

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

**CYCLOTRICHIMUM NIVEUM L.'DEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Metin YILDIZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa ARK

ANKARA
Şubat 2014

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

**CYCLOTRICHIMUM NIVEUM L.'DEN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Metin YILDIZ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa ARK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SBE-02/2011-25 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2014

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji (Ecz.) Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 28/03/2014



Prof. Dr. Mustafa Ark
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. İlkey Erdoğan Orhan
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Nilüfer Nermin Turan Dural
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Resimler	iii
Grafikler	iv
Tablolar	v
Kısaltmalar	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası	3
2.2. <i>Cyclotrichium</i> Genusu, <i>Cyclotrichium niveum</i> ve Biyoaktiviteleri	4
2.2.1. <i>Cyclotrichium niveum</i> ve Biyoaktiviteleri	4
2.3. Kanserin Tanımı ve Özellikleri	8
2.4. Kanser Oluşumunun Nedenleri	10
2.5. Karsinojenler ve Sınıflandırılmaları	10
2.6. Kanser Tedavisi	11
2.6.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar (Antineoplastik Ajanlar)	12
2.6.1.1. Alkilleyici Ajanlar	12
2.6.1.2. Antimetabolitler	12
2.6.1.3. <i>Vinca</i> Alkaloidleri ve Bitkisel Kaynaklı Diğer İlaçlar	13
2.6.1.4. Sitotoksik Antibiyotikler	13
2.6.1.5. Sisplatin, Diğer Platin Türevleri ve Amifostin	14
2.6.1.6. Protein Kinaz İnhibitörleri	14
2.6.1.7. Hormonlar ve Hormon Antagonistleri	14
2.6.1.8. Monoklonal Antikorlar	15

2.6.1.9. Diğer Antineoplastik İlaçlar	15
3.GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Gereç	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ekstreler	17
3.1.2. Kullanılan Aletler	17
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Hücre Kültürü	18
3.2.2. Faz Kontrast Mikroskopisi	19
3.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Sitotoksik Etkinin Gözlenmesi	19
3.2.4. MTT Analizi	20
3.2.5. İstatistiksel Analiz	21
4.BULGULAR	22
4.1. <i>Cyclotrichium niveum</i> Ekstrelerinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi	22
4.2. <i>Cyclotrichium niveum</i> Ekstrelerinin HepG2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi	29
4.3. <i>Cyclotrichium niveum</i> Ekstrelerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi	36
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	46
7. ÖZET	47
8. SUMMARY	49
9. KAYNAKLAR	51

10. TEŞEKKÜR

58

11. ÖZGEÇMİŞ

59

RESİMLER

Resim 1: *Cyclotrichium niveum*²⁹ - Genel görünüş

Resim 2: HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyen maksimum konsantrasyonda uygulanan sulu ve etanollü ekstraller

Resim 3. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Resim 4. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Resim 5. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyen maksimum konsantrasyonda uygulanan sulu ve etanollü ekstraller

Resim 6. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Resim 7. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Resim 8. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyen maksimum konsantrasyonda uygulanan sulu ve etanollü ekstraller

Resim 9. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Resim 10. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

GRAFİKLER

Grafik 1: *C. niveum*'un uçucu yağının rat ileumundaki spontan kasılmaları önleyici etkisi

Grafik 2. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan sulu ekstrenin farklı konsantrasyonlarda uygulandığı

Grafik 3. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan etanollü ekstrenin farklı konsantrasyonlarda uygulandığı

Grafik 4. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrelerin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 5. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin IC₅₀ grafiği

Grafik 6. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 7. HeLa hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin IC₅₀ grafiği

Grafik 8. HeLa hücrelerinde diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrele ait IC₅₀ değerleri arasındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik

Grafik 9. HeLa hücrelerinde MTT analiz yöntemiyle yapılan, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrele ait IC₅₀ grafiği

Grafik 10. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan sulu ve etanollü ekstrenin maksimum konsantrasyonda uygulandığı

Grafik 11. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 12. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 13. Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu yüzde cinsinden HepG2 canlılık oranları

Grafik 14. HepG2 ve HeLa hücrelerinde diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin 300 µg/ml konsantrasyonda oluşturdukları yüzde cinsinden hücre ölümü

Grafik 15. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 16. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin IC₅₀ grafiği

Grafik 17. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Grafik 18. MCF-7 hücrelerinde *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin IC₅₀ grafiği

Grafik 19. MCF-7 hücrelerinde diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler arasındaki IC₅₀ farklılığını gösteren grafik

Grafik 20. MCF-7 hücrelerinde MTT analiz yöntemiyle yapılan, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelere ait IC₅₀ grafiği

TABLULAR

Tablo 1: Onkolojideki bazı temel kavramlar

Tablo 2: Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin HeLa ve MCF-7 hücrelerinde RTCA ve MTT yöntemiyle hesaplanan IC₅₀ değerleri

KISALTMALAR

- ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DPPH: 1,1-Difenil-2-pikril- hidrazil
EBV : Epstein–Barr virüsü
EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit
GM-CSF: Granulosit makrofaj koloni-stimülasyon faktörü
HCV : Hepatit C virüsü
HIV : İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPV : İnsan papilloma virüsü
HTLV1: İnsan T-hücresi lenfotropik virüs
IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
MR : Manyetik Rezonans
MTT : Sarı tetrazol [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
PBS : Fosfat tuzu tamponu
RB : Retinoblastoma
RTCA: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
SV40: Simian 40 virüsü
UV : Ultraviyole
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
PDGF: Trombosit türevli büyüme faktörü
EGF: Epidermal büyüme faktörü
SSS: Santral sinir sistemi

1. GİRİŞ

Kelime anlamı olarak kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü tümörlerdir. Genel anlamda ise kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubudur. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir¹. Ülkemizde 2012 yılında ölüme sebep olan ilk altı hastalık grubu sırasıyla; %37,9 ile dolaşım sistemi hastalıkları, %21,1 ile kötü huylu tümörler (malign neoplazmlar), %9,7 ile solunum sistemi hastalıkları, %6,0 ile endokrin, beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar, %4,3 ile sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları ve %4,1 ile dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler olarak görülmektedir².

Uluslararası verilere göre, 2008 yılı tamamında 12,4 milyon tahmin edilen yeni vaka ve 7,6 milyon ölüm kanser yüzünden meydana gelmiştir. İnsidans yönünden dünyada en yaygın kanserler akciğer (1,52 milyon), meme (1,29 milyon) ve kolorektal (1,15 milyon) kanserleridir. Kötü prognoz nedeniyle akciğer kanseri aynı zamanda en fazla ölüme (1,31 milyon) neden olan kanser tipiyken, onu mide kanseri (780.000 ölüm) ve karaciğer kanseri (699.000 ölüm) izlemiştir³⁻⁵.

Kanser tedavisinde bitkisel kaynaklı ilaçların önemli bir yeri bulunmaktadır. *Vinca rosea* bitkisinden elde edilen; vinkristin, vinblastin, vindesin, vinorelbin, *Podophyllum* türlerinden elde edilen; podofilotoksin, etopozit, tenipozit ile *Taxus* türlerinden elde edilen paklitaksel ve dosetaksel bitkisel kaynaklı antikanser ilaçlardır⁶. Tedavide kullanımda olan bu ilaçların yanı sıra yeni ilaç geliştirmek adına çok sayıda bitki antikanser aktivite yönünden taranmaktadır.

Cyclotrichium niveum bitkisi Lamiaceae familyasının bir üyesi olup ülkemizde yetişen endemik bir türdür^{7,8}. *C. niveum* üzerinde yapılan çalışmalar bitkinin uçucu yağının antioksidan, antispazmodik ve asetilkolinesteraz inhibitör, sulu ve etanollü ekstralarının antioksidan, antimikrobik ve asetilkolinesteraz inhibitör, metanollü ekstresinin antioksidan, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstralarının ise asetilkolinesteraz inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir⁹⁻¹². Fakat daha önce *C. niveum* bitkisi sitotoksisite yönünden değerlendirilmemiştir. Bu tez kapsamındaki çalışmalarımızla bitkinin sulu, etanollü, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstralarının olası sitotoksik etkileri HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerinde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası

Lamiaceae familyası dünyada yaklaşık 250 cins ve 7000 tür ile temsil edilmektedir¹³. Bu familya üyeleri Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere; Avustralya, Güney Batı Asya ve Güney Amerika'da yoğun yayılış göstermektedir¹⁴. Türkiye Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biridir. Bu familya ülkemizde 42 cinse ait yaklaşık 570 tür ile temsil edilir¹⁵⁻¹⁷. Ülkemizdeki endemizm oranı yaklaşık % 44,5 olan bu familya, içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası konumundadır^{7,8,13,18}. Lamiaceae familyası üyelerinin çoğunun uçucu yağlar ve diğer sekonder metabolitler bakımından zengin olması sebebiyle; tıp, eczacılık, gıda, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda oldukça büyük öneme sahiptir^{13,19}. Diğer taraftan bu familya üyelerinin ülkemizdeki etnobotanik kullanımı da oldukça yaygındır^{20,21}.

Lamiaceae familyasına ait bitkiler bir veya çok yıllık, genellikle otsu, bazen çalimsı, nadiren ağaç şeklinde (*Hyptis* sp.) veya tırmanıcı (*Scutellaria* sp.), çoğunlukla salgı tüyü taşıyan, aromatik bitkilerdir. Gövde genellikle dört köşelidir. Yapraklar basit, bazen parçalı, stipulasız, karşılıklı ve dekusat dizilişte olabilir. Damarlanma genellikle pennattır. Çiçek durumu çoğunlukla vertisillastrum, bazen spika kapitulum, rasem ve simoz durumundadır. Çiçekler; ginodioik bitkilerde hermafrodit veya erkek çiçek körelmiş ve fonksiyon olarak dişidir. Brakteler yapraklardan farklı veya benzer, brakteoller genellikle küçük, bazen yoktur. Kaliks kalıcı, gamosepal, genellikle 4-5 loblu, değişik sayıda damarlı, bazen kampanulat veya tubulat, çoğunlukla üst dudak 3, alt dudak 2 lobludur. Korolla gamopetal, zigomorf ve bilabiata, üst dudak 2 loblu, falkat, dik veya çok az kambur, alt dudak 3 loblu, bazen üst dudak körelmiş, ya da üstte 1, altta 4 loblu, çoğunlukla pembe, beyaz, mavi-leylak, mor veya sarı renklidir.

Stamenler korollaya bağlı ve birlikte gelişmiş, genellikle didinam, bazen 2 nadiren 5 tane, biri körelmiş; genellikle üsttekiler alttakilerden daha kısadır. Anter tekaları 2 ya da tek hücreli, paralel veya birbirinden ayrıdır. Ovaryum st durumlu, 2 karpelli, 4 loblu, 4 ovlldr. Stilus genellikle korolladan daha uzun, ginobazik; nadiren ginobazik değil, kısa ve uçta bifittir. Meyva olgunlukta 4 nuksa ayrılan bir şizokarp olup, 4 nuksta bir tohum tařır²².

2.2. *Cyclotrichium* Genusu, *Cyclotrichium niveum* ve Biyoaktiviteleri

Lamiaceae familyasına ait olan *Cyclotrichium* genusu Dünya'da Türkiye, Lübnan, Irak ve İnan'da yetişen *C. organifolium*, *C. leucotrichum*, *C. longiflorum*, *C. straussii*, *C. haussknechtii*, *C. niveum*, *C. glabrescens*, *C. stamineum*, *C. depauperatum* olmak üzere 9 türle temsil edilir. Bu 9 türden 6'sı ülkemizde bulunmaktadır^{7,8,18,23,24}. *Cyclotrichium* türleri içerdikleri aromatik esansiyel yağdan dolayı baharat olarak kullanılır. Ülkemizde ayrıca bitkisel çay olarak da tüketilir. *Cyclotrichium* türleri Türkiye'de halk dilinde "dağ nanesi, kız otu, köpek nanesi, karabaş otu, naneruhu" olarak isimlendirilir²⁵.

Cyclotrichium türleri başlıca uçucu yağ taşımakta ve bu yağın bileşiminde türlere göre, izopinokamfon, terpinen-4-ol, spatulenol, menton, timol, karvakrol ve pulegon gibi sekonder metabolitler iermektedirler^{26,27}. *C. niveum* ise başlıca sekonder metabolit olarak pulegon iermektedir⁹.

2.2.1. *Cyclotrichium niveum* ve Biyoaktiviteleri

C. niveum bitkisi ülkemizde endemik olarak yetişir ve 'dağ nanesi' olarak bilinir^{7,8}. *C. niveum* yıllık bir bitki olup, çay olarak tüketilir. Sivas'ta, grip, mide bulantısı ve kas ağrısı şikayetlerinde halk tıbbına uygun olarak kullanılır. Bunun yanı sıra Türk mutfağında çorba ve diğer

yiyeceklerde lezzet ve koku verici özelliğinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir²⁸.

C. niveum bitkisi, 20-25 cm beyaz-tomentelloz sapsız glandlara sahip ağacimsi kök, ovat-elliptik 8-14x4-9 mm dendroit yapıda yapraklar, tüpten kısa 1,5-2 mm düz ve düz-subulat yapıda brakteler, 4-6 mm dendriodal subbilabiata üst dişler 0,5-1 mm, alt dişler 1-1,5 mm kaliks, 7-9 mm korolla yapılarına sahiptir²⁹.

C. niveum bitkisinin uçucu yağı GS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu yağın %94.82'sini oluşturan bileşiklerin miktarları tespit edilmiştir. Yağın bileşiminin %76.84'ünü pulegon, %6.65'ini izomenton, %3.01'ini izopulegon oluşturmaktadır. Sivas'ta, Gürun-Darende hattı üzerinde toplanan *C. niveum* örneklerinin uçucu yağları üzerinde GS/MS yöntemiyle yapılan analizde ise, izomenton %35.36, pulegon %56.11 olarak bulunmuştur. Bu farklılıklar, iklimsel, mevsimsel, coğrafik ve jeolojik değişiklikler sonucu meydana gelebilmektedir. Ancak bu farklılıklara rağmen ana bileşik genellikle pulegon olarak bulunmuştur⁹.



Resim 1. *Cyclotrichium niveum*²⁹ – Genel görünüş

C. niveum bitkisinin olası biyolojik aktivitelerini değerlendirmek açısından çeşitli çalışmalar yapılmıştır. *C. niveum* bitkisine ait ekstrelerin, antioksidan, antimikrobiyal etki ve radikal temizleme kapasitesi incelenmiştir. Radikal temizleme ve antioksidan etkinin incelenmesi, 2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), radikal temizleme aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile toplam antioksidan aktivite, potasyum ferrosiyanit redüksiyon metodu, süperoksit anyon temizleme aktivitesi, hidrojen peroksit temizleme ve demir iyonu şelat oluşturma aktivitelerinin değerlendirilmesine dayalı metotlarla yapılmıştır. Böylece antioksidan ve radikal temizleyici etki tespit edilmiştir. Bitkiye ait ekstrelerin antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri, 25 çeşit mikroorganizma üzerinde test edilerek gerçekleştirilmiştir¹⁰.

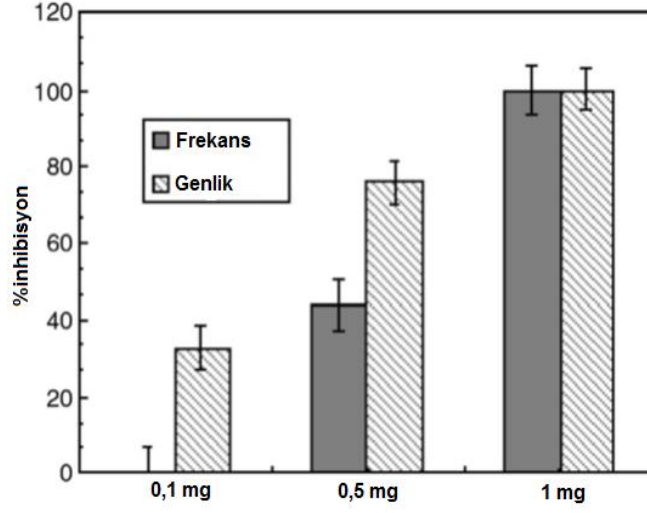
Sonuç olarak bitkinin sulu ve etanollü ortamda hazırlanan ekstrelerinin, antioksidan, antimikrobiyal etkilere sahip olduğu ve serbest radikal temizleme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler sayesinde, ekstrelerin lipit oksidasyonunu engellemesi ve toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu geciktirmesiyle, hem ilaçların, hem de besinlerin raf ömrünü uzatmada ve antimikrobiyal etkiyle de mikrobiyolojik bozulmaya karşı bu ürünleri korumada kullanılabilmesi olası gözükmektedir¹⁰.

Başka bir çalışmada ise, *C. niveum* bitkisine ait metanollü ekstrelerin, DNA hasarını önleyici etkisi ve antioksidan etki gücü araştırılmıştır. Bu antioksidan potansiyeli, lipit peroksidasyonu, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH), hidroksil radikal temizleme, indirgeme gücü, demir şelasyonu ve protein oksidasyonu üzerinde inhibitör etki oluşturma gibi, çeşitli *in vitro* sistemler oluşturularak incelenmiştir. Bitkinin metanollü ekstresi, dayanıklı bir serbest radikal olan DPPH'ı, IC₅₀ değeri 78.15 µg/ml olacak şekilde indirgemeyi başarabilmiştir. Metal şelatı oluşturabilme kapasitesi ise EDTA ile kıyaslandığında oldukça düşük bulunmuştur.

FeCl₂-H₂O₂ sisteminin oluşturduğu lipid peroksidasyonuna karşı bu ekstre, güçlü inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca, güçlü bir şekilde konsantrasyon bağımlı deoksiriboz oksidasyonu inhibitörü etki tespit edilmiştir.

Ekstrenin, hidrojen peroksit ve UV ışınına bağlı olarak DNA ayrılması üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, DNA ayrılması üzerinde de koruyucu etki gözlenmiştir. Buna ilaveten, sığır serum albümininde hidroksil radikalleri tarafından oluşturulan hasar, *C. niveum*'un metanollü ekstralarının 10-1000 µg/ml konsantrasyon aralıklarında inhibe edilmiştir. *C. niveum*'un total fenolik içeriği, 1mg ekstrakta 200.9 µg gallik asit olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları, *C. niveum*'un metanollü ekstresinin belirgin bir antioksidan özellik taşıdığını göstermiştir. Dolayısıyla bu ekstre aynı zamanda doğal antioksidan kaynağı özelliği taşımaktadır¹¹.

C. niveum'a ait bir başka çalışmada ise bitkinin uçucu yağının antispazmotik ve radikal süpürücü etkisi incelenmiştir. Bu uçucu yağ doz bağımlı (0.1,0.5,1 mg/ml) olarak, karbakol ile tavşan mesanesinde oluşturulan kasılmayı %15-100 arası bir oranda inhibe etmiştir. DPPH metoduyla yapılan ölçümde IC₅₀ değeri 1750 µg/ml olarak bulunmuştur. Rat ileumunda görülen spontan kasılmalar üzerinde de *C. niveum*'un uçucu yağının doğrudan etkisi test edilmiştir. Bu testte, 0.1 mg/ml konsantrasyonda uygulama frekansı sabit tutulup, uygulama süresi azaltılarak, 0.5 mg/ml konsantrasyonda hem frekans hem de uygulama süresi azaltılarak ve son olarak 1 mg/ml konsantrasyonda hem frekans hem de uygulama süresi azaltılarak bir çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak; %100 inhibisyon 1 mg/ml konsantrasyon ile yapılan son deneyde elde edilmiştir (Grafik 1)⁹. Yapılan başka bir çalışmada ise, *C. niveum*'un diklorometanlı ve etil asetatlı ekstralarının asetilkolinesteraz inhibitör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir¹².



Grafik 1. *C. niveum*'un uçucu yağının rat ileumundaki spontan kasılmaları önleyici etkisi⁹.

2.3. Kanserin Tanımı ve Özellikleri

Kanser, hücrenin proliferasyon dengesinin bozulmasına, hücre ölümüne, dokulara invaze olabilen ve uzak dokulara metastaz yapabilen hücre popülasyonuna dönüşmesine neden olan, önemli derecede morbidite ve tedavi edilmezse hastanın ölümüne sebep olan, gen ekspresyonundaki çoklu değişiklikten dolayı, hücrelerdeki anormal büyüme ve çoğalma durumudur. Çeşitliliklerine rağmen, kanserler temel ortak özellikler taşır. Farklı kanserler, farklı oluşum süreçleri ve şekilleri gösterirler. Dahası bu özellikler, kanserin oluşumu ve ilerlemesi esnasında adım adım kazanılır ve çeşitli basamaklarda belirgin bir hal alır. Her bir kanser çeşidine has bu niteliklerin çoğu diğer hastalıklarda da bulunur ve fizyolojik adaptasyon reaksiyonlarında bazen ortaya çıkar³⁰. Kanser hücrelerinin bazı önemli ortak özellikleri Hanahan ve Weinberg tarafından 'Kanserin Karakteristikleri' olarak tanımlanmıştır. Bu özellikler; hücre bölünmesinin sürekli uyarılması, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, genomik kararsızlık, hücre ölümüne karşı direnç, anjiyojenezin indüklenmesi ve invazyon ile metastaz yapma yeteneğidir^{31,32}.

Kanser hücrelerinde kontrolsüz hücre çoğalmasını destekleyen çeşitli olaylar arasında;

- Proliferasyonu destekleyen onkojenlerin aktivasyonu; ras ve myc gibi,
- Hücre siklusu düzenleyici faktörlerin aşırı ekspresyonu; siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve CDK inhibitörleri,
- Hücre senesens oluşumunun inhibisyonu için telomerazın eksprese edilmesi,
- Anjiyogenezin tümör dokusuna kan akımını artırmak için artırılması,
- Apoptotik faktörlerde mutasyon ve anti-apoptotik faktörlerde up-regülasyonun yer aldığı gösterilmiştir³³.

Karsinogeneze neden olan önemli genetik değişiklikler için ise iki temel sınıflama önerilmiştir:

1. Proto-onkojenlerin onkojenlerle aktivasyonu. Protoonkojenler normal olarak hücre bölünmesi, apoptoz ve farklılaşmayı kontrol ederler. Ancak viral veya karsinojen etkisiyle malignant değişimi indükleyen onkojenlere dönüşürler.

2. Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu. Normal hücreler malignant dönüşümü baskılayan genlere sahiptir ki bunlar “tümör süpresör genler” olarak (anti-onkojenler) adlandırılırlar. Birçok farklı kanser türünde bu genlerin mutasyonu görülmektedir³⁴.

2.4. Kanser Oluşumunun Nedenleri

Kanserin kesin sebebi ya da sebepleri bilinmemektedir. Kişiyi bazı kanser türlerine yatkın hale getiren genler, kanser oluşumuna yol açan virüsler, radyasyona maruz kalma, çeşitli kimyasal maddeler, kanser sebepleri arasında sayılmaktadır. Bağışıklık sistemindeki bozulmalar, çeşitli çevresel faktörler ya da beslenme tarzımız da kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Kansereleşen hücrelerdeki temel bozukluğun genlerdeki farklılaşmayla başladığı düşünülmektedir. Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen bir etkiyle de olabilir. Genlerde, mutasyon denilen bozulmalar hücrenin normal kontrol mekanizmalarını bozup kontrolsüz çoğalmasına yol açmaktadır³⁵. Örneğin, hücrelerin büyümesini kontrol eden p53³⁶⁻³⁹ geni hücrede yoksa ya da bu gen hasar gördüyse, anormal hücre büyümesi baskılanamaz ve hücre kontrolsüz çoğalarak kansere yol açar. Beyin, meme, prostat ve böbrek gibi organların kanserlerinde p53 genindeki mutasyonun rol oynadığı kanıtlanmıştır⁴⁰⁻⁴². Bir başka kanser baskılayıcı gen ise, retinoblastoma (RB) genidir⁴³. Bu genin mutasyonunda yine bazı kanser türleri ortaya çıkmaktadır⁴⁴. Kanser oluşumundaki faktörler aşağıda maddeler halinde listelenmiştir³⁵:

- Kalıtsal faktörler
- Radyasyon
- Virüsler
- Kimyasal maddeler
- Besinler

2.5. Karsinojenler ve Sınıflandırılmaları

Karsinojen terimi kanser oluşumunu harekete geçiren herhangi bir madde yada unsurunu ifade eder. Kanserler, kimyasal, fiziksel ve biyolojik karsinojenlerin etkileri sonucu ortaya çıkar. Kanser, genetik

yapı farklılıkları, psikolojik ve sosyoekonomik şartlar nedeniyle, bu karsinojenlerle başedebilme yeteneğini yitirmiş bireylerde ortaya çıkar. Vücutta bulunan iç etkenlerde yine kendi başlarına ya da dış etkenlerle (kimyasal, fiziksel, biyolojik) beraber kanser gelişiminde rol oynarlar³⁰. Bu iç ve dış etkenlere göre karsinojenlerin sınıflandırılması Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1: Karsinojenlerin sınıflandırılması ve bu sınıflara ait örnekler³⁰

KARSİNOJEN TİPLERİ	ÖRNEKLER
Kimyasal karsinojenler	Nikel, kadmiyum, arsenik, nitrozaminler, trikloroetilen, arilaminler, benzopiren, aflatoksinler, reaktif oksijen türleri
Fiziksel karsinojenler	UV radyasyon (özellikle UVB), iyonize radyasyon
Biyolojik karsinojenler	İnsan papilloma virüs, Epstein-Barr-Virüs, Hepatit B virüs, Helicobacter pylori, Schistosoma mansoni
Endojen yapılanmalar	DNA replikasyonu, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu metabolik reaksiyonlar, kronik inflamasyon

2.6. Kanser Tedavisi

Prensipde, kanserin tedavisi için pek çok farklı terapi şekli mevcuttur. Cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ya da bunların kombinasyonu tedavi için kullanılabilir. Lokalize olmuş kanserlerin tedavisinde cerrahi müdahale veya radyasyon tedavisi tercih edilir. Buna karşın, lösemiler, lenfomalar, metastatik ya da lokal olarak ilerlemiş karsinomalar ve yumuşak doku kanserlerinin tedavisinde, bazı durumlarda cerrahinin ya da radyasyon tedavisinin de eşlik ettiği, ilaç kemoterapisi gerekir.

Bu tedavi yöntemlerine ek olarak uygulanan immünoterapi, değişken etkiye sahip bulunmasına rağmen bazı kanser türlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak immünoterapide görülen başarılı ve başarısız tedavilerin nedenleri gün geçtikçe aydınlatılmaktadır. Böylece, immünoterapi gelecekte daha kullanılır hale gelebilecektir. Gen terapisinden de umut edilmekle beraber, bu konuda 100 kadar klinik çalışma yapılmıştır ve başka çalışmalar da yapılmaktadır³⁰.

2.6.1. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar (Antineoplastik Ajanlar)

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar 9 grup altında toplanabilirler.

2.6.1.1. Alkilleyici Ajanlar

Bu ilaçlar yapılarında bulunan alkil gruplarını çeşitli hücre bileşenlerine transfer ederek sitotoksik etki gösterirler. Başta DNA olmak üzere çeşitli hücrenel nükleotitlerle reaksiyona girerler. DNA'da majör olarak guaninin N7 atomlarını ve daha az bir derecede de adeninin N1 N3, sitozinin N3 ve guaninin O6 atomlarını alkilerler. Bu etkileşimler DNA'nın tek veya çift zincirinde çapraz bağlar oluşumu ile gerçekleşir. DNA sentezindeki bozukluk ve sonuçtaki tahribat apoptozu indükler. Bu gruptaki en bilinen ilaç siklofosfamittir. Platin bileşikleri de DNA içinde çapraz bağlanmalara neden olmaktadır. Sis-platin, yaygın kanser tedavi rejimlerinin önemli bileşiklerinden biridir⁴⁵.

2.6.1.2. Antimetabolitler

Bu ilaçlar DNA sentez yollarını bloke ederler. Bu grupta yer alan metotreksat, folat antagonistidir. Dihidrofolat redüktazı inhibe ederek timidilat sentezinde yer alan tetrahidrofolat oluşumunu engeller. Bu grubun

diğer bir üyesi olan 5-florourasil, pirimidin analogudur ve fraudulent nükleotidine dönüşerek timidilat sentazı inhibe eder⁴⁶.

2.6.1.3. Vinca Alkaloitleri ve Bitkisel Kaynaklı Diğer İlaçlar

Bu grupta bulunan antineoplastik ilaçlar *Vinca rosea* bitkisinin dimerik alkaloitleri olan vinkristin, vinblastin ve yarı sentetik türevleri vindesin ve vinorelbin, *Podophyllum* türlerinden elde edilen podofilotoksin ve yarı sentetik türevleri etopozit ve tenipozit ile *Taxus* türlerinden elde edilen taksanlar olan paklitaksel ve dosetakseldir. Etopozit ve tenipozit hariç primer etkileri, mitozun metafaz döneminde, mikrotübüllerden ibaret olan mitoz içciklerinin oluşmasını önlemektir. Mikrotübüllerin yapıtaşı olan tübülün moleküllerine bağlanarak onları çöktürürler ve mikrotübülleri oluşturmak üzere bir araya gelmelerini bozarlar. Sonuçta hücre bölünmesi metafazda durur ve hücre ölür. Mitoz dönemine özgü ilaçlardır ve DNA sentezini veya yapısını bozmazlar. Nöronların mikrotübüllerinin oluşmasını da bozduklarından nörotoksik tesirleri de vardır. Vezikan ve teratojeniktirler⁶.

2.6.1.4. Sitotoksik Antibiyotikler

Doksorubisin: DNA ve RNA sentezini inhibe eder. DNA üzerindeki etkisini topoizomerez II enzimini inhibe ederek oluşturduğu düşünülmektedir. Kardiyak tahribata bağlı aritmi ve kalp yetmezliği oluşturma riski vardır.

Bleomisin: DNA zincirinin fragmentasyonuna neden olur. Bölünmeyen hücrelerde de etkilidir. Ateş, allerji ve pulmoner fibroz oluşturur⁴⁵.

2.6.1.5. Sisplatin, Diğer platin Türevleri ve Amifostin

Yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevi ilaçlardır. Sisplatin, kimyasal olarak platin diaminodiklorürdür. DNA çift zincirinde zincirler-arası ve zincir-içi çapraz bağlanma yapar; bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlarınkine benzer. Sadece *cis* izomeri sitotoksiktir. Döneme özgü olmayan (Hücre döngüsü sırasındaki fazlar üzerinden etki etmeyen) bir ilaçtır. Sisplatinin türevleri ise karboplatin ve oksaliplatinidir. Amifostin ise sisplatin ve benzeri ilaçların kümülatif nefrotoksitesini ve kemik iliği baskılanmasını azaltan bir antidottur⁶.

2.6.1.6. Protein Kinaz İnhibitörleri

Büyüme faktörlerinin aracılık ettiği çeşitli onkogenik protein kinazların aktivitesini önlerler.

İmatimib: Onkogenik sitoplazmik kinaz olan Bcr/Abl'i inhibe eder. Ayrıca PDGF reseptörü kinaz bölgesini de inhibe ettiği bildirilmiştir.

Gefitinib: EGF reseptör tirozin kinaz aktivitesini önler.

Erlotinib: Yüksek selektivite göstererek EGF reseptör tirozin kinaz aktivitesini önler⁴⁷.

2.6.1.7. Hormonlar ve Hormon Antagonistleri

Bu ilaçlar hormona duyarlı tümörlerin tedavisinde kullanılan hormonlar ve onların antagonistidirler. Doğrudan DNA replikasyonu veya mitoz gibi temel hücresel fonksiyonlara etki etmezler; daha ziyade hücre

çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eden uyarı yolları üzerinde etkilidirler.

- a. Glukokortikoidler: Lösemi ve lenfomaların tedavisinde,
- b. Tamoksifen: Meme kanserinin tedavisinde,
- c. GnRH analogları: Prostat ve meme tümörlerinin tedavisinde,
- d. Antiandrojenler: Prostat kanserinde,
- e. Seks hormonu sentez inhibitörleri: Post menopozal meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır⁴⁵.

2.6.1.8. Monoklonal Antikorlar

Birçok tümör, büyüme faktörü reseptörünü aşırı düzeyde eksprese eder. Sonuçta hücre çoğalması ve tümör büyümesi stimüle edilir. Büyüme faktörlerinin aşırı eksprese edildiği kanserlerin tedavisinde; EGF reseptörünün ekstrasellüler bölgesine bağlanan monoklonal antikor (panitumumab, setuksimab, matuzumab), onkojenik reseptör HER2' ye bağlanan antikor (trastuzumab) veya büyüme faktörünün kendisini nötralize eden antikor (anti-VEGF monoklonal antikor, bevasizumab) gibi antikor temelli ilaçlar kullanılır.

Monoklonal antikorlar, hedeflendirilmiş ilaç tedavisinin örnekleridir ve genellikle diğer kanser ilaçlarıyla kombine edilirler⁴⁸.

2.6.1.9. Diğer Antineoplastik İlaçlar

Talidomib: Myeloma tedavisinde yararlı bulunmuştur. Gen transkripsiyonu, anjiyojenez, proteozom fonksiyonları üzerinde etkilidir.

Bortezomib: Boron içeren tripeptittir ve proteozom fonksiyonlarını inhibe eder. Myeloma tedavisinde kullanılır.

Krisantaspaz: Asparaginaz enzim preparatıdır. Asparajini aspartik asit ve amonyuma dönüştürür. Asparajini sentezleme kapasitesi olmayan ve ekzojen kaynaklara ihtiyaç duyan akut lenfoblastik lösemilerin tedavisinde etkilidir. Normal hücreler asparajini sentezlediği için bu ilaç oldukça seçicidir ve kemik iliğinde çok az baskılayıcı etkisi vardır. Bulantı, kusma, SSS depresyonu, anafilaktik reaksiyonlar ve karaciğer tahribatı oluşturabilir³⁴.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ekstreler

Etanol (Merck)

DMEM (Gibco)

DMEM Fenol Red(-) (Gibco)

DMSO (Merck)

MTT Reagent (Invitrogen)

Fetal Sığır Serum Gold (PAA)

Tripan Blue (Gibco)

PBS (Gibco)

Penisilin-Streptomisin (PAA)

Tripsin-EDTA (PAA)

Cyclotrichium niveum (Etanollü ekstre)

Cyclotrichium niveum (Sulu ekstre)

Cyclotrichium niveum (Diklorometanlı ekstre)

Cyclotrichium niveum (Etil asetatlı ekstre)

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hassas terazi (Shimadzu)

Mikropipet (Eppendorf Research)

Vortex (Firlabo)

Santrifüj (Nüve)

Su banyosu (Nüve)

Laminar Akımlı Kabin (Clean Air EN 12469)

CO₂ Etüvü (Sanyo)

Faz Kontrast - Floresan Mikroskop (Leica)

xCELLigence RTCA DP (Roche)
Mikroplak Santrifüjü (OrtoAlresa)
Microplate Reader (Molecular Devices)

Deneylerde kullanılan HeLa ve HepG2 hücreleri, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç Dr. Rengül Çetin Atalay'dan, MCF-7 hücreleri ise Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mesude İşcan' dan alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Deneylerde kullanılacak olan HeLa, HepG2 ve MCF hücre dizileri, ayrı zamanlarda %10 serum, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde kültür flasklarına ekilmiştir. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde tutdukları alanı %70-80 oranında kaplayıncaya kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılarak çoğaltılmışlar ve daha sonra pasajlanmışlardır. Pasajlama işlemi sırasında, laminar akımlı kabin altında %70-80 konfluensiye ulaşmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve 37°C sıcaklıktaki PBS ile bir kez yıkanmıştır. Daha sonra 37°C sıcaklıktaki % 0.25'lik Trypsin-EDTA solusyonu ilavesiyle hücreler 5 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin zeminden ayrıldığı mikroskop ile doğrulandıktan sonra 7-8 ml besiyeri ilave edilmiş ve flask içeriği steril falkona aktarılmıştır. 10 dk 400 g (1500 rpm), 25°C'de santrifüj işlemi sonrasında meydana gelen süpernatant atılmıştır. Pellet pasajlama için gereken hacimde besiyeri ile resüspande edilmiş ve deney planına uygun olarak kültür flasklarına bölünmüştür.

Deney planına göre, belirli pasaj sayısına ulaşan hücreler pasajlama işleminin son aşamasındaki santrifüj sonrası 5 ml besiyeri ile resüspande edilip tripan mavisi metodu ile sayılmıştır. Bu işlem sırasında; resüspande hücrelerden 20 µl bir eppendorfa alınmış ve üzerine 20 µl % 4'lük tripan mavisi eklenmiştir. Neubauer laminının üzerine lamel kapatılmış ve tripan mavisi ile karıştırılan hücre süspansiyonundan pipet ile 15 µl lam ile lamelin birleştiği noktadan yavaşça bırakılmıştır. Lam mikroskop altına alınmış ve boyanmamış yani canlı hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir (16 küçük kareden oluşan büyük kareler sayıldı). Aşağıda verilmiş olan formül üzerinden ml'deki hücre sayısı hesaplanmış ve deney planına uygun olarak çukur başına ekilecek hücre sayısına göre besiyeri ilave edilerek kültür kaplarına hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Hücre/ml} = \frac{\text{Sayılan toplam canlı hücre} \times 2 \times 10^4}{\text{Sayılan kare sayısı}}$$

3.2.2. Faz Kontrast Mikroskopisi

%70-80 oranında konfluent hücrelere ekstrelerin uygulanmasından 48 saat sonra, hücreler faz kontrast mikroskobu altında x20 büyütme objektifle incelenmiştir. Verilen ekstrenin konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelere ait fotoğraflar çekildi ve ekstrenin sitotoksik etkisi gözlenmiştir.

3.2.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Sitotoksik Etkinin Gözlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde, hücrelerin ekildiği ve yüzeyinde elektrotların bulunduğu özel plakalar mevcuttur. Hücreler plaka yüzeyine tutundukça elektrotlardan verilen elektrik akımına karşı direnç oluşturur. Tutunan hücre sayısı arttıkça bu direnç de artar. Elde edilen bu direnç değeri 'hücre indeksi' adı verilen bir parametre ile ölçülür⁴⁸.

Belirli pasaj sayısına ulaşan hücreler tripan mavisi yöntemi ile sayılarak çukur başına 8000-10000 hücre olacak şekilde tabanında elektrotların bulunduğu 16'lı e-plaklara ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin besiyeri (%10 FBS+ DMEM+ %1 penisilin streptomisin) değiştirilmiştir. Hücre indeksi değeri 0.8-1.5 aralığına ulaştığında farklı konsantrasyonlarda *C. niveum*'a ait ekstreler uygulanmıştır. 48 saat boyunca hücre indeksinde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir. Hücrelerin maksimum hücre indeksindeki yüzde değişikliklerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 5 programı üzerinden yapılmıştır.

3.2.4. MTT Analizi

Ayrı ayrı 96-kutucuklu plakların her çukuruna HeLa, HepG2, MCF-7 hücreleri ekilmiştir. %70 konfluent olan hücrelerin besiyeri 24 saat sonra değiştirilmiş (fenol kırmızısı içermeyen full medyum ile) ve ekstreler hücrelere uygulanmıştır. Hücreler daha sonra ekstrelerin etkisi gözlenene dek 1-2 gün inkübatörde bekletilmiştir. Ekstrelerin etkisi görüldükten sonra mikropalak santrifüjü kullanılarak 10 dk 400 g RT'de santrifüj edilmiştir. Ölü hücrelerin atılmadığından emin olunacak şekilde dikkatlice medyum uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 200 µl fenol kırmızısı içermeyen full besiyeri ilave edilmiştir. Her bir örneğin üzerine 50 µl MTT solüsyonu (1 g/L, PBS de hazırlanmış) eklenmiş ve hücreler 3 saat inkübatörde bekletilmiştir. Ayrıca (-) kontrol olarak boş bir çukura sadece 200 µl besiyeri ve başka bir boş çukura da 200 µl besiyeri + 50 µl MTT solüsyonu ilave edilmiştir. Mikropalak santrifüjü ile 10 dk 400g RT'de santrifüj yapıldı ve süpernatant atılmıştır. Pelletin (formazan kristalleri) üzerine 160 µl DMSO ilave edilmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi için çalkalayıcıda 10 dk bekletilmiştir. Yeni bir 96-kutucuklu plağa çukurlardan alınan 100 µl sıvılar konulmuş ve 570 nm' de absorbanları okutulmuştur. Absorbans değerlerine göre canlı ve ölü hücrelerin konsantrasyon bağımlı oranları

hesaplanmıştır. Böylece ekstrelerin sitotoksik etkisine ait IC₅₀ değerleride hesaplanmıştır.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

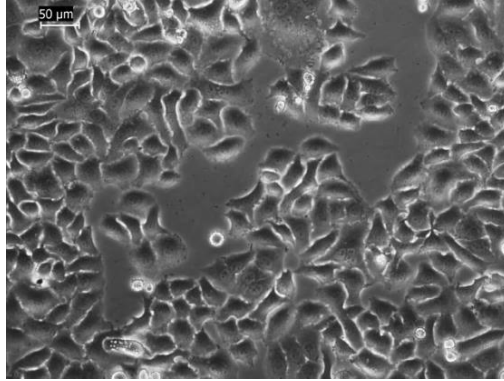
Verilerin istatistiksel analizinde t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında ise nonlineer regresyon analizinden yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

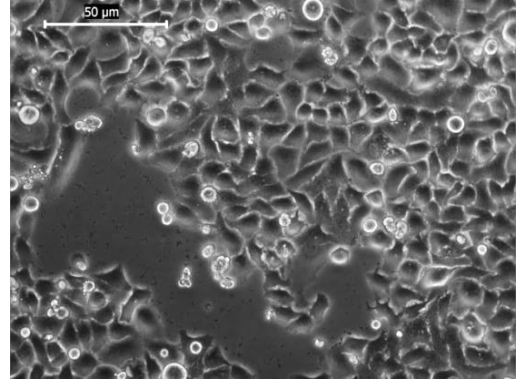
4.1. *Cyclotrichium niveum* Ekstrelerinin HeLa Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

Cyclotrichium niveum 'un sulu ve etanollü ekstreleri HeLa hücrelerinde, 300 µg/ml maksimum konsantrasyonda dahi herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir (Resim 2).

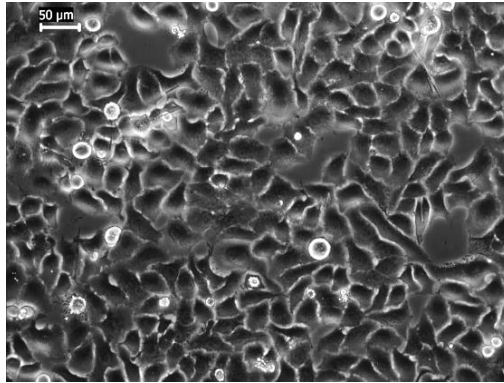
Kontrol H₂O



300 µg/ml sulu ekstre



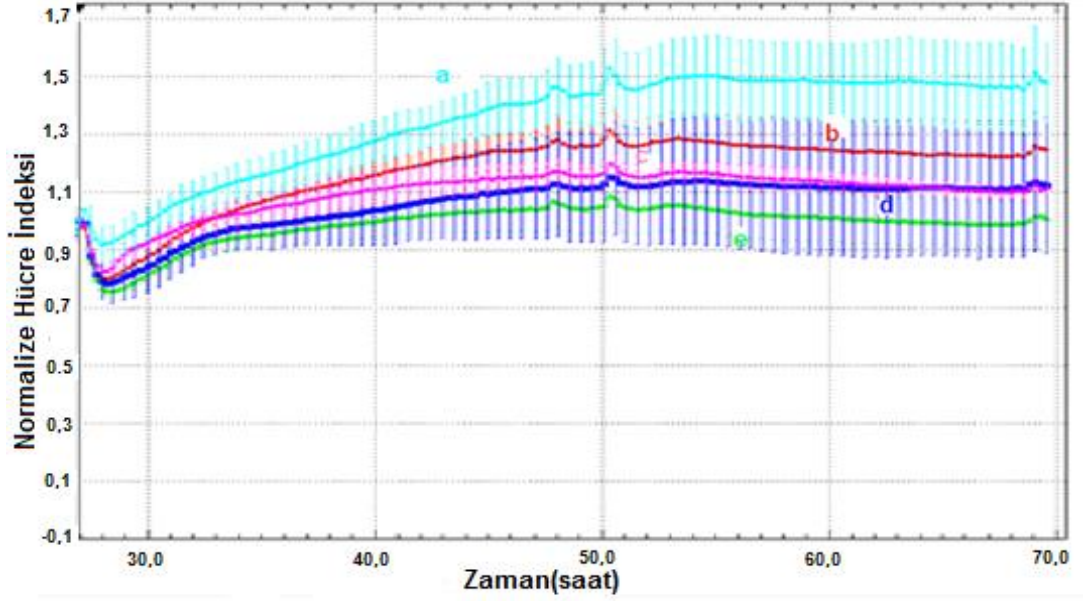
300 µg/ml etanollü ekstre



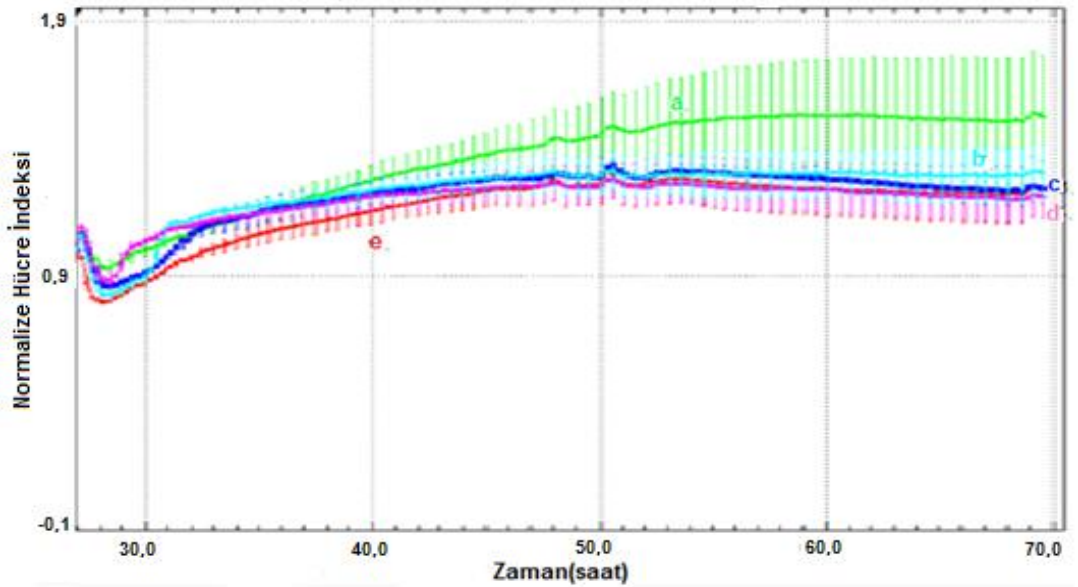
Resim 2. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyan maksimum konsantrasyonda uygulanan sulu ve etanollü ekstreler (sulu ve etanollü ekstreler suda çözülmektedir).

Sulu ve etanollü ekstrelerin xCELLigence RTCA sistemi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen zaman-

hücre indeksi grafikleri bu ekstrelerin etkisiz olduğunu göstermektedir (Grafik 2 ve 3).



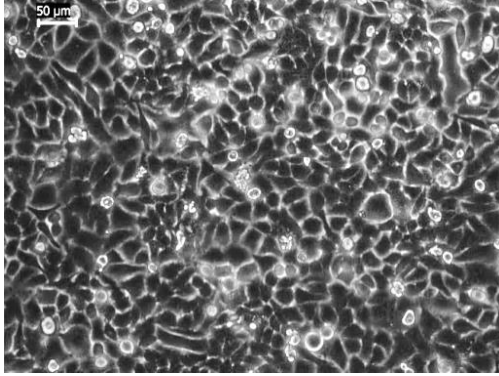
Grafik 2. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan sulu ekstrenin farklı konsantrasyonlarda uygulanışı. a, 300 µg/ml sulu ekstre; b, Kontrol su; c, 100 µg/ml sulu ekstre; d, 30 µg/ml sulu ekstre; e, 10 µg/ml sulu ekstre



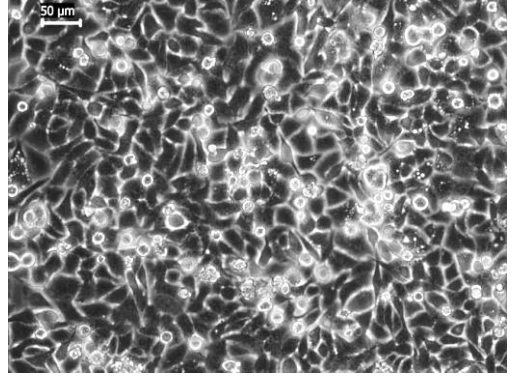
Grafik 3. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan etanollü ekstrenin farklı konsantrasyonlarda uygulanışı. a, 10 µg/ml etanollü ekstre; b, 300 µg/ml etanollü ekstre; c, 30 µg/ml etanollü ekstre; d, 100 µg/ml etanollü ekstre; e, Kontrol su

Diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Resim 3).

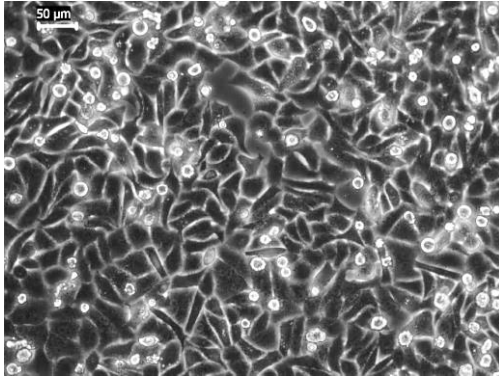
Kontrol etanol



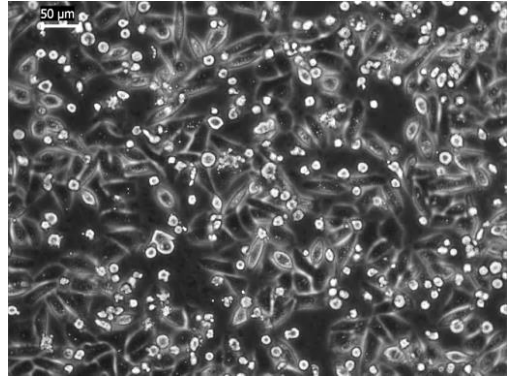
30 µg/ml diklorometanlı ekstre



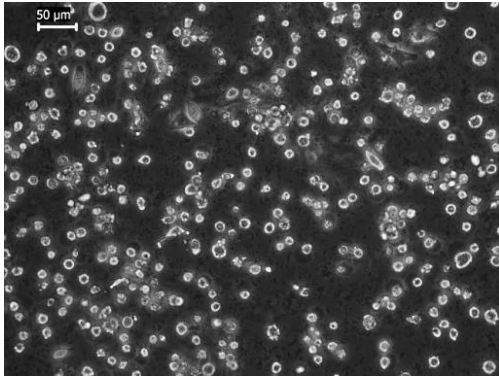
48 µg/ml diklorometanlı ekstre



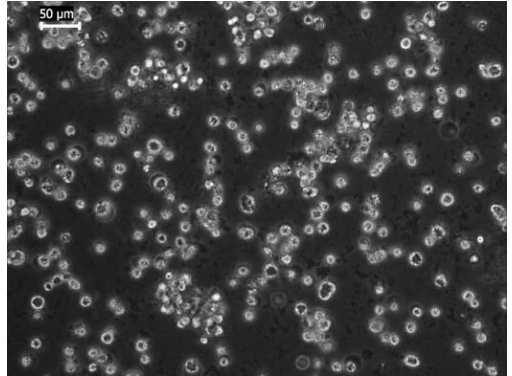
100 µg/ml diklorometanlı ekstre



180 µg/ml diklorometanlı ekstre

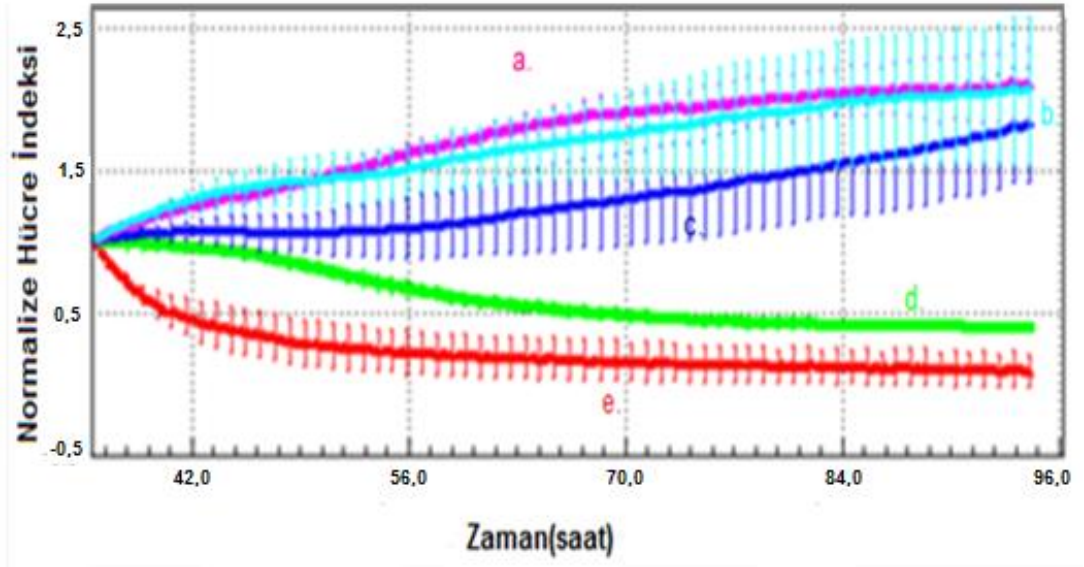


300 µg/ml diklorometanlı ekstre

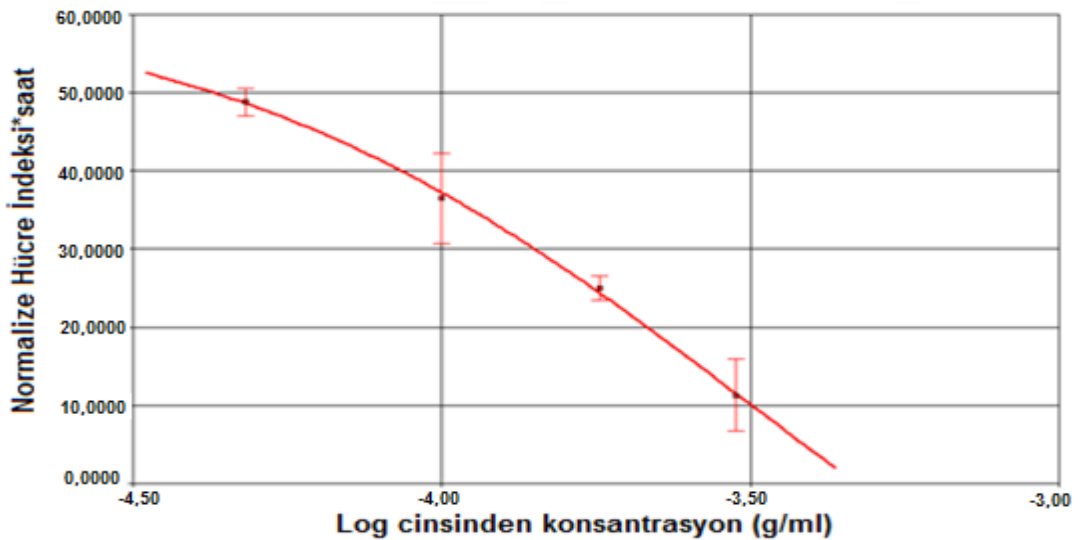


Resim 3. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki.

Diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki (Grafik 4) ve IC₅₀ grafiği (Grafik 5) xCELLigence RTCA ile çıkarılmış olup, ekstrenin IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.



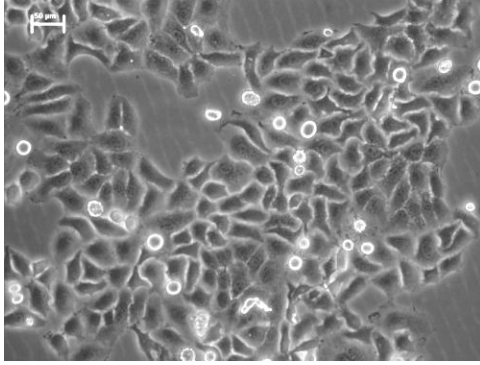
Grafik 4. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, 48 µg/ml CH₂Cl₂'li ekstre; b, Kontrol etanol; c, 100 µg/ml CH₂Cl₂'li ekstre; d, 180 µg/ml CH₂Cl₂'li ekstre; e, 300 µg/ml CH₂Cl₂'li ekstre



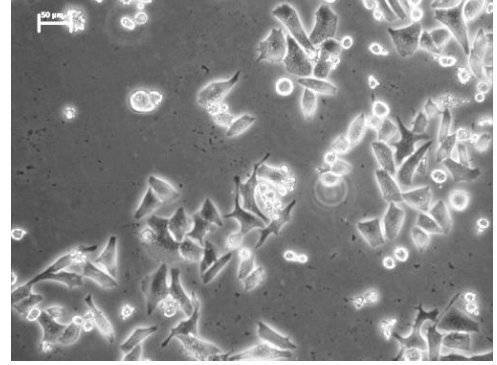
Grafik 5. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin IC₅₀ grafiği
IC₅₀: 353.0 ± 84.30 µg/ml

Etil asetatlı ekstreinin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Resim 4).

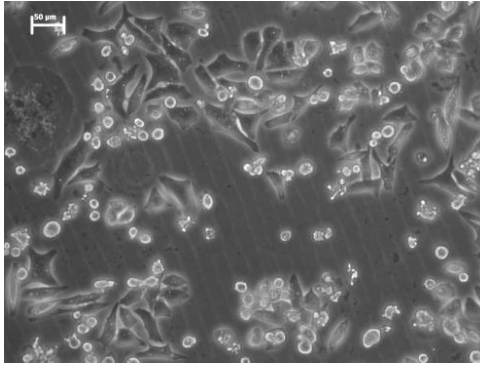
Kontrol etanol



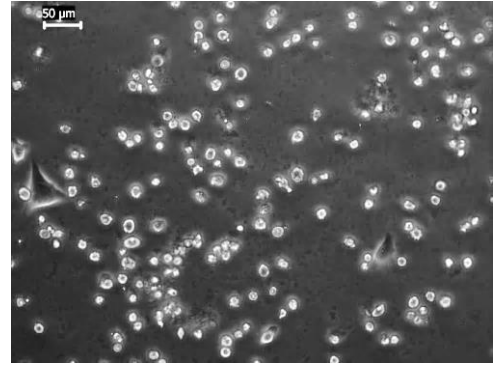
30 µg/ml etil asetatlı ekstre



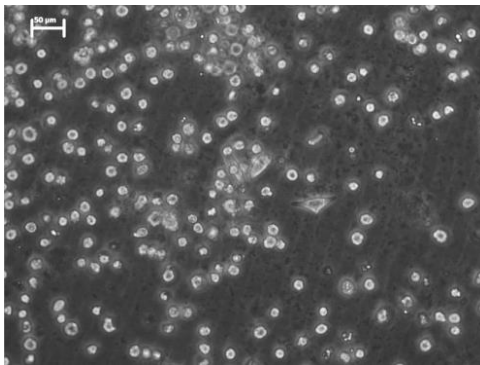
48 µg/ml etil asetatlı ekstre



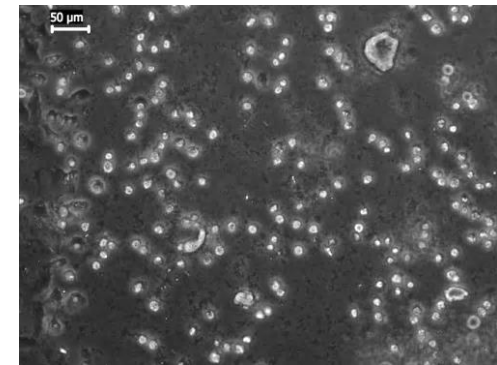
100 µg/ml etil asetatlı ekstre



180 µg/ml etil asetatlı ekstre

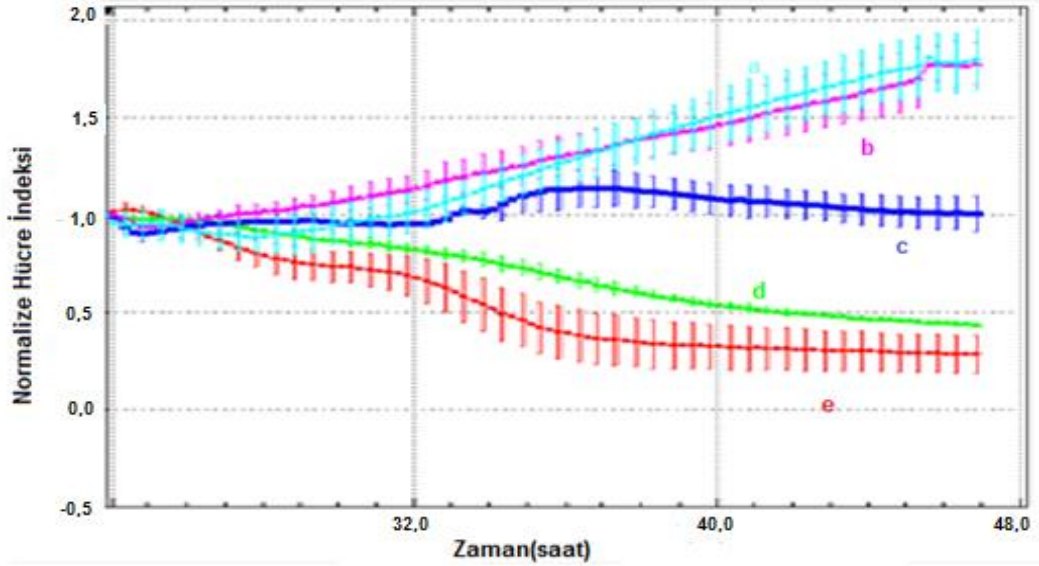


300 µg/ml etil asetatlı ekstre

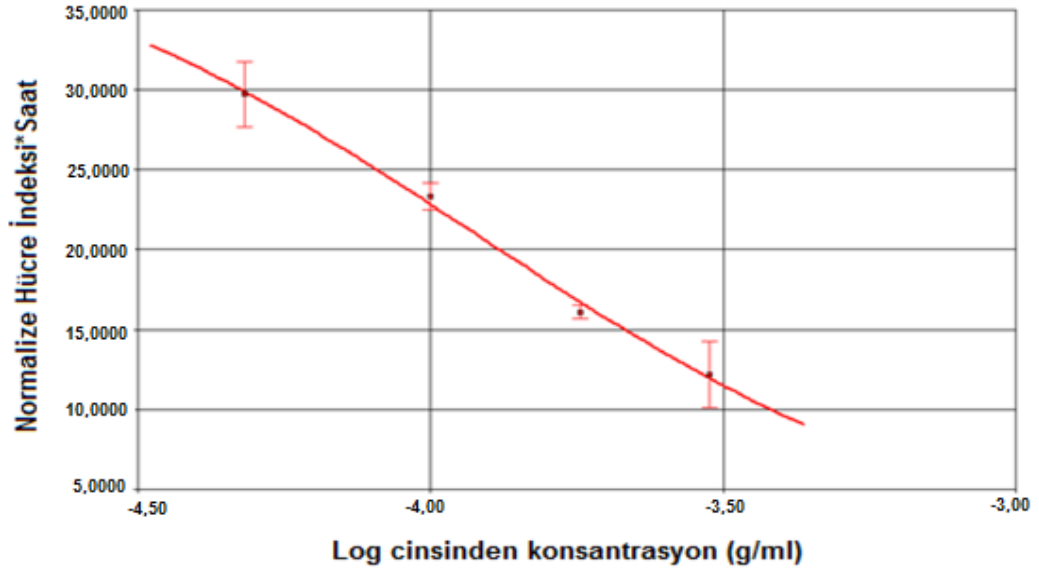


Resim 4. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstreinin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki.

Etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki (Grafik 6) ve IC₅₀ grafiği (Grafik 7) xCELLigence RTCA ile çıkarılmış olup, ekstrenin IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.



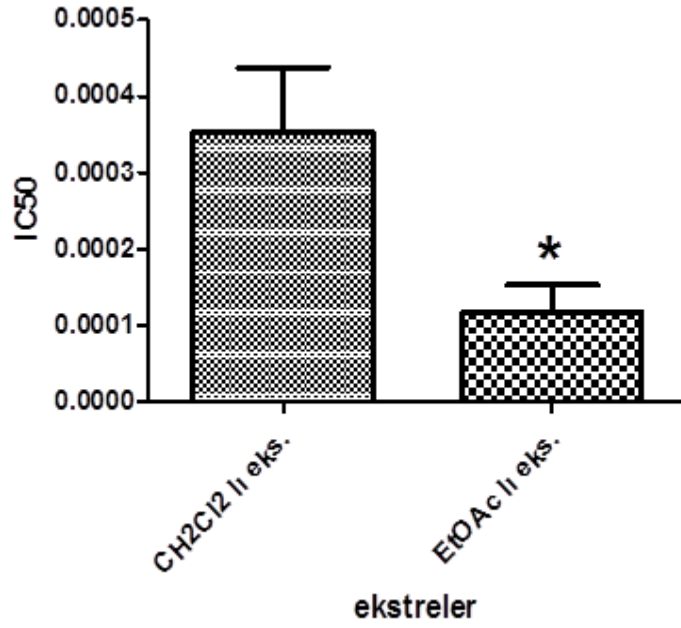
Grafik 6. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, Kontrol etanol; b, 48 µg/ml EtOAc'lı ekstre; c, 100 µg/ml EtOAc'lı ekstre; d, 180 µg/ml EtOAc'lı ekstre; e, 300 µg/ml EtOAc'lı ekstre



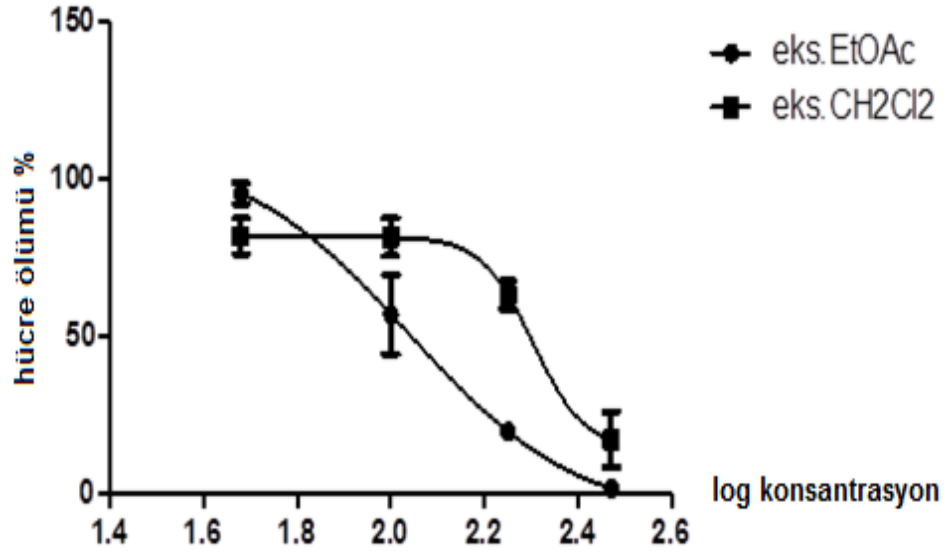
Grafik 7. HeLa hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin IC₅₀ grafiği.

IC₅₀: 117.0 ± 36.24 µg/ml

HeLa hücrelerinde etil asetatlı ekstrenin diklorometanlı ekstreya göre daha potent olduğu IC_{50} değerlerindeki anlamlı farklılığa dayanılarak bulunmuştur (Grafik 8). Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin oluşturduğu sitotoksik etki ve IC_{50} değerleri MTT analiz yöntemiyle de gösterilmiş ve hesaplanmıştır (Grafik 9). xCELLigence RTCA ve MTT yöntemiyle bulunan sonuçlar birbiriyle paralellik göstermektedir.



Grafik 8. HeLa hücrelerinde, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelere ait IC_{50} değerleri arasındaki anlamlı farklılığı gösteren grafik

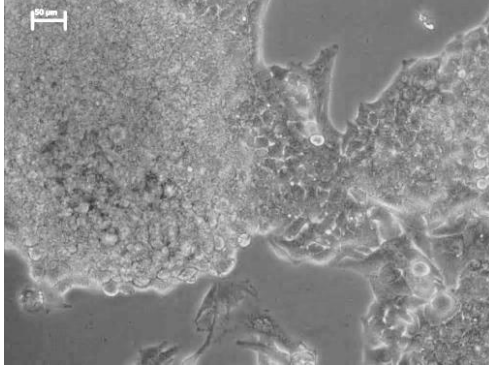


Grafik 9. HeLa hücrelerinde, MTT analiz yöntemiyle yapılan, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler için IC₅₀ grafiği. Diklorometanlı ekstre IC₅₀: 200.8 ± 1.207 µg/ml, etil asetatlı ekstre IC₅₀: 109.3 ± 3.1696 µg/ml

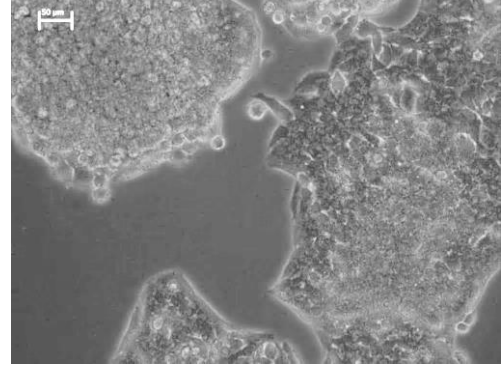
4.2. *Cyclotrichium niveum* Ekstrelerinin HepG2 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

Cyclotrichium niveum'a ait sulu ve etanollü ekstreler HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir (Resim 5). Ayrıca xCELLigence RTCA sistemi kullanılarak sulu ve etanollü ekstrelerin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen zaman-hücre indeksi grafikleri bu ekstrelerin etkisiz olduğunu göstermektedir (Grafik 10). Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler ise sitotoksik etki göstermekle birlikte, en yüksek konsantrasyon olan 300 µg/ml'de dahi hücrelerin tamamını öldürememiştir. Ekstrelerin daha yüksek konsantrasyonda çözünürlük problemi olduğu için 300 µg/ml'nin üzerine çıkılamamıştır. Bu nedenle HepG2 hücrelerinde etkili ekstreler için IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır. Bununla birlikte farklı konsantrasyonlarda hücrelerin canlılık oranları hesaplanmıştır.

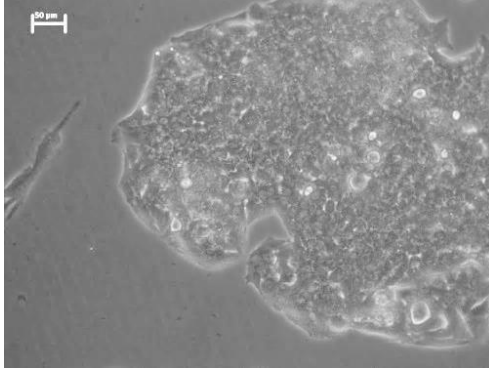
Kontrol H₂O



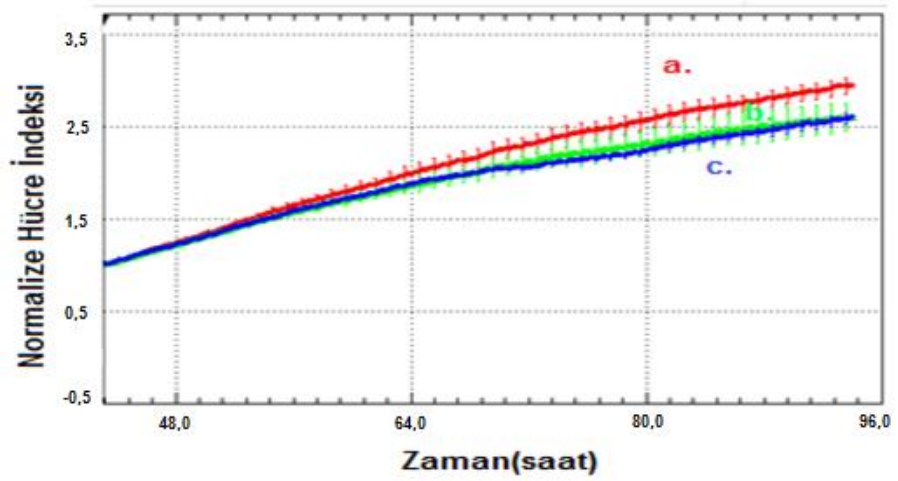
300 µg/ml sulu ekstre



300 µg/ml etanollü ekstre



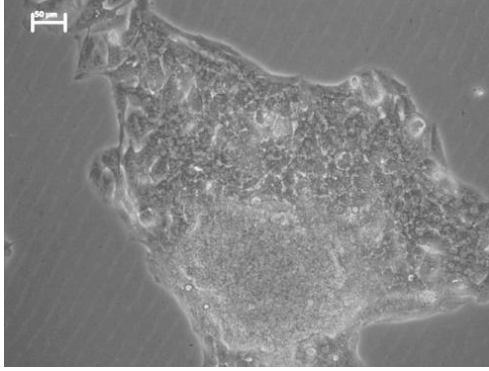
Resim 5. HepG2 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyan maksimum konsantrasyonda uygulanan sulu ve etanollü ekstrere (sulu ve etanollü ekstrere suda çözülmektedir)



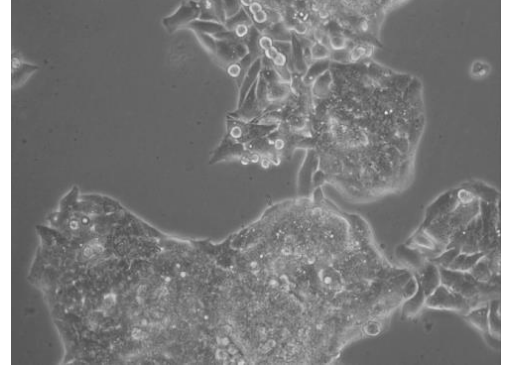
Grafik 10. HepG2 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmeyan sulu ve etanollü ekstrinin maksimum konsantrasyonda uygulanışı. a, 300 µg/ml sulu ekstre; b, 300 µg/ml etanollü ekstre; c, Kontrol su

Etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Resim 6).

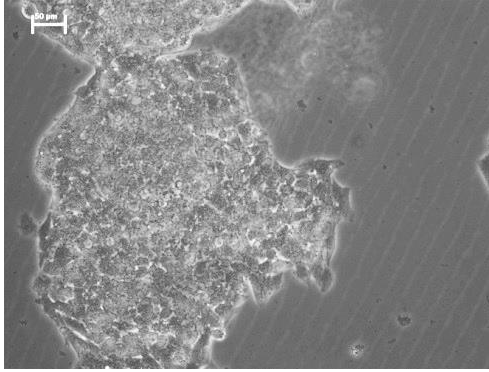
Kontrol EtOH



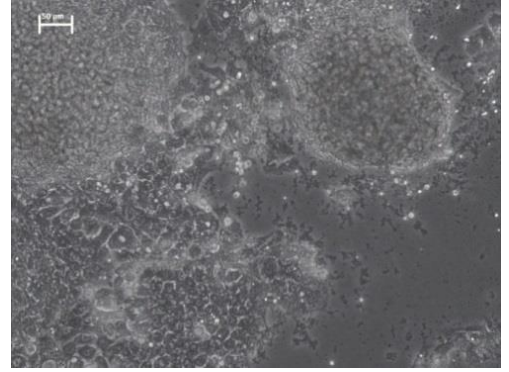
30 µg/ml etil asetatlı ekstre



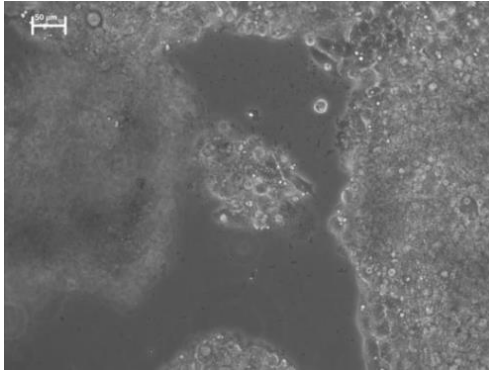
48 µg/ml etil asetatlı ekstre



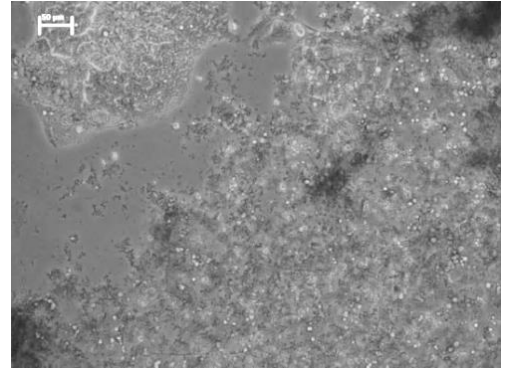
100 µg/ml etil asetatlı ekstre



180 µg/ml etil asetatlı ekstre

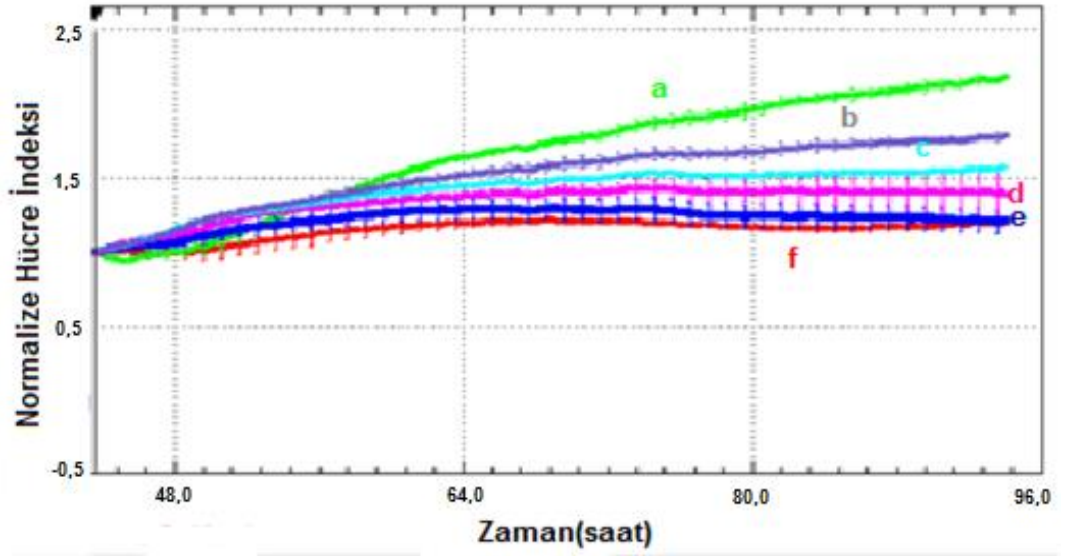


300 µg/ml etil asetatlı ekstre



Resim 6. HepG2 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

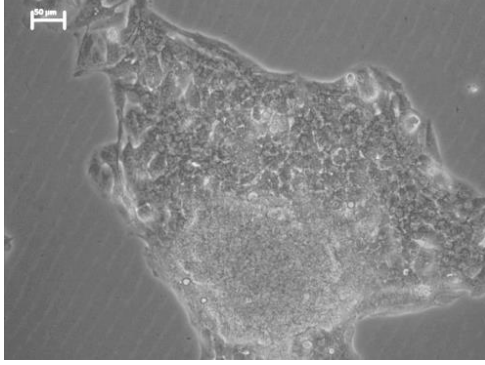
Etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki xCELLigence RTCA sistemiyle hazırlanan grafikte gösterilmiştir (Grafik 11).



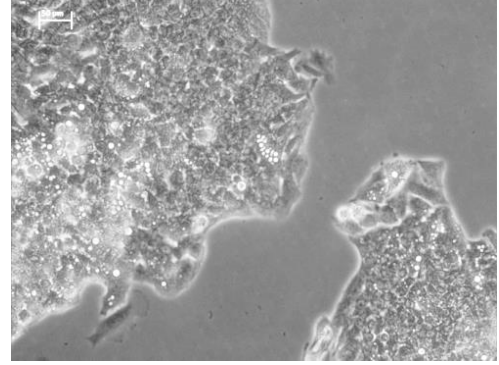
Grafik 11. HepG2 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, Kontrol EtOH; b, 30 µg/ml etil asetatlı ekstre; c, 48 µg/ml etil asetatlı ekstre; d, 100 µg/ml etil asetatlı ekstre; e, 180 µg/ml etil asetatlı ekstre; f, 300 µg/ml etil asetatlı ekstre

Diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Resim 7).

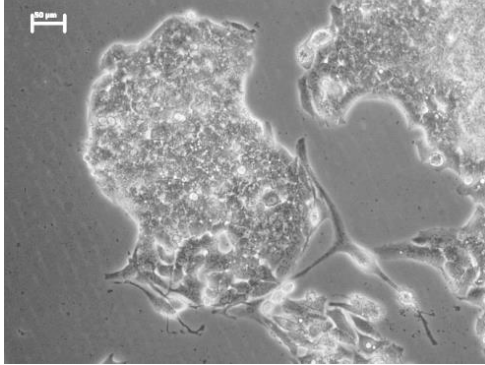
Kontrol EtOH



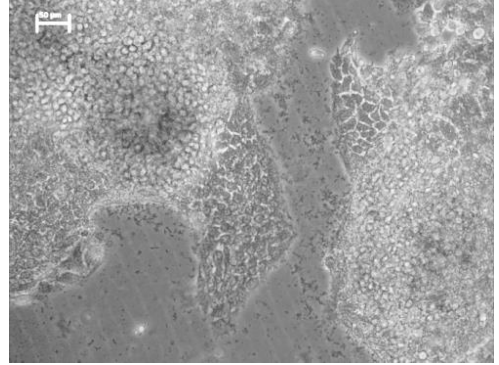
30 µg/ml diklorometanlı ekstre



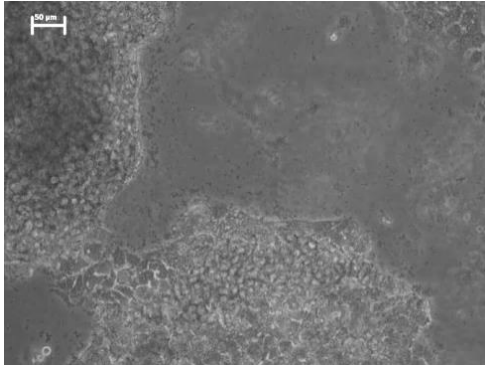
48 µg/ml diklorometanlı ekstre



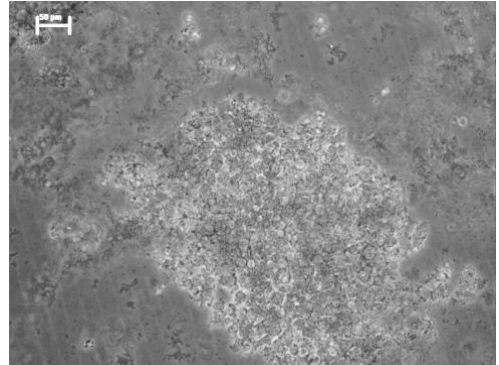
100 µg/ml diklorometanlı ekstre



180 µg/ml diklorometanlı ekstre

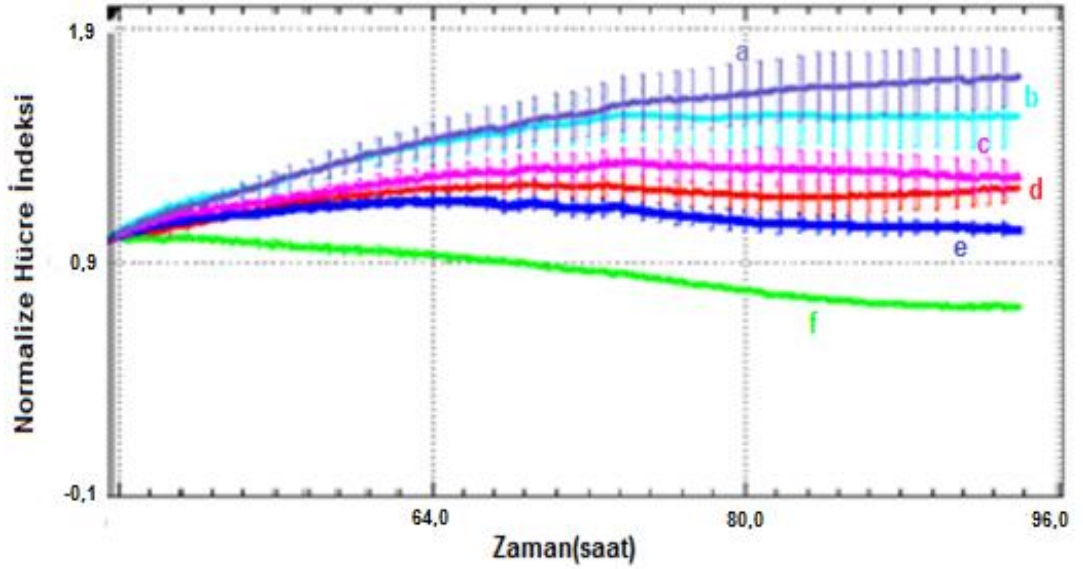


300 µg/ml diklorometanlı ekstre



Resim 7. HepG2 hücrelerinde *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

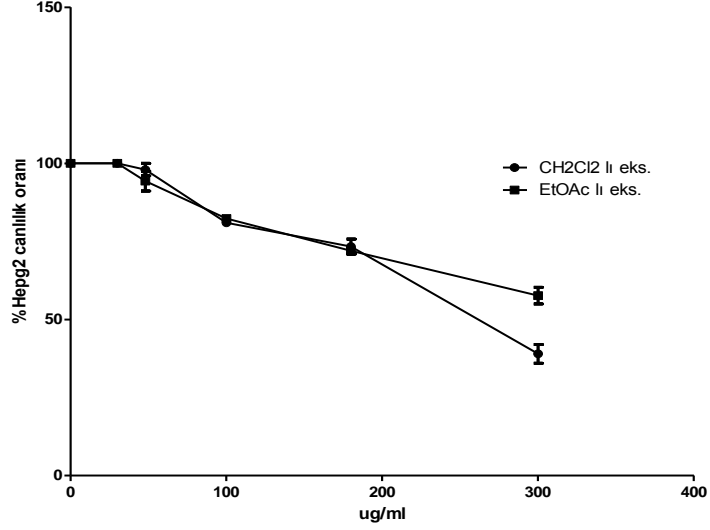
Diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki xCELLigence RTCA sistemiyle hazırlanan grafikte gösterilmiştir (Grafik 12).



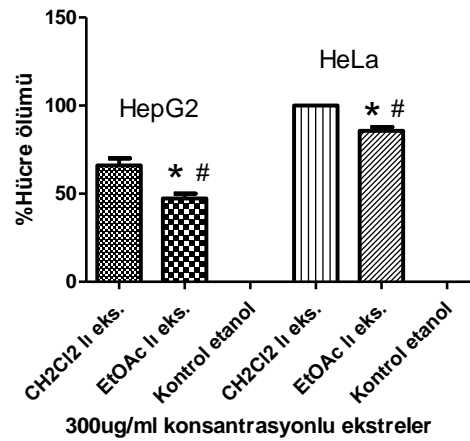
Grafik 12. HepG2 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, 30 µg/ml diklorometanlı ekstre; b, 48 µg/ml diklorometanlı ekstre; c, 100 µg/ml diklorometanlı ekstre; d, Kontrol EtOH; e, 180 µg/ml diklorometanlı ekstre; f, 300 µg/ml diklorometanlı ekstre

Diklorometanlı ekstrenin yüksek dozlarda sitotoksik aktivitesi etil asetatlı ekstreye göre daha fazla olmakla birlikte hücrelerin tamamını öldürmemektedir. Düşük dozlardaki hücre indeksi artışı ise ekstrenin HepG2 hücreleri üzerinde hücre yaşlanmasına (senescence) bağlı yüzey alanı artışı yaptığını düşündürmektedir. HepG2 hücrelerinde IC₅₀ değeri hesaplanamamış olmakla birlikte ekstrelerin hücreler üzerinde ki sitotoksik aktivitesi yüzde canlılık cinsinden incelenmiştir (Grafik 13). HeLa ve HepG2 hücrelerinde 300 µg/ml dozda uygulanan etil asetatlı ve diklorometanlı

ekstrelerin yol açtığı hücre ölümleri de yüzde cinsinden kıyaslanmıştır (Grafik 14).



Grafik 13. Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu yüzde cinsinden HepG2 canlılık oranları.



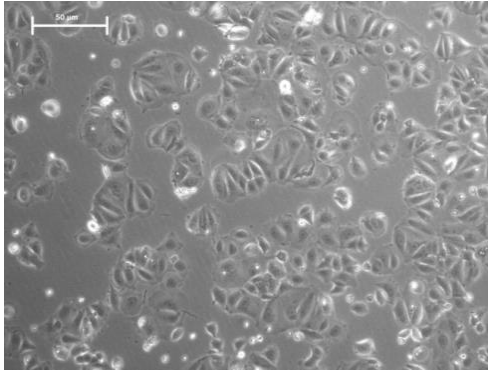
*:CH₂Cl₂ lı ekstre ile EtOAc lı ekstre arasındaki anlamlı farklılık
#:HeLa ve HepG2 hücreleri arasındaki anlamlı farklılık

Grafik 14. HepG2 ve HeLa hücrelerinde diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin 300 µg/ml konsantrasyonda oluşturdukları yüzde cinsinden hücre ölümü

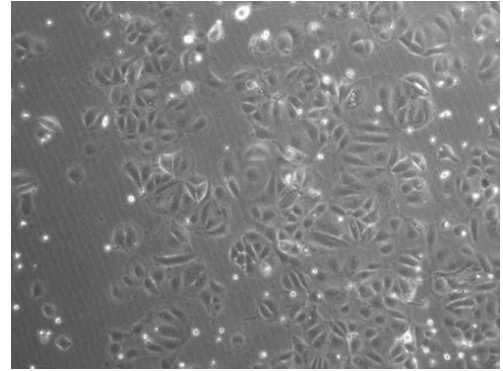
4.3. *Cyclotrichium niveum* Ekstrelerinin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi

MCF-7 hücreleri ile yapılan çalışmalarda diğer hücre tiplerinde görüldüğü gibi bitkinin su ve etanolde hazırlanan ekstreleri en yüksek konsantrasyonda dahi sitotoksik etki göstermemiştir (Resim 8). Ancak diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler konsantrasyon bağımlı sitotoksik etki göstermiştir (Resim 9 ve 10). MCF-7 hücrelerinde bu etkili iki ekstre için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

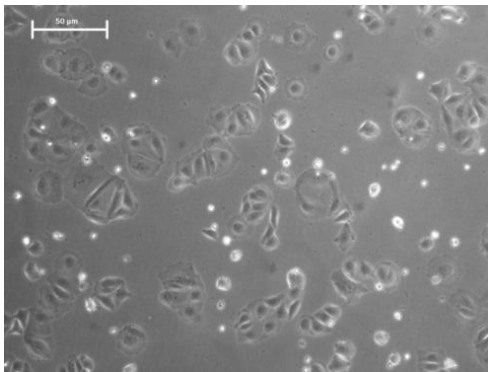
Kontrol H₂O



300 µg/ml sulu ekstre

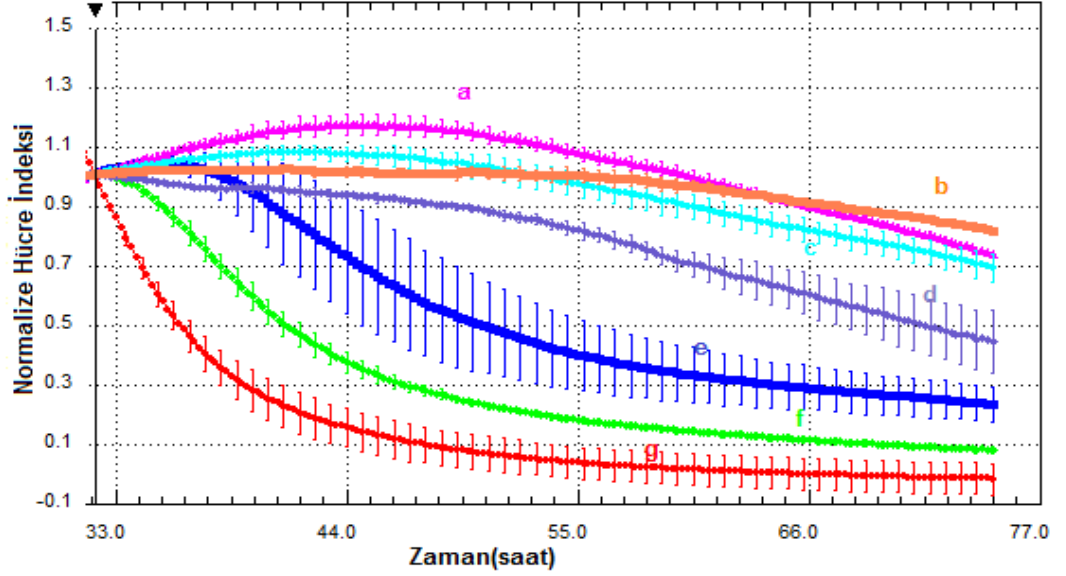


300 µg/ml etanolü ekstre

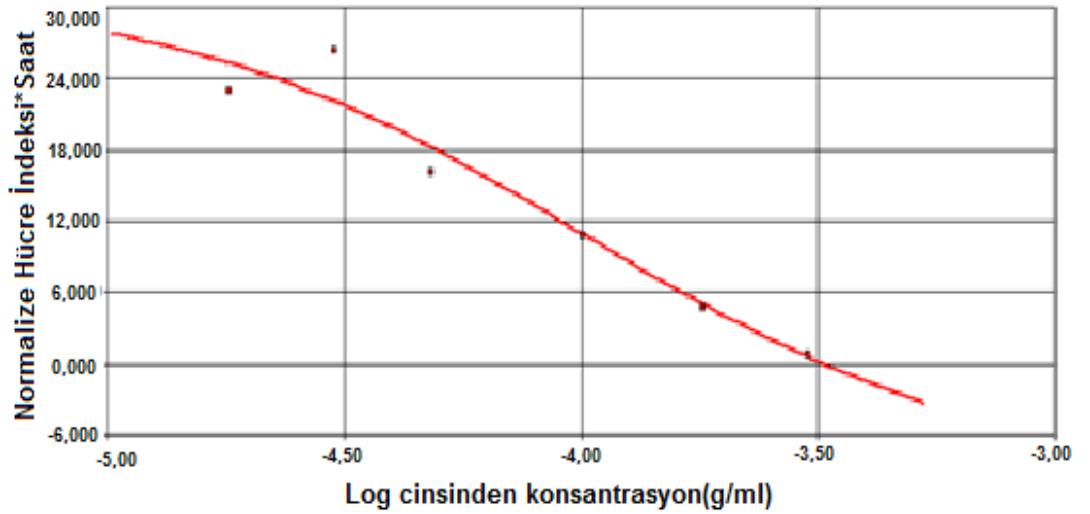


Resim 8. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait sitotoksik etki oluşturmayan maksimum konsantrasyonda hücelere uygulanan sulu ve etanolü ekstreler

Diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki (Grafik 15) ve IC₅₀ grafiği (Grafik 16) xCELLigence RTCA ile çıkarılmış olup, ekstrenin IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

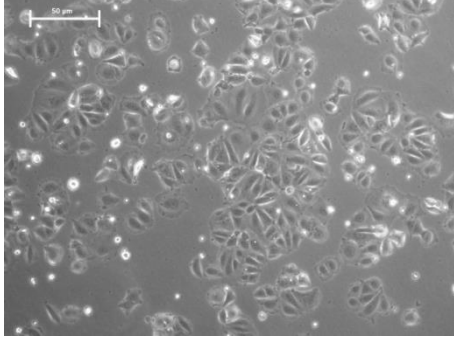


Grafik 15. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, 18 µg/ml diklorometanlı ekstre; b, Kontrol etanol; c, 30 µg/ml diklorometanlı ekstre; d, 48 µg/ml diklorometanlı ekstre; e, 100 µg/ml diklorometanlı ekstre; f, 180 µg/ml diklorometanlı ekstre; g, 300 µg/ml diklorometanlı ekstre

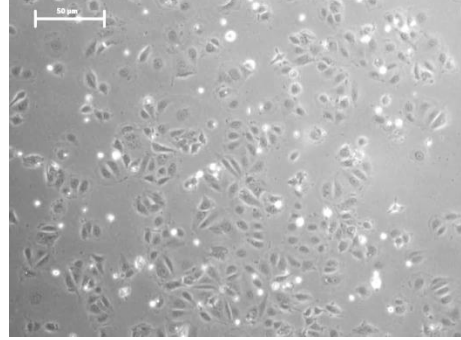


Grafik 16. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstrenin IC₅₀ grafiği.
IC₅₀: 114.8 ± 40.34 µg/ml

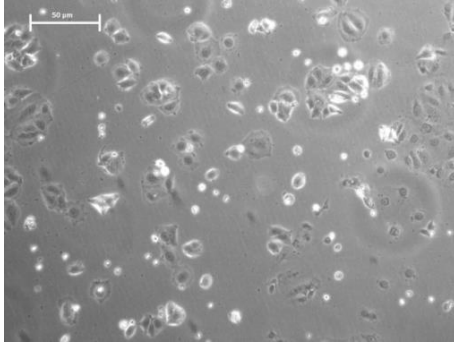
Kontrol EtOH



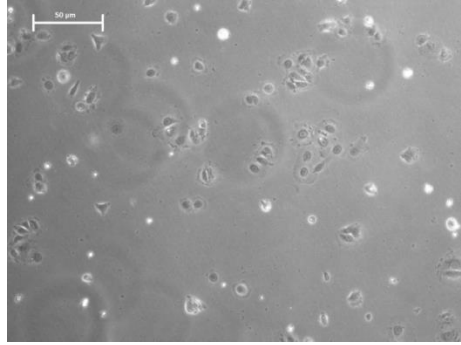
10 µg/ml diklorometanlı ekstre



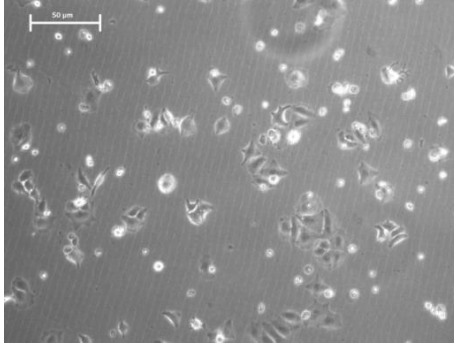
18 µg/ml diklorometanlı ekstre



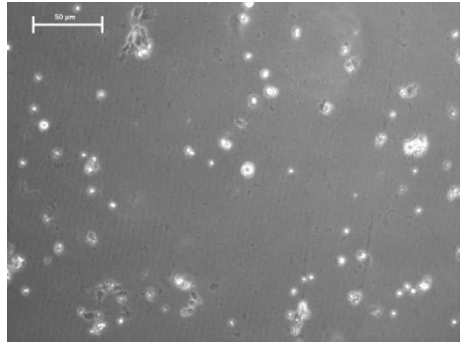
30 µg/ml diklorometanlı ekstre



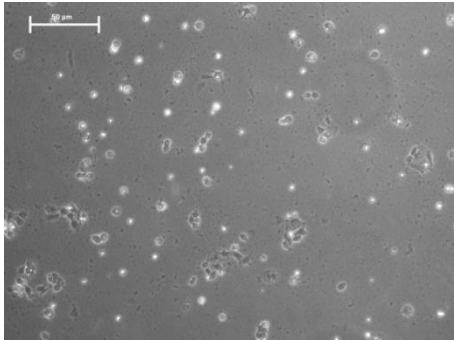
48 µg/ml diklorometanlı ekstre



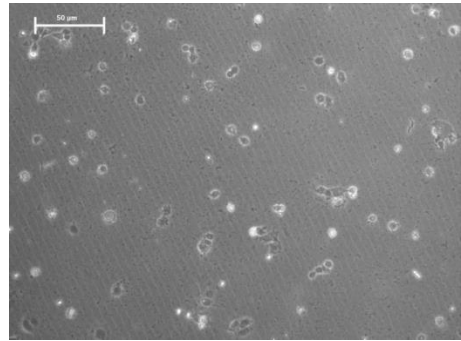
100 µg/ml diklorometanlı ekstre



180 µg/ml diklorometanlı ekstre

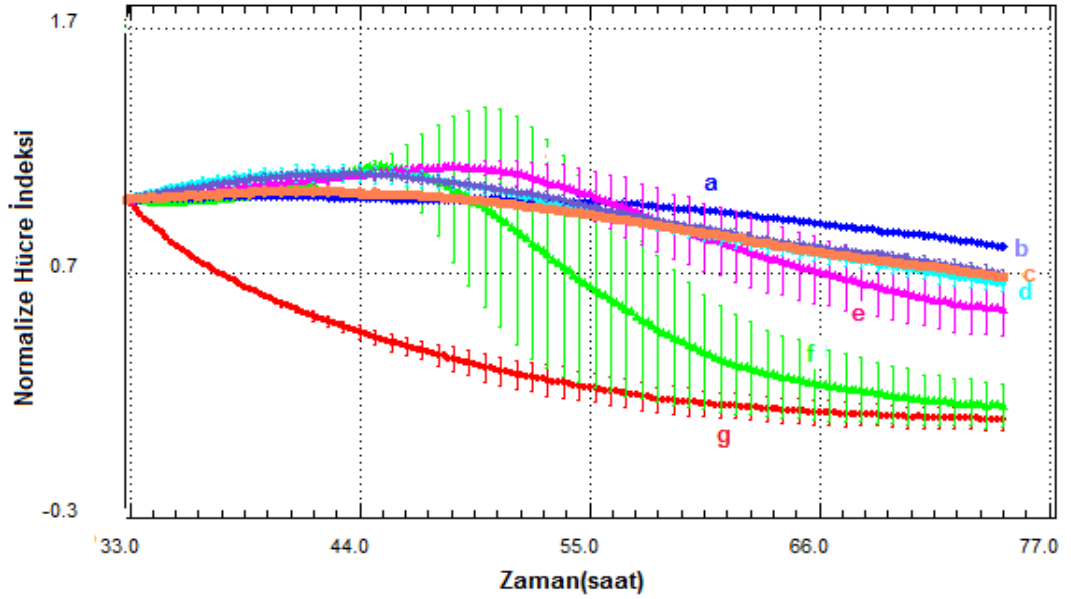


300 µg/ml diklorometanlı ekstre

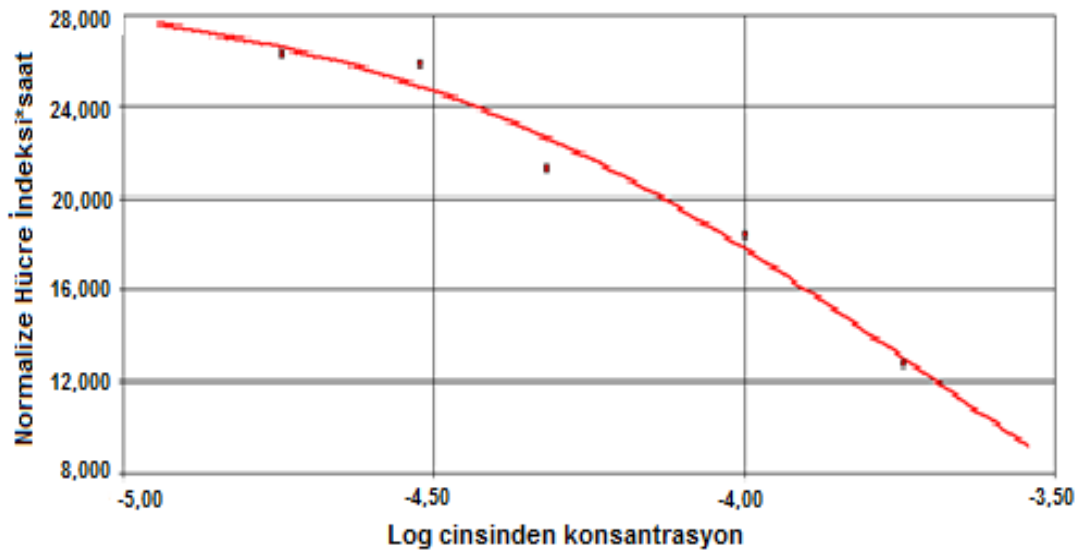


Resim 9. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait diklorometanlı ekstre nin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

Etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki (Grafik 17) ve IC₅₀ grafiği (Grafik 18) xCELLigence RTCA ile çıkarılmış olup, ekstrenin IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.



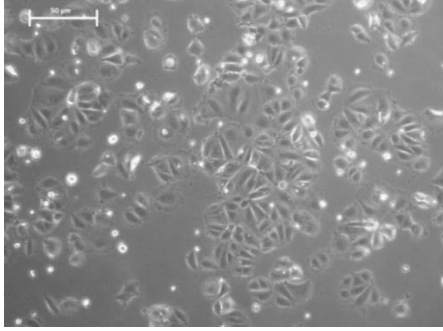
Grafik 17. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki. a, Kontrol EtOH; b, 30 µg/ml etil asetatlı ekstre; c, 18 µg/ml etil asetatlı ekstre; d, 48 µg/ml etilasetatlı ekstre; e, 100 µg/ml etil asetatlı ekstre; f, 180 µg/ml etil asetatlı ekstre; g, 300 µg/ml etil asetatlı ekstre



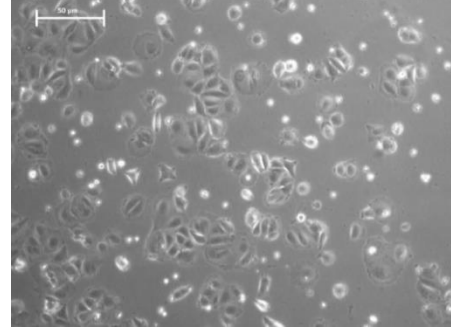
Grafik 18. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrenin IC₅₀ grafiği.

IC₅₀: 156.3 ± 19.86 µg/ml

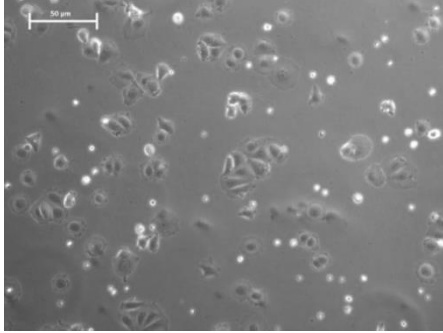
Kontrol EtOH



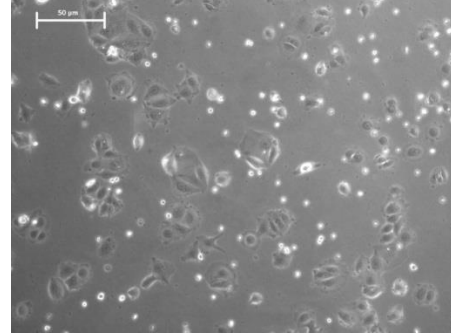
10 µg/ml etil asetatlı ekstre



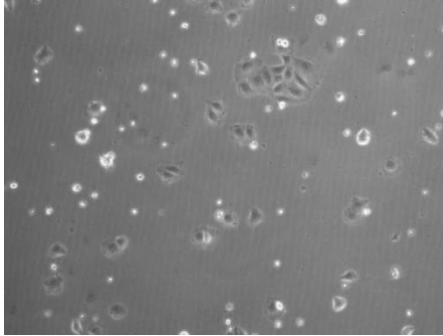
18 µg/ml etil asetatlı ekstre



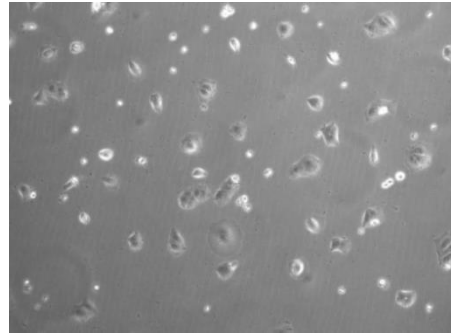
30 µg/ml etil asetatlı ekstre



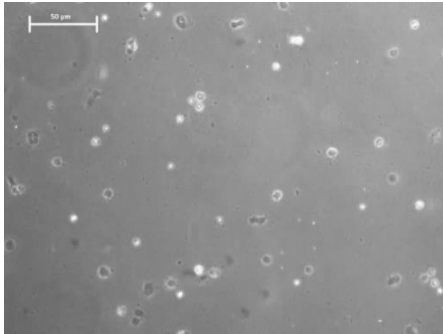
48 µg/ml etil asetatlı ekstre



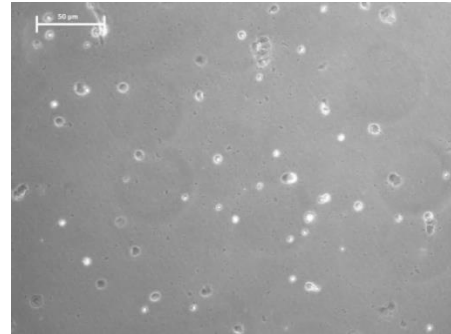
100 µg/ml etil asetatlı ekstre



180 µg/ml etil asetatlı ekstre

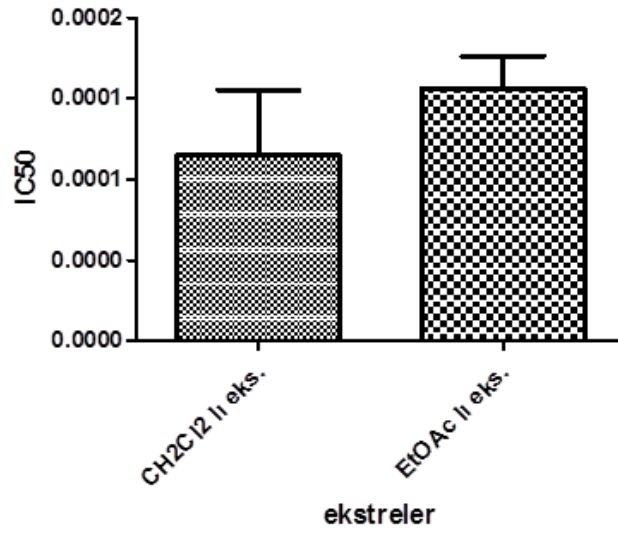


300 µg/ml etil asetatlı ekstre

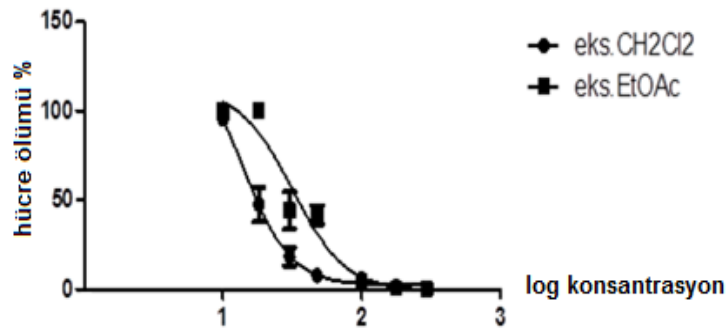


Resim 10. MCF-7 hücrelerinde, *C. niveum*'a ait etil asetatlı ekstrelin konsantrasyon bağımlı oluşturduğu sitotoksik etki

MCF-7 hücrelerinde diklorometanlı ekstrenin etil asetatlı ekstreye göre daha potent olduğu IC_{50} değerlerinden anlaşılmalı birlikte aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Grafik 19). Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin oluşturduğu sitotoksik etki ve IC_{50} değerleri MTT analiz yöntemiyle de gösterilmiş ve hesaplanmıştır (Grafik 20). xCELLigence RTCA ve MTT yöntemiyle bulunan sonuçlar birbiriyle paralellik göstermektedir.



Grafik 19. MCF-7 hücrelerinde diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler arasındaki IC_{50} farklılığını gösteren grafik



Grafik 20. MCF-7 hücrelerinde MTT analiz yöntemiyle yapılan, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelere ait IC_{50} grafiği. Diklorometanlı ekstre IC_{50} : $13.87 \pm 1.3658 \mu\text{g/ml}$, etil asetatlı ekstre IC_{50} : $31.87 \pm 1.1576 \mu\text{g/ml}$

Kıyaslama yaptığımızda HepG2 hücrelerinin etkili ekstrelelere karşı HeLa hücrelerinden daha dirençli olduğu göze çarpmaktadır. Ekstrelelere en büyük hassasiyeti ise MCF-7 hücreleri göstermiş olup daha düşük konsantrasyonlarda hücre ölümleri gerçekleşmiştir. IC₅₀ değerleri tablo halinde hücre çeşidine göre gösterilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerin HeLa ve MCF-7 hücrelerinde RTCA ve MTT yöntemiyle hesaplanan IC₅₀ değerleri

	HeLa		MCF-7	
	RTCA	MTT	RTCA	MTT
CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre IC ₅₀ (µg/ml)	353.0 ± 84.3	200.8 ± 1.207	114.8 ± 40.34	13.87 ± 1.3658
EtOAc'li ekstre IC ₅₀ (µg/ml)	117.0 ± 36.2	109.3 ± 3.169	156.3 ± 19.86	31.87 ± 1.1576

5. TARTIŞMA

Cyclotrichium niveum bitkisinden elde edilen dört farklı ekstre HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite bakımından değerlendirilmiştir. Ekstrelerden sulu ve etanollü olanlar üç hücre tipinde de sitotoksik etki göstermezken, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler tüm hücre tiplerinde ekstre ve hücre çeşidine bağlı olarak farklı oranlarda sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Bu durum sitotoksik etkili bileşik veya bileşiklerin diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerle geçtiğini, ancak sulu ve etanollü ekstrelerle geçmediğini göstermektedir. Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler maksimum konsantrasyonlarında (300 µg/ml) HeLa ve MCF-7 hücrelerini tamamen öldürürken, aynı konsantrasyonlarında HepG2 hücrelerini tamamen öldürememiştir. Bu durum HepG2 hücrelerinin ekstrelerle karşı daha dirençli olabileceğini düşündürmektedir.

Etil asetatlı ekstre, HeLa ve HepG2 hücrelerinde diklorometanlı ekstreye göre daha etkili bulunurken, MCF-7 hücrelerinde durum bunun tam tersini göstermektedir. Bu durum diklorometan ve etil asetatlı ekstrelerdeki sitotoksik bileşiklerin yapısal farklılıklarına, ekstre içindeki miktarlarına, oranlarına ve hücrelerin yapısal özelliklerine göre sitotoksik aktivitenin değişebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde *C. niveum* bitkisinin içeriğinde hangi fitokimyasal yapıların yer aldığına dair yeterli sayıda çalışma yoktur. Diğer taraftan, *C. niveum*'un sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya da literatürde rastlanmamıştır. Buna karşın, *C. niveum* bitkisinin de içinde bulunduğu Lamiaceae familyasına ait farklı türlerin sitotoksik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. *Salvia fruticosa* ve *Rosmarinus officinalis* bitkilerinin diklorometan-methanol karışımında hazırlanmış ekstreleri, MCF-7, L929sA ve MDA-MB 231 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiş ancak ekstrelerin bileşimi aydınlatılmamıştır⁴⁹.

Salvia vaseyi, *Salvia dorrii*, *Lavandula stoechas*, *Lycopus asper*, *Marrubium vulgare* ve *Satureja douglasii* bitkilerinin metanollü ekstreleri HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite göstermekle birlikte, yine bu ekstrele ait fitokimyasal içerik çalışmaları yapılmamıştır⁵⁰. Başka bir çalışmada, *Leucas aspera* bitkisinin etanollü ekstresi sitotoksikite açısından etkili bulunmuştur. Ekstrenin bileşiminde alkaloidler, glikozitler, kardiyak glikozitler, antrakinonlar, terpenoidler, flavonoidler, steroidler, tanenler, filobatanenler ve saponinler bulunmuş, ancak bunların oranları ve miktarları incelenmemiş ve etkili bileşiklerin yapısı aydınlatılmamıştır⁵¹. *Lauris nobilis* L. bitkisinin triklorometanlı ekstresi, triklorometan, etil asetat ve metanol ile fraksiyonlanmış ve bu fraksiyonlar sitotoksik etki göstermişlerdir. Bitkinin incelenen ekstrelerindeki başlıca yapılar; α -terpinil asetat, limonen, ökaliptol, öjenol, metilöjenol, elemisin, spatulenol, dehidrokostus lakton, erematin, santamarin, β -ödesmol, α -tokoferol ve β -sitosteroldür. Bu yapılar triklorometanlı fraksiyonda da bulunmuştur⁵². Lamiaceae familyasından sitotoksik ve antikanser etkili bitkilerin bazılarında bu etkilerden sorumlu yapılar ortaya çıkarılmıştır. Bu yapılar; *Rosmarinus officinalis* de bulunan triterpenoidlerden ursolik asit, *Phlomis brunneogaleata* da bulunan fenolik bileşiklerden verbaskozit, izoverbaskozit, forsitozit B ve 3-O-kaffeoilkinik asit metil esteridir⁵³⁻⁵⁵. Yapılan çalışmalar farklı bitkilerin diklorometanlı ekstrelerinin yapısında genellikle, alkaloidlerin, aglikonların ve uçucu yağların bulunduğunu ve bu diklorometanlı ekstrelerin konsantrasyon bağımlı sitotoksik etki oluşturduğunu göstermiştir^{56,57}. Bahsi geçen tüm bu bileşiklerin ise Lamiaceae familyasına mensup *C. niveum* bitkisinin ekstrelerinde bulunması olasıdır. Diğer taraftan, ekstrelerin oluşturduğu sitotoksik etkilerden sorumlu olan bileşik veya bileşiklerin bu yapılardan tamamen farklı başka maddeler olması da mümkündür.

C. niveum bitkisinde sitotoksik etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenebilmesi amacıyla aktiviteyle yönlendirilen fraksiyonlama çalışmaları

ve takip eden etkin madde ve/veya maddelerin izolasyonunun yapılması gerekmektedir. Ayrıca sitotoksik etkinin mekanizmasının belirlenebilmesi için farmakolojik aktivite çalışmaları da gerçekleştirilmelidir. Bu aşamalardan sonra sitotoksik etkili yeni bileşiklerin izole edilmesi ve/veya yeni farmakolojik etki profillerinin ortaya çıkartılması, kanser tedavisinde bitkilerden hareketle yeni ve daha etkin ilaçların geliştirilebilmesi için önemli bir basamak olacaktır.

6. SONUÇ

Bu tez kapsamında *Cyclotrichium niveum* bitkisine ait ekstrelerin olası sitotoksik etkileri HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücreleri kullanılarak incelenmiştir.

C. niveum bitksinin, etil asetat ve diklorometanla hazırlanmış ekstrelerinin kanser hücrelerinde konsantrasyon bağımlı sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Bitkinin suda ve etanolde hazırlanmış ekstrelerinde ise sitotoksik aktiviteye rastlanmamıştır. Sitotoksik etki oluşturan ekstrelerdeki bileşiklerin neler olduğunun belirlenerek tanımlanması, farklı kimyasal yapılara sahip yeni antikanser etkili ilaçların geliştirilebilmesi için önemli bir adım olacaktır.

7. ÖZET

***Cyclotrichium niveum* L.'den Elde Edilen Ekstrelerin Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi**

Cyclotrichium niveum bitkisi Lamiaceae familyasının bir üyesi olup ülkemizde yetişen endemik bir türdür. Bu tez kapsamında *C. niveum* bitkisinin olası sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bitkinin su, etanol, diklorometan ve etil asetatla hazırlanmış ekstreleri HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksikite bakımından değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivitesi RTCA ve MTT yöntemiyle bu üç hücre tipinde belirlenmiştir.

Bitkinin sulu ve etanollü ekstreleri, üç hücre tipinde de sitotoksik etki göstermezken, diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler konsantrasyon bağımlı sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Diklorometanlı ve etil asetatlı ekstreler maksimum konsantrasyonda (300 µg/ml) HeLa ve MCF-7 hücrelerini tamamen öldürürken, HepG2 hücrelerini tam olarak öldürememişlerdir. Diklorometanlı ekstrenin HeLa hücrelerindeki IC₅₀ değeri 353.0 ± 84.30 µg/ml, MCF-7 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 114.8 ± 40.34 µg/ml olarak bulunurken, etil asetatlı ekstrenin HeLa hücrelerindeki IC₅₀ değeri 117.0 ± 36.24 µg/ml, MCF-7 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 156.3 ± 19.86 µg/ml olarak bulunmuştur.

Bulgularımız, *C. niveum*'un sitotoksik aktivitesinin, ekstre ve hücre çeşidine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Sonuçlarımız *C. niveum* bitkisinin diklorometanlı ve etil asetatlı ekstrelerinin kanser hücreleri sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu iki ekstredeki sitotoksik etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenebilmesi amacıyla aktiviteyle yönlendirilen fraksiyonlama çalışmaları ve takip eden etkin madde ve/veya maddelerin izolasyonunun yapılması

gerekmektedir. Bu alışmalar kanser tedavisinde yeni ve daha etkin ilaçların geliştirilebilmesi için yeni bir yol açacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Cyclotrichium niveum*, sitotoksisite, Lamiaceae

8. SUMMARY

Investigation on Cytotoxic Activity of Extracts From *Cyclotrichium niveum* L.

Cyclotrichium niveum –an endemic species- is a member of Lamiaceae family growing in Turkey. In this thesis, the possible cytotoxic effects of *C. niveum* were examined. Cytotoxic activities of the extracts on the water, ethanol, dichlorometane and ethyl acetate were evaluated in HeLa, HepG2 and MCF-7 cells by using xCELLigence RTCA (real time cell analyzer) system and MTT method.

The water and ethanol extracts of the plant had no cytotoxic activity in the three cell types, but ethyl acetate and dichloromethane extracts induced cytotoxic activity in a concentration-dependent manner. The extracts with dichloromethane and ethyl acetate at maximum concentration (300 µg/ml) completely stimulated cell death in HeLa and MCF-7 cells, but were unable to produce complete cell death in HepG2 cells. The IC₅₀ values of dichloromethane extract were 353.0 ± 84.30 µg/ml in HeLa cells and 114.8 ± 40.34 µg/ml in MCF-7 cells. Additionally the IC₅₀ values of ethyl acetate extract were 117