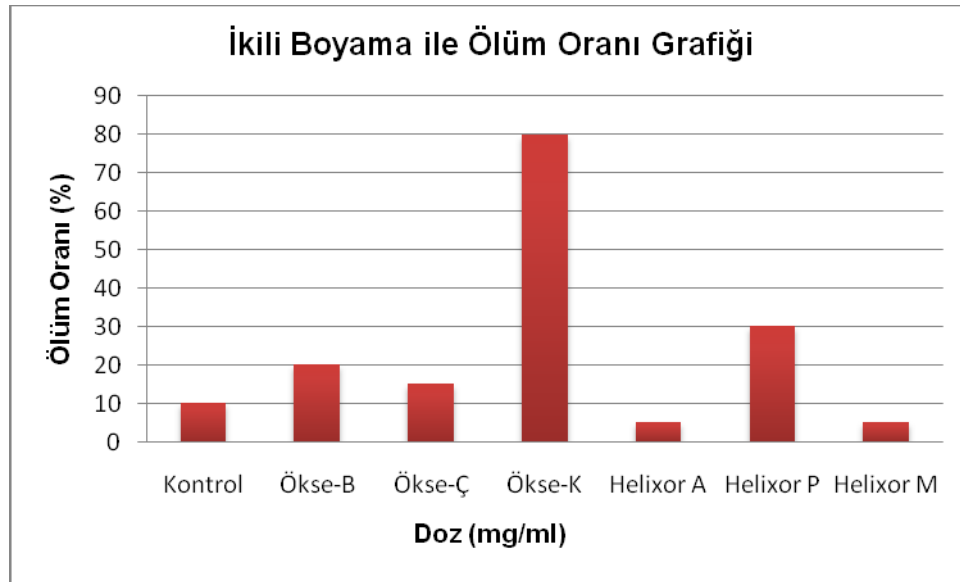
Şekil 4.26: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre soyu üzerine olan etkisinin tripan blue boyaması ile gösterilmesi.

4.4.2. İkili Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

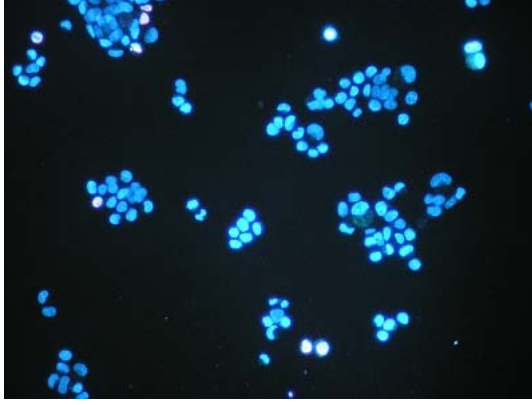
Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozunun uygulandığı MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarında 72 saat sonunda canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen Hoechst boyası ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya propidium iyodür beraber kullanıldı. Nukleusları

Hoechst boyasıyla mavi renk boyanmış canlı ve ölü hücreler ile nukleusları propidium iyodür boyasıyla kırmızı renk boyanmış ölü hücreler floresan mikroskobunda sayılarak % ölüm oranları hesaplandı, grafik şekil 4.27’de gösterildi. Boyanan hücrelerin fotoğraflanması 10x ve 20x objektif ile floresan mikroskobu altında yapıldı (resim 4.92-4.97).

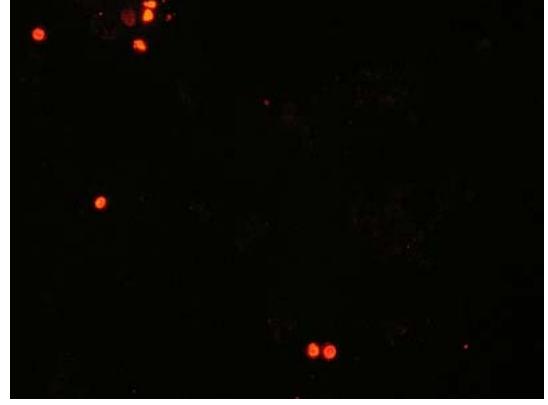
Sonuçlar incelendiğinde ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor A ve Helixor M’nin uygulanan dozlarında endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-B ve Ökse-Ç’ye oranla ölüm yüzdeleri daha düşük gözlemlendi. Ökse-K (%80) uygulanan hücrelerde ise Helixor-P (%30) uygulanan hücelere oranla ölüm yüzdesi çok daha fazla bulundu (Şekil 4.27).



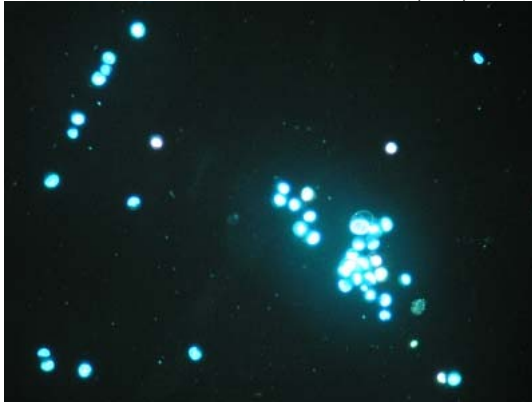
Şekil 4.27: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin ikili boyama ile gösterilmesi.



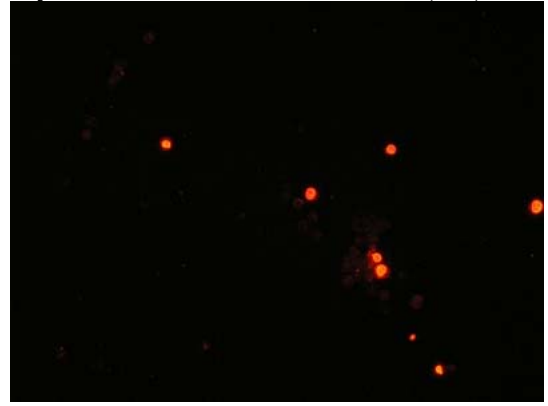
Resim 4.90: Hoechst ile 72 saat sonra boyanan canlı ve ölü kontrol MCF-7 hücreleri (10x)



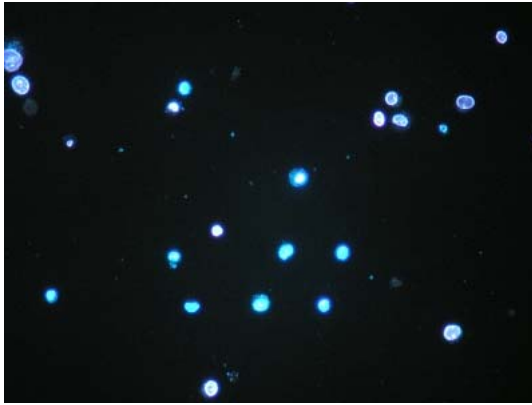
Resim 4.91: Propidium iyodür ile 72 saat sonra boyanan ölü kontrol MCF-7 hücreleri (10x)



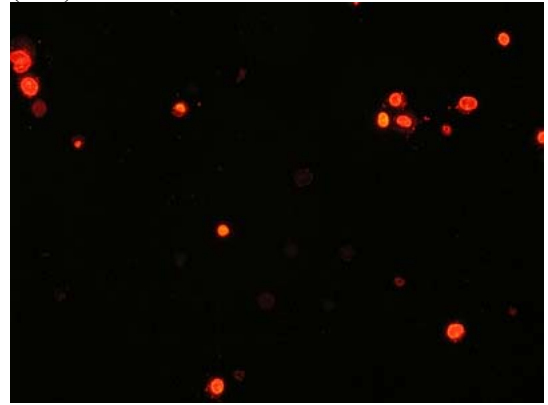
Resim 4.92: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x)



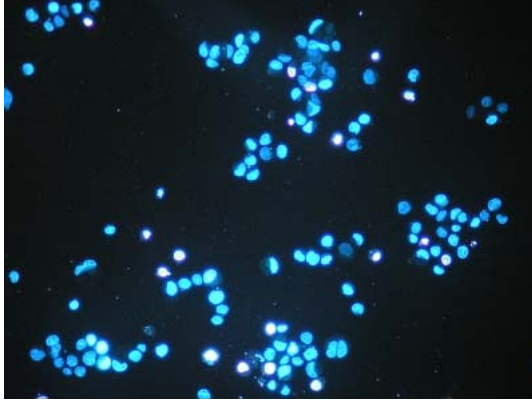
Resim 4.93: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MCF-7 hücreleri (10x)



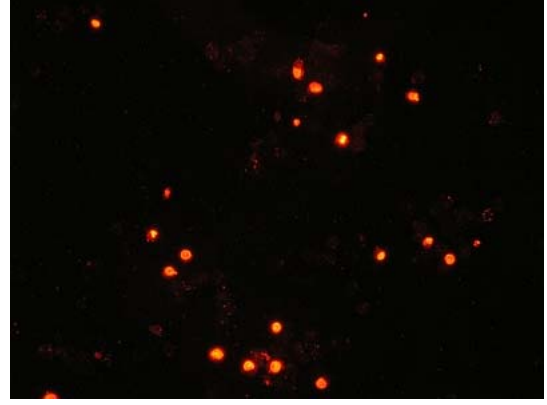
Resim 4.94: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x)



Resim 4.95: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü MCF-7 hücreleri (10x)



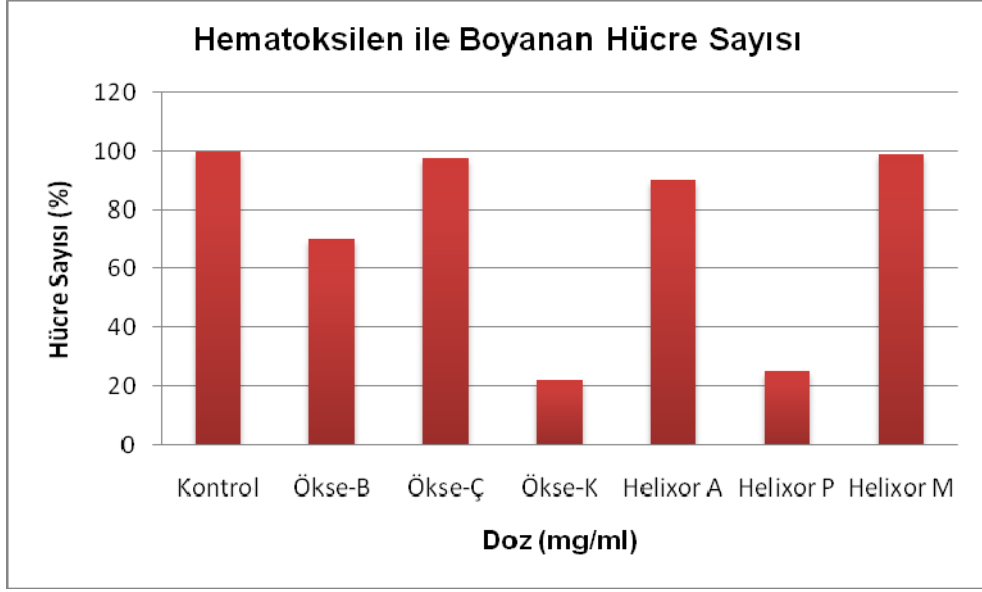
Resim 4.96: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hoechst ile boyanan canlı ve ölü MCF-7 hücreleri (10x)



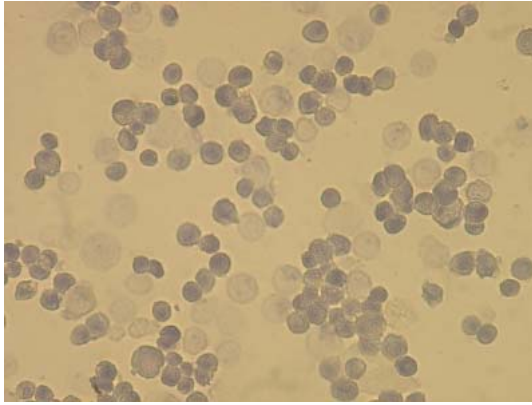
Resim 4.97: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Propidium iyodür ile boyanan ölü - MCF-7 hücreleri (10x)

4.4.3. Hematoksilen Boyama ile Hücre Ölümünün Tespiti

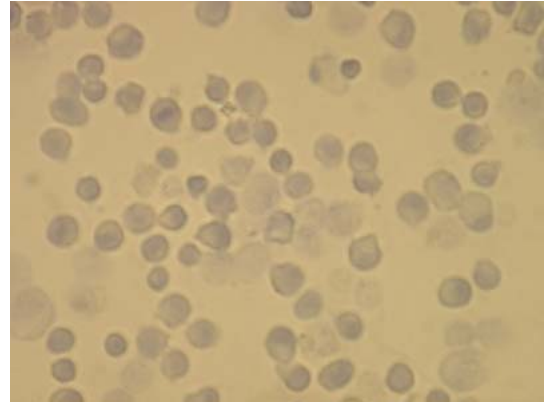
Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K endemik ve Helixor A, Helixor P ve Helixor M ticari ökse otu ekstraktlarının 1.675 mg/ml dozu uygulanan MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücrelerinin 72 saat sonunda morfolojilerini incelemek amacıyla hematoksilen boyama yapıldı. Nükleusları düzgün ve mavi renk boyanmış hücreler ışık mikroskopunda sayılarak % oranları hesaplandı, grafik şekil 4.28’de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre, endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-Ç ve ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor M’nin uygulanan dozlarında kontrol hücrelerine oranla hücre sayısında bir değişiklik gözlenmezken Ökse-B’de Helixor-A’ya oranla hücre sayısının azaldığı, bu azalmanın özellikle Ökse-K ve Helixor-P’de çok fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca Ökse-B, Ökse-Ç, Helixor A ve Helixor M ekstraktlarının uygulandığı hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla hücre morfolojilerinde değişim gözlenmedi. Ökse-K uygulanan hücrelerde yoğunluğun çok azaldığı, bazı hücrelerin çok fazla parçalandığı hatta nükleuslarının olmadığı, olan nükleuslarında küçük olduğu gözlemlendi. Helixor-P uygulanan hücrelerde ise yoğunluğun azaldığı ve nükleusların kontrole benzediği gözlemlendi (resim 4.99-101).



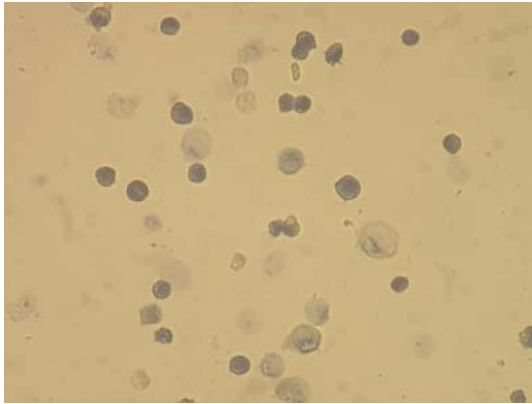
Şekil 4. 28: Ökse otu ekstraktlarının 72. saatte MCF-7 hücre hattı üzerine olan etkisinin hematoksilin boyama ile gösterilmesi.



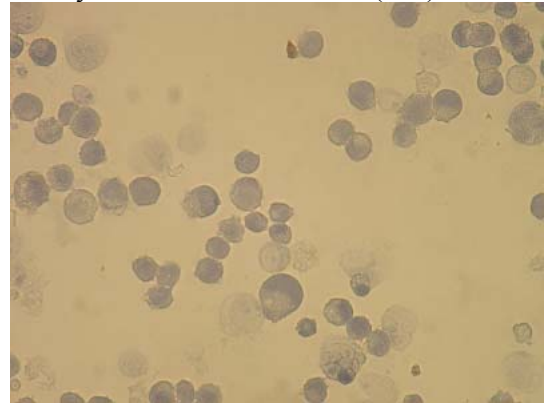
Resim 4.98: Hematoksilin ile 72 saat sonra boyanan kontrol MCF-7 hücreleri



Resim 4.99: 1.675 mg/ml Ökse-B uygulamasından 72 saat sonra Hematoksilin ile boyanan MCF-7 Hücreleri (20x)



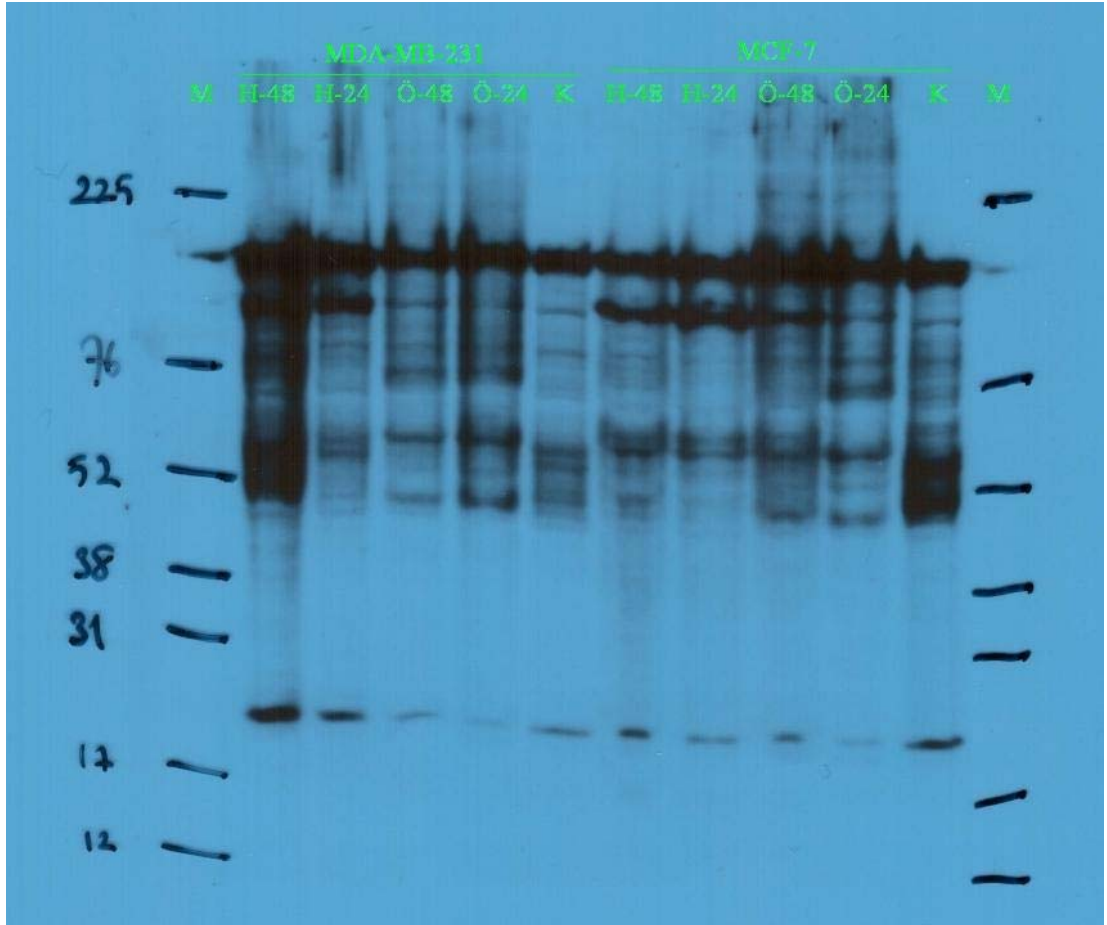
Resim 4.100: 1.675 mg/ml Ökse-K uygulamasından 72 saat sonra Hematoksilin ile boyanan MCF-7 Hücreleri (20x)



Resim 4.101: 1.675 mg/ml Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra Hematoksilin ile boyanan MCF-7 Hücreleri (10x)

4.5. Ökse Otu Ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Apoptotik Etkinin Western Blot Metodu ile Tespiti

Ökse-K endemik ve Helixor-P ticari ökse otu ekstraktlarının 24 ve 48 saat süreyle 1.675 mg/ml dozu uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücre hatlarında apoptotik etkiyi incelemek amacıyla western blot metodu yapıldı. MDA hücre hatlarında yalnız Helixor-P uygulananlarda 116 kDa molekül ağırlığındaki PARP'ın kırılarak 89 kDa ağırlığında band oluşturduğu gözlemlendi. MCF hücre hatlarında ise Helixor-P uygulananlarda ve 48 saat süreyle Ökse-K uygulananlarda PARP'ın kırılarak aktive olduğu tespit edildi.



Şekil 4.29: Ökse-K ve Helixor-P ökse otu ekstraktlarının 24 ve 48 saat süreyle uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri hücre hatları üzerine apoptotik etkilerinin western blot metodu ile gösterilmesi.

M: Marker, K: Kontrol, Ö-24: Ökse-K 24 saat uygulama, Ö-48: Ökse-K 48 saat uygulama, H-24: Helixor-P 24 saat uygulama, H-48: Helixor-P 48 saat uygulama

5. TARTIŞMA

Her yıl 1.2 milyon kişiyi etkileyen meme kanseri, kadınlarda en sık rastlanan kanser tipidir. Meme kanserinin sık görülmesi, sıklığının giderek artması, erken evrelerde teşhis ve tedavi edilebilir olması, meme kanserinin önemini daha da arttırmaktadır (Parkin 2002). Meme kanserinin erken evresinde tedavilerde gözlenen ilerlemelere karşın birçok kadında hastalık tekrar etmekte ve metastaz oluşmaktadır. Metastatik hastalıkta uygulanan tedavi stratejileri sınırlı olmakla birlikte asıl odak nokta medikal tedavi yöntemidir. Klasik tedavi yöntemlerinin kanser tedavisindeki önemi tartışılmazdır (Aggarwal and Shishir 2006). Ancak kanser vakalarının sayısının artışı ve kullanılan ilaçlara karşı direnç, yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine duyulan ihtiyacı artırmaktadır. Geleneksel tedavilerde başarı sınırlı olduğundan, kanser hastalarının çoğu komplementer ve alternatif tıptan köken alan tedavileri denemektedir. *Viscum album* preparatları komplementer/ alternatif kanser terapisinin en sık kullanılan formudur. Bu preparatlar sıklıkla standart kemoterapi yada radyoterapi ile birlikte adjuvan tedavi protokollerinde kullanılır. Post-operatif tedaviyle birlikte kombine tedavi hastanın yaşam kalitesini artırır ve meme kanserli hastalarda nüksetme aralığını artırır (Eggenschwiler et al., 2007).

Ökse otu ile ilgili 1926'dan bu yana çok sayıda çalışma yapılmış ve Avrupa'da preparatları kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar, ökse otu ekstraktlarının kültüre edilmiş insan tümör hücrelerinin apoptotik yolla ölümlerini indüklediğini ve immün sistemi uyardığını göstermektedir (Park et al.,2000).

Apoptozisi indüklemesi ve bu yolla hücrenin apoptotik ölümüne neden olması bakımından ökse otunun kanser tedavisinde önemi büyüktür. Pürifiye edilmiş lektin II'nin insan akciğer kanser hücresi A549'da doxorubicin, sisplatin ve taxol gibi standart kanser ilaçları ile kombine edilerek sitotoksik etkisi araştırılmış, çalışma sonucunda, ökse otunun sitotoksitenin artırılması yönünde kullanılabilceği belirtilerek ökse otu terapisi için yeni klinik bir bakış açısı önerilmiştir (Siegle et al.,2001).

Bu çalışmada, endemik ökse otunun alt türlerine ait tüm bitki ekstraktları olan Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K ekstraktlarının, MDA-MB-231 östrojen reseptörü negatif

ve MCF-7 östrojen reseptörü pozitif olan iki farklı meme kanseri hücre hattı üzerine apoptotik etkisi araştırıldı. Bu etki, Almanya’da ticari olarak üretilen ve tedavi amacıyla kullanılan aynı alt türlere ait Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ekstraktları’nın etkileri ile karşılaştırıldı.

Ökse otu ekstraktlarının kanser hücreleri üzerine olan sitotoksitelerini değerlendirmek için çok sık kullanılan ve aynı zamanda ucuz olan, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesini ölçen, kolorimetrik bir yöntem olan MTT metodu bu çalışmada da öncelikle tercih edildi. Ekstraktların MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında büyümeye etkileri incelenip, yüzde canlılıkları hesaplandı.

Khil et al., (2007) kore ökse otu lektininin kolon kanseri, epidermal kanser ve normal hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi MTT metodu ile araştırılmıştır. Lektinin 10, 25, 50 ve 100 ng/ml dozlarının 24 saat süreyle uygulandığı hücre hatlarında zaman ve doza bağlı olarak en güçlü sitotoksik etkinin kolon kanseri hücrelerine olduğu, epidermal kanser hücreleri üzerine ise bu etkinin az olduğu normal hücreler üzerine ise etkinin olmadığı bulunmuştur.

Zuzak et al.,(2006) Sekiz farklı ağaç (Iscucin Abietis, Pini, Populi, Mali, Salicis, Crataegi, Quercus and Tiliae) üzerinden toplayarak hazırladıkları ökse otu ekstraktlarının dört farklı medullablastoma hücre hattı (Daoy, D342, D425 and UW-288-2) üzerine sitotoksik etkilerini MTT metoduyla incelenmiş ve önemli ölçüde büyüme inhibisyonuna neden olduklarını bulmuşlardır. Bu inhibisyonun kullanılan ökse otu ekstraktlarının lektin içerikleri ile doğru orantılı olduğu ve ölüm şekillerinin apoptozisizle gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Knöpfl-Sidler et al., (2005)’nın yaptıkları bir araştırmada, Iscador M (20 mg/ml), Iscador Q (20 mg/ml) ve Abnobaviscum Fraxini -2 (20 mg/ml) ticari ökse otu ekstraktlarının HELA-S3, MOLT-4, MFM-223, COR-L51, KPL-1 and VM-CUB1 tümör hücre hatlarında önemli ölçüde büyüme inhibisyonuna neden olduklarını MTT metodu ile tespit etmişlerdir. Hücre proliferasyonu ve mitokondriyal aktivite yönünden değerlendirildiğinde Abnobaviscum Fraxini’nin diğer iki ekstrakta oranla daha güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Viscotoksin ve lektinler izole edilerek uygulandıklarında tüm bitki ekstraktlarından daha az etkili oldukları vurgulanmıştır. Zarković et al. (1998) bu bulguyu desteklemektedir. İzole lektin-I ve

tüm ökse otu ekstraktı İsoresel'in B16F10 melanoma hücre hatları üzerine büyüme etkileri kıyaslandığında İsoresel'in lektinden daha etkili olduğu MTT metodu ile gösterilmiş hatta bu etki, farelere B16F10 melanoma hücre hatları enjekte edilerek oluşturulan kanser modellerinde tümör nodüllerinin sayısının azalması ile de desteklenmiştir.

MTT testi kullanılarak ökse otu ekstraktlarının kanser hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerini gösteren benzer çalışmalar yapılmıştır. (Hunziker-Basler et al., 2007, Eggenschwiler et al., 2006, Urech et al., 2006, Styczynski and Wysocki 2006, Kim et al., 2004, Kong et al., 2004).

Çalışmamızda, MTT canlılık metoduna göre endemik ökse otu ekstraktlarının uygulanan yüksek üç dozunda (1.675, 0.50, 0.16 mg/ml) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde tüm uygulama saatlerinde sitotoksik etki gözlenirse de gözlenmese de % canlılığın kontrole oranla çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Bunun üzerine hiç hücre hattı ilave etmeden yalnız endemik ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu (1.675, 0.50, 0.16 mg/ml) yeni bir plate uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Üç dozda yine % canlılığın kontrol hücrelerinden çok daha fazla olduğu bulundu (Pozitif yönde interferans). Ticari ökse otu ekstraktlarında ise tam tersi bir durum gözlemlendi yani ticari ökse otu ekstraktlarının uygulanan yüksek üç dozunda (1.675, 0.50, 0.16 mg/ml) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde sitotoksik etki gözlenmese de tüm uygulama saatlerinde % canlılığın kontrole oranla çok daha düşük olduğu tespit edildi. Endemik ökse otu ekstraktlarında olduğu gibi hiç hücre hattı ilave etmeden yalnız ticari ökse otu ekstraktlarının yüksek üç dozu (1.675, 0.50, 0.16 mg/ml) yeni bir plate uygulanarak MTT canlılık testi yapıldı. Üç dozda yine % canlılığın kontrole oranla çok daha düşük olduğu gözlemlendi (Negatif yönde interferans). Her iki durumda bitki içeriğinin, MTT metodu için kullanılan SDS ve MTT ile kimyasal etkileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu etkileşimden dolayı MTT sonuçları ile mikroskopik inceleme sonuçları da birbirinden farklıdır. Özellikle üç endemik ökse otu ekstraktının 1.675 ve 0.50 mg/ml dozlarında MCF-7 hücrelerinin büyümelerini ilk 24 saatte % 90 oranında engellediği mikroskopta tespit edildiği halde MTT sonuçlarına göre aynı dozlarda % canlılığın kontrol hücrelerinden % 50-80 oranında daha fazla olduğu gözlemlendi. Ökse-K'nın

1.675 mg/ml dozu uygulanan MDA-MB-231 hücre hatlarında, endemik ökse otu ekstraktlarının ilk sitotoksik etki 48 saat sonunda görüldüğü halde MTT sonucuna göre % 93 oranında canlılık tespit edilmektedir. Ticari ökse otu ekstraktlarında ise tam ters yönde MTT sonuçları ile mikroskop görüntüleri uyumsuzluk göstermektedir. Ticari ökse otu ekstraktlarının uygulanan dozlarında her iki hücre hattında da mikroskop görüntülerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda hiç hücre ölümü gözlenmezken, MTT sonuçlarında canlılığın % 1-50 arasında değiştiği görülmektedir.

İnterferanstan dolayı hem endemik hem de ticari ökse otu ekstraktlarında MTT sonuçları ile mikroskopik görüntülerin farklılık göstermesi nedeniyle ökse otu ekstraktlarının sitotoksik etkisini doğrulamak için 72 saatlik inkübasyon sonunda ATP canlılık testi yapıldı. Hücre içerisindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanan, yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olan ATP-TCA metodunda, canlı hücrelerdeki ATP'nin lusiferin ile reaksiyonunu takiben ortaya çıkan luminesan ışımının ölçümüne dayanmaktadır. Oluşan ATP canlı hücre sayısı ile direkt orantılı bir değerdir (Andreotti et al.,1995).

ATP canlılık metoduna göre, MDA-MB-231 hücre hattında endemik ökse otlarından Ökse-K'nın 1.675 ve 0.50 mg/ml dozlarda Ökse-B'ye oranla, ticari ökse otlarında ise Helixor-P'nin aynı dozlarda Helixor-A'ya oranla daha sitotoksik olduğu bulundu. MCF-7 hücre hattında ise endemik ökse otlarından Ökse-B'nin Ökse-K'ya oranla, ticari ökse otlarında ise Helixor-P'nin diğer iki ekstrakta oranla daha sitotoksik olduğu görüldü.

MDA-MB-231 hücre hattı için tripan blue, ikili boyama ve hematoksilen boyama sonuçları ATP canlılık testi ile benzer sonuçları verirken, MCF-7 hücre hattında farklılık gözlenmektedir. Her üç boyama sonucu da endemik ökse otlarından Ökse-K'nın sitotoksik etkisinin, Ökse-B'den daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum hücrelerin, ATP canlılık testinin yapıldığı 96 kuyucuklu platelerdeki 0,37 cm²'lik büyüme alanındaki davranışı ile boyamalar için kullanılan daha geniş yüzey alanına sahip 6 kuyucuklu platelerdeki 9,46 cm²'lik büyüme alanındaki davranışı ile fark olduğunu göstermektedir. Bu farklılık ticari ökse otu ekstraktlarının, MDA-MB-231 hücreleri üzerine etkisini incelemek için yapılan hematoksilen boyamada 24 ve

72 saatlik inkübasyon sonunda 6 kuyucuklu plateler fotoğraflanmıştır. Şekil.. 'de görüldüğü gibi her üç Helixor'un etkisi 24. saatte başlarken MTT testi için ekim yapılan 96 kuyucuklu platelerde Helixorların sitotoksik etkisi 72. saatte görülmüştür (Şekil).

Hücre ölüm şeklinin belirlenmesinde ikili boyama ve hematoksilen boyama birlikte değerlendirildi. Hematoksilen boyamada MDA-MB-231 hücre hatlarında endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-K uygulananlarda ve ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor-P uygulananlarda hücre membranlarının parçalandığı gözlemlendi. İkili boyama sonuçları değerlendirildiğinde, 1.675 mg/ml Ökse-K uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde propidium iyodür ile boyanan ölü hücre sayısı Helixor-P uygulananlara oranla daha fazla olduğu görülmektedir. İkili boyamada propidium iyodürün, membran bütünlüğü bozulan hücrelerin dolayısıyla nekrozla ölen hücrelerin nükleuslarını boyadığı bilinmektedir. Hücre kültürü ortamında apoptoza giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları bütünlüğünü korumasına rağmen ileri dönemlerde *in vivo* ortamdaki gibi etrafındaki makrofajlar tarafından fagosite edilemeyeceklerinden sekonder nekroz gelişir. Böylece membran bütünlükleri bozulduğu için hücreler non-vital boyalarla (propidium iyodürle) boyanma özelliği kazanmaya başlar (Ulukaya 2003). Bu nedenle ikili boyamada Ökse-K ve Helixor-P uygulamasından 72 saat sonra propidium iyodür ile boyanan ölü MDA-MB-231 hücrelerinin ölümünün nekrozdan mı yoksa sekonder nekrozdan mı olduğu bilinmemektedir. Bu durumun uygulama süresinin uzun olmasından kaynaklandığına karar verilmiştir. Benzer durum MCF-7 hücre hattıyla yapılan çalışmalar içinde geçerlidir. Mevcut uygulama süresinde hücrelerin çoğu membran bütünlüğünü kaybettiği için karşılaştırma hücre yoğunluğuna bakılarak yapılmıştır. Hematoksilen boyamada MCF-7 hücre hatlarında, MDA-MB-231 hücre hatlarında olduğu gibi endemik ökse otlarından Ökse-K'nın ticari ökse otlarından da Helixor-P'nin diğer ekstraktlara oranla daha fazla hücre ölümüne neden olduğu bulunmuştur. İkili boyama sonuçları değerlendirildiğinde, 1.675 mg/ml Ökse-K uygulanan MCF-7 hücrelerinde propidium iyodür ile boyanan ölü hücre sayısı Helixor-P uygulananlara oranla daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak ölümlerin nekrozdan mı yoksa sekonder nekrozdan mı kaynaklandığı bilinmemektedir.

Endemik ve Ticari ökse otu ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında neden oldukları ölüm türlerinin araştırılması ve apoptosizin gösterilmesi amacıyla western blot yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde tez planlanırken apoptosizi doğrulamak için aktif kaspaz-3 tayininin yapılması planlanmıştı fakat MCF-7 hücre hatlarında kaspaz-3 geninin mutasyona uğraması nedeniyle (Janicke 2009) her iki hücre hattında da aktif olan ve ökse otu ekstraktının apoptotik mekanizmasında kırılarak aktive olduğu bilinen PARP (Poly-ADP-riboz polimeraz) proteininin aktivasyonu incelendi. Çalışma sonucunda, MDA hücre hatlarında yalnız Helixor-P uygulananlarda apoptotik ölüm gözlenirken, MCF hücre hatlarında Helixor-P ve 48 saat süreyle Ökse-K uygulananlarda apoptotik ölüm gözlendi.

Kim et al. (2002) tarafından ökse otu lektin-II'nin U937 miyeloid lösemi hücre hatlarında apoptotik etkisinin araştırıldığı çalışmada, apoptosiz mekanizmasında yer alan kaspaz-3, kaspaz-9, JNK (c-Jun-N-terminal kinaz), PKC- δ (Protein kinaz C- δ) ve PARP'ın aktivasyonuna bakılmış ve 116 kDa ağırlığındaki PARP'ın kırılarak 85 kDa band oluşturduğu gözlenmiştir. Kim et al. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada interferon- γ ile muamele edilen U937 miyeloid lösemi hücre hatlarında, Fas (CD95/APO-1) ve FasL ekspresyonu ile PARP ve JNK aktivasyonu western blotla araştırılmıştır. Araştırma sonunda interferon- γ ile muamele edilen hücrelerde Fas ve FasL ekspresyonunun artmadığı, normal U937 hücrelerinde olduğu gibi PARP ve JNK aktivasyonunun olduğu gözlenmiştir.

Meşe üzerinde yetişen ökse otundan hazırlanan ve standardize edilmiş miktarda lektinleri içeren fermente ekstrakt VA Qu FrF'in insan venöz endotel hücre hatlarına (HUVEC) apoptotik etkisi Duong Van Huyen et al. (2002) tarafından araştırılmış ve sonuçları doğrulamak için western blotla PARP'ın aktivasyonuna bakılmış ve 116 kDa ağırlığındaki PARP'ın kırılarak 85 kDa band oluşturduğu gözlenmiştir.

Lyu et al. (2001) kore ökse otu lektininin (*Viscum album* var. *coloratum* agglutinin, VCA) HL-60 akut premyeloid lösemi hücre hattı üzerine apoptotik etkisinin araştırıldığı çalışmada western blotla kaspaz-3 ve PARP aktivasyonu gösterilmiştir.

Bugüne kadar ökse otunun apoptozisi indüklemesi ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların büyük çoğunluğunun ülkemizde yetişen türden farklı bir tür olan Kore ökse otu (Korean mistletoe, *Viscum album var. coloratum*) ve lektinleri ile yapılmış olduğu görülmektedir. Ülkemizde yetişen endemik ökse otu türü olan Avrupa ökse otu (European mistletoe, *Viscum album L.*) ile ilgili yapılan çalışmaların sayısı çok sınırlıdır, kullanılan alt türler bizim ülkemizde yetişenlerden farklıdır ve çalışmaların tamamı ticari olarak hazırlanmış ökse otu preparatları kullanılarak yapılmıştır. Bu bağlamda endemik Avrupa ökse otunun üç farklı alt türüne ait liyofilize ekstraktların meme kanseri hücre hatları üzerine apoptotik etkilerinin ticari ökse otu ekstraktlarıyla kıyaslanarak incelenmesinin literatürde önemli bir boşluğu dolduracağına inanmaktayız.

MTT sonuçlarına göre endemik ökse otu ekstraktlarında ölüm olduğu halde pozitif interferanstan dolayı canlılığın daha fazla gözlenmesi, ticari ökse otu ekstraktlarında tersi bir durum olarak ölüm olmamasına rağmen negatif interferanstan dolayı canlılığın çok düşük bulunması, MTT yönteminin tek başına kullanılacak güvenilir bir yöntem olmadığını göstermektedir.

Ökse otu ekstraktının sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan araştırmalarda, MTT canlılık testi ile mikroskopik inceleme birlikte yapılmalıdır.

ÖZET

Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Ökse Otu Ekstraktlarının Apoptotik Etkisinin Araştırılması

Meme kanserinin erken evresinde tedavilerde gözlenen ilerlemelere karşın birçok kadında hastalık tekrar etmekte ve metastaz oluşmaktadır. Geleneksel tedavilerde başarı sınırlı olduğundan, kanser hastalarının çoğu komplementer ve alternatif tıptan köken alan tedavileri denemektedir. Ökse otu preparatları komplementer/alternatif kanser terapisinin en sık kullanılan formudur. Apoptozisi indüklemesi ve bu yolla hücrenin apoptotik ölümüne neden olması bakımından ökse otunun kanser tedavisinde önemi büyüktür. Standart kanser ilaçları ile kombine edilerek sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda ökse otunun sitotoksitenin artırılması yönünde kullanılabilceği belirtilerek ökse otu terapisi için yeni klinik bakış açısı önerilmektedir.

Bu çalışmada, endemik ökse otunun alt türlerine ait tüm bitki ekstraktları Ökse-B, Ökse-Ç ve Ökse-K ekstraktlarının, MDA-MB-231 östrojen reseptörü negatif ve MCF-7 östrojen reseptörü pozitif olan iki farklı meme kanseri hücre hattı üzerine apoptotik etkisi araştırıldı. Bu etki, Almanya’da ticari olarak üretilen ve tedavi amacıyla kullanılan aynı alt türlere ait Helixor-A, Helixor-P ve Helixor-M ekstraktları’nın etkileri ile karşılaştırıldı.

Ökse otu ekstraktlarının sitotoksik etkileri MTT ve ATP canlılık testleri ile belirlendi. MTT sonuçları ile mikroskopik inceleme sonuçları birbirinden farklı bulundu. MTT sonuçlarına göre endemik ökse otu ekstraktlarında ölüm olduğu halde pozitif interferanstan dolayı % canlılık daha fazla gözlemlendi. Ticari ökse otu ekstraktlarında tersi bir durum olarak ölüm olmamasına rağmen negatif interferanstan dolayı % canlılık çok düşük olarak bulundu. İnterferansın, bitki içeriğinin MTT metodu için kullanılan kimyasallarla etkileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ökse otu ekstraktlarının, sitotoksik etkisini doğrulamak için ATP canlılık testi yapıldı. ATP canlılık metoduna göre, MDA-MB-231 hücre hattında endemik ökse otlarından Ökse-K’nın Ökse-B’ye oranla, ticari ökse otlarında ise Helixor-P’nin Helixor-A’ya oranla daha sitotoksik olduğu bulundu. MCF-7 hücre hattında ise endemik ökse otlarından Ökse-B’nin Ökse-K’ya oranla, ticari ökse otlarında ise Helixor-P’nin diğer iki ekstrakta oranla daha sitotoksik olduğu görüldü.

MDA-MB-231 hücre hattı için tripan blue, ikili boyama ve hematoksilen boyama sonuçları ATP canlılık testi ile benzer sonuçları verirken, MCF-7 hücre hattında farklılık gözlemlendi. Her üç boyama sonucunda da endemik ökse otlarından Ökse-K’nın sitotoksik etkisinin, Ökse-B’den daha fazla olduğu görüldü.

Hücre ölüm şeklinin belirlenmesinde ikili boyama ve hematoksilen boyama birlikte değerlendirildi. Hematoksilin boyamada, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında, endemik ökse otu ekstraktlarından Ökse-K uygulananlarda ve ticari ökse otu ekstraktlarından Helixor-P uygulananlarda hücre membranlarının parçalandığı gözlemlendi. Bu durumun, uygulama süresinin uzun olmasından kaynaklandığına karar

verildi. İkili boyama sonuçları değerlendirildiğinde, Ökse-K uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde propidium iyodür ile boyanan ölü hücre sayısı Helixor-P uygulananlara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak ölümlerin nekrozdan mı yoksa sekonder nekrozdan mı kaynaklandığı bilinmemektedir.

Endemik ve Ticari ökse otu ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında neden oldukları ölüm türlerinin araştırılması ve apoptozisin gösterilmesi amacıyla western blot yöntemi kullanılarak PARP (Poly-ADP-riboz polimeraz) proteininin aktivasyonu incelendi. Çalışma sonucunda, MDA hücre hatlarında yalnız Helixor-P uygulananlarda apoptotik ölüm gözlenirken, MCF hücre hatlarında Helixor-P ve 48 saat süreyle Ökse-K uygulananlarda apoptotik ölüm gözlemlendi.

Endemik ökse otunun üç farklı alt türüne ait liyofilize ekstraktların, meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin ticari ökse otu ekstraktlarıyla kıyaslanarak incelenmesinin literatürde önemli bir boşluğu dolduracağına inanılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Apoptozis, Ökse otu, Helixor

SUMMARY

Investigation of The Apoptotic Effect of Mistletoe Extracts on The Breast Carcinoma Cell Lines

Despite the advancements in the treatment of the early stage of breast cancer, disease repeats in many women and metastase occurs. Because of the limitations of the traditional treatments, most of the cancer patients try complementary or alternative treatments. Mistletoe preparates are the most common form of the complementary/alternative cancer therapy. In terms of inducing of apoptosis and by the way causing the apoptotic death of the cell, mistletoe is very important in the treatment of the cancer. In the researchs of cytotoxicity effects of mistletoe with the combination of standart cancer medicines, a new approach was suggested for the mistletoe treatment in the way of enhancement of the cytotoxicity.

In this study, apoptotic effects of the whole extracts of the all sub-species of mistletoe; Mistletoe-B, Mistletoe-Ç and Mistletoe-K was researched on the two different breast cell lines: MDA-MB-231 ostrogen receptor negative and MCF-7 ostrogen receptor positive. This effect was matched with the extracts produced in Germany and used for treatment, Helixor-A, Helixor-P and Helixor-M extracts of the same sub-species.

Cytotoxic effects of the mistletoe extracts was determined with MTT and ATP recurring tests. MTT results and microscobic examination results were different. According to MTT results, percent-liveliness was observed because of the positive interference despite the death in the mistletoe extracts. On the contrary that there is no death, percent-livelines was too low in the commercial extracts because of the negative interference. It is suggested that interference may be caused by the interaction with the chemicals used for MTT method.

ATP liveliness test was done for the confirmation of the cytotoxic effects of the mistletoe extracts. To the ATP liveliness method, endemic mistletoes Mistletoe-K was more cytotoxic than Mistletoe-B and commercial mistletoes Helixor-P was more cytotoxic than Helixor-A in the MDA-MB-231 cell lines. In the MCF-7 cell lines endemic mistletoes Mistletoe-B was more cytotoxic than Mistletoe-K, commercial mistletoes Helixor-P was more cytotoxic than the other two extracts.

Tripan blue, couple staining and hemotoxilen staining results was similar to the ATP liveliness test in the MDA-MB-231 cell lines but difference was observed in the MCF-7 cell lines. It was observed that Mistletoe-K was more cytotoxic than Mistletoe-B in the three staining results.

Couple staining and hemotoxilen staining was used together to determine the death of the cell. In hemotoxilen staiting, it was observed that cell membranes was destroyed in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines where applied endemic mistletoes Mistletoe-K and commercial mistletoes Helixor-P extracts. It was decided that this situation was derived from the long application time. When the results of the couple staining results evaluated, dead cell count stained with propidium was more in the mistletoe applied MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines than Helixor-P applied cell

lines. But its unknown whether the deaths resulted from necrosis or secondary necrosis.

PARP (Poly-ADP-riboz polymerase) protein activation was examined by western blot to Show apoptosis and investigation of the death types caused by endemic and commercial mistletoes in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. In the study, in the MDA cell lines, apoptotic death was observed only in Helixor-P applied ones. In MCF cell lines, apoptotic cell death was observed in Helixor-P and 48-hours Mistletoe-K applied ones.

We believe that cytotoxic examination of the lyophilised endemic extracts of 3 different mistletoe sub-species matched with commercial mistletoe extracts on the breast cell lines will fill the important space in the literatures.

Key Words: Breast cancer, Apoptosis, Mistletoe, Helixor

KAYNAKLAR

- Aggarwal B.B., Shishir S. Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer, *J Biochemical Pharmacology* 2006; 10:1016
- Andreotti Pe, Cree Ia, Kurbacher Cm, Hartmann Dm, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso Pa, Ricks Sh, Untch M, ET AL. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research* 1995; 55: 5276-5282,
- Anne McTiernan. Behavioral risk factors in breast cancer: can be modified?. *The oncologist*. 2003; 8: 326–334.
- Arı F. Gen Metilasyonu İnhibitörü Desaitabin'in Meme Kanseri Tedavisindeki Yerinin in vitro Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2010
- Aslan A, Temiz M, Yiğit Y, Can R, Canbolant E, Yiğit F. Hemşirelik Yüksek Okulu Öğrencilerinin Meme Kanseri Hakkında Bilgi, Tutum ve Davranışları. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 2007: 6 (3)
- Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999;59: 2083-90.
- Barısıc, K., J. Petrik, L. Rumora. *Biochemistry of Apoptotic Cell Death*. *Acta Pharmaceutica* 2003; 53(3):151-164.
- Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. 40, İstanbul: Sanal Matbacılık 1984:203-4.
- Becker, H. Botany Of European Mistletoe (*Viscum Album L.*). *Oncology* 1986, 43 (1): 2-7.
- Berkey C.S., Frazier A.L., Gardner J.D. and Colditz G.A Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer*, 1999; 85: 2400-9.
- Bernstein L., Henderson B.E., Hanisch R., Sullivan-Halley J. and Ross R.K. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86:1403-8.
- Breast Cancer Research and Treatment; 74:187-192.
- Brouckaert, G., M. Kalai, D.V. Krysko, X. Saelens, D. Vercammen, M. Ndlovu, G. Haegeman, K. D'herde, P. Vandenabeele. Phagocytosis Of Necrotic Cells By Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent And Does Not Induce İnflammatory Cytokine Production. *Molecular Biology Of The Cell* 2004; 15(3):1089-1100.
- Bryant H. Breast Cancer in Canadian Women. *BMC Women's Health*. 2004; 4: 1–12.
- Büssing A, Stein G.M, Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album L.* *Eur. J. Biochem*. 1999; 262:79-87.
- Campbell J.B. (2002) Breast Cancer-Race, Ethnicity, and Survival: A literature Review.
- Celikler S, Yildiz G, Vatan O and Bilaloglu R. In vitro Antigenotoxicity of *Ulva rigida C. Agardh* (Chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration, sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. *Biomedical and Environmental Sciences* 2008; 21, 492-498
- Chang HY, Yang X. "Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases." *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:4:821-46.

- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-12.
- Clamp A, Danson S, Clemons M. Hormonal and genetic risk factors for breast cancer. *Surg JR Coll Surg Edinb Irel.* 2003;23-31.
- Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? *Breast Cancer Research and Treatment* 2002;72:107-115
- Clemons, M, Loijens, L, Goss, P. Breast cancer risk following irradiation for Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rev.* 2000; 26: 291-302.
- Curado M. P., B. Edwards, H. R. Shin, H. Storm, J. Ferlay, M. Heanue and P. Boyle. *Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII. IARC Scientific Publication No. 1160.* 2007:782.
- Cuzick J. *Epidemiology of Breast Cancer. The Breast* 2003;12:405-411.
- Darendeliler E. *Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. Topuz E (editör). Meme Kanseri Biyoloji, Tanı, Evreleme Tedavi. 3.baskı, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 1997; 16-32.*
- Davis, P.H. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol:7, Edinburg; University Press, 1982.*
- Driedger S.M., Eyles J. *Organochlorines and Breast Cancer: The Uses of Scientific Evidence in Claims-making. Social Science and Medicine* 2001;52:1589-1605.
- Eggenschwiler J, Balthazar L, Stritt B, Pruntsch D, Ramos M, Urech K, Rist L, Simões-Wüst A P. and Viviani A. Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2007, 7:14
- Eggenschwiler J, Patrignani A, Wagner U, Rehrauer H, Schlapbach R, Rist L, Ramos MH, Viviani A. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) in vitro. *Arzneimittelforschung.* 2006;56(6A):483-96.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
- Ergun F, Deliorman D, Şener B. *Viscum album* L. (Ökse otu) (Loranthaceae) bitkisinin morfolojik özellikleri ve Türkiye'deki yayılışı hakkında bazı araştırmalar. *OT Sistemik Botanik Dergisi* 1994; 1(2):47-61.
- Ergun F, Deliorman D. *Viscum album* L. (Ökse otu) bitkisinin kimyasal bileşimi. *Ankara Ecz. Fak. Dergisi* 1995; 24(2):95-107.
- Esposti MD. *The roles of Bid. Apoptosis* 2002;7:433-40.
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: On the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000;14:1514-25.
- Gill, L.S. (1953). *Plant Diseases the Yearbook of Agriculture.* U.S Department of Agriculture, 77-73, Washington, D.C.
- Haagenen CD. *Diseases of Breast. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; 1986.*

- Habeck, M. Mistletoe Compound Enters Clinical Trials, DDT 2003; 8 (2):52-53
- Hajto T, Hostanska K, Berki T, Palinkas L, Boldizsar F, Nemeth P. Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:59-67.
- Hunziker-Basler N, Zuzak TJ, Eggenschwiler J, Rist L, Simões-Wüst AP, Viviani A. Prolonged cytotoxic effect of aqueous extracts from dried *viscum album* on bladder cancer cells. *Pharmazie*. 2007;62(3):237-8.
- Huppertz, B., H.G. Frank, P. Kaufmann. The Apoptosis Cascade; Morphological And Immunohistochemical Methods For Its Visualization. *Anatomy And Embryology*, 1999; 200(1):1-18.
- İskender Sayek. Temel Cerrahi 3. Baskı Ankara: Güneş Kitapevi Ltd.Şti. 2004 s.989
- Janicke R U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117:219–221
- Khan N H, Nur-E Kamal M S A, Rahman M . Antibacterial activity of *Euphorbia thymifolia* Linn. *Indian J Med Res*, 1988; 87: 395–397.
- Khil LY, Kim W, Lyu S, Park WB, Yoon JW, Jun HS. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(20):2811-8.
- Kim MS, Lee J, Lee KM, Yang SH, Choi S, Chung SY, et al. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin- II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sci* 2003;73:1231-43.
- Kim MS, Lee J, So HS, Lee KM, Jung BH, Chung SY, et al. Gamma-interferon (IFN-gamma) augments apoptotic response to mistletoe lectin-II via upregulation of Fas/Fas L expression and caspase activation in human myeloid U937 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23: 55-66.
- Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, et al. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol* 2000;34:349-55.
- Kim W-H, Park WB, Gao Bin, Jung M-H. Critical Role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential In Korean Mistletoe Lectin-Induced Apoptosis in Human Hepatocarcinoma Cells. *Mol. Pharmacol*. 2004; 66: 1383-1396
- Knöpfl-Sidler F, Viviani A, Rist L, Hensel A. Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts. *Pharmazie*, 2005;60(6):448-54.
- Kong JL, Du XB, Fan CX, Xu JF, Zheng XJ. [Determination of primary structure of a novel peptide from mistletoe and its antitumor activity]. *Yao Xue Xue Bao*. 2004;39(10):813-7.
- Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999;59(7): 1693s-700s.
- Kruk J. and Aboul-Enein H.Y. Occupational Physical Activity and The Risk of Breast Cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2003; 27:187-192.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.

- Mandacı, S. Balıkesir İli Tarım Ve Orman Alanlarında Ökseotları, Zararları, Koruma Ve Savaş Yöntemleri. "Yüksek Lisans Tezi" (Uludağ Üniversitesi). 1998
- Manjer J., Berglund B.L., Garne J.P., Janson L., Malina J. Breast Cancer Incidence in Relation to Smoking Cessation. *Breast Cancer Research and Treatment* 2000;61:121-129.
- Mavroudis, DP. Papakotoulas, A. Ardavanis, K. Syrigos, S. Kakolyris, N. Ziras, C. Kouroussis, N. Malamos, A. Polyzos, C. Christophyllakis, N. Kentepozidis, V. Georgoulas. Randomized Phase III Trial Comparing Docetaxel Plus Epirubicin Versus Docetaxel Plus Capecitabine As First-Line Treatment In Women With Advanced Breast Cancer. *Annals Of Oncology*, 2009; 21(1):48-54.
- Miller AG. *Viscum album L.* in 'Flora of Turkey and the East Aegean Islands'. 7, Davis: P.H. Ed., 1982.
- Mockel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung* 1997;47: 1145-51
- Mountz JD Zhou T. Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ, ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. 14th ed. Lippincott: Williams & Wilkins; 2001.
- Önay, E. Farklı Konakçı Ağaçlar Üzerinde Yaşayan Ökseotu (*Viscum Album L.*) Bitkisinde Biyokimyasal Analizler. "Yüksek Lisans Tezi" (İstanbul Üniversitesi). 2002
- Özdemir O. ve Çalışkan D. Meme Kanserinin Erken Tanısında Kullanılan Yöntemler. *Sağlık ve Toplum* 2002;12(4):10-14.
- Özmen V, Fidaner C, Aksaz E, Bayol Ü, Dede İ, Göker E ve ark. Türkiye'de meme kanseri erken tanı ve tarama programlarının hazırlanması "sağlık bakanlığı meme kanseri erken tanı ve tarama alt kurulu raporu" *The Journal of Breast Health* 2009: 5(3);125-134.
- Park R, Kim MS, So HS, Jung BH, Moon SR, Chung SY, et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1685-91.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108. (PMID: 15761078)
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al., eds. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004*, National Cancer Institute. Bethesda, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2007.
- Rogers C., Thompson K., Robinson S. Introducing A Breast Health Strategy into Schools. *Health Education* 2002;12(3):106-112.
- Rohan TH; Howe GR, Friendenrich CM et. al: Dietary fiber vitamins A, C, and E risk of breast cancer. A cohort study. *Cancer Causes Control*. 1993; 4: 29-35.
- Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: Apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003;88: 212-8.
- Russo J., Hu Y.F., Yang X. and Russo I.H. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 2000: 27 17-37
- Scmızu, Y., H. Kato, W.J. Schull. Studies of The Mortality of A-Bomb Survivors. 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer Mortality Based on The Recently Revised Doses (DS86). *Radiation Research* 1990; 121(2):120-141.

- Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murdter TE. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21(4A):2687-91.
- Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998;273:26900-7.
- Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*. 2001; 286: 2143–2151.
- Smith R.A., Cokkinides V., Von Eschenbach A.C., Levin B., Cohen C., Runow.cz C.D., Sener S., Saslow D., Eyre H.J. American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer. *CA Cancer Journal for Clinicians* January-February 2002;52(1):8-22.
- Somunoğlu S. Meme kanserinde risk faktörleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi* 2007; 2: 2-12.
- Spears, M., J.M. Bartlett. Human Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization Analysis in Breast Cancer Diagnosis: Potential for Improving Testing Accuracy and Treatment Selection. *Molecular Diagnosis Therapy*, 2009; 13(6):359-365.
- Styczynski J, Wysocki M. Alternative medicine remedies might stimulate viability of leukemic cells. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 46(1):94-8.
- Telo S. Meme Kanseri Oluşturulan Ratlarda Isırgan Otunun Antioksidan Enzimler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi F.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi 2006
- Thompson, C.B. Apoptosis. In: Paul WE (eds). *Fundamental immunology*. Lippincott-Raven Publishers; 1999; 107-138.
- Ulukaya E. Apoptosis Ders Notları. Erişim: [<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>] Erişim tarihi: 04.05.2007.
- Urech K, Buessing A, Thalmann G, Schaefermeyer H, Heusser P. Antiproliferative effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extract in urinary bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 2006;26(4B):3049-55.
- Urech, K. Mistletoe Constituents and Cancer Therapy. *J. Anthroposophical Med* 1993;10:54–63.
- Vaclavikova R, Horsky S, Simek P, Gut I (2003) The paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioksidants. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:200-209
- Wajant H. The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-6.
- Walker BG. *The Woman's Encyclopedia of Myths and Secrets*. San Francisco: Harper & Row, 1983; 661–3.
- White MK, McCubrey JA. Suppression of apoptosis: Role in cell growth and neoplasia. *Leukemia* 2001;15:1011-21.
- Williams T., Clarke VA., Savage S. Women's Perceptions of Familial Aspects of Breast Cancer. *Health Education* 2002;102(2):50-59.
- Willingham, M.C. Cytochemical Methods for The Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999; 47(9):1101-1109.

- Yesilada E, Deliorman D, Ergun F, Takaishi Y, Ono Y. Effects of the Turkish subspecies of *Viscum album* on macrophage-derived cytokines. *J Ethnopharmacol* 1998;61:195-200.
- Yoo KY, Kang D, Park SK, Kim SU, Kim SU, Shin A, Yoon H, Ahn SH, Noh DY, Choe KJ. Epidemiology of breast cancer in Korea: occurrence, high-risk groups, and prevention. *Korean Med Sci.* 2002; 17: 1–6.
- Zarković N, Kalisnik T, Lončarić I, Borović S, Mang S, Kissel D, Konitzer M, Jurin M, Grainza S. Comparison of the effects of *Viscum album* lectin ML-1 and fresh plant extract (Isorel) on the cell growth in vitro and tumorigenicity of melanoma B16F10. *Cancer Biother Radiopharm.* 1998;13(2):121-31.
- Ziegler RG, Hoover RN, Nomura AM et al. Relative weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88: 650–660.
- Ziska P, Gelbin M, Franz H. Interaction of mistletoe lectins ML-I, ML-II and ML-III with carbohydrates. In: Franz H, Bog-Hansen TC, eds. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.* Berlin: Walter de Gruyter; 1991. p.10-3.
- Zuzak TJ, Rist L, Eggenschwiler J, Grotzer MA, Viviani A. Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. *Anticancer Res.* 2006; 26(5A):3485-92.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Isparta'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Isparta'da tamamladı. 2001 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans öğrenimini tamamladı. 2002 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine ve Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 tarihinde Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı.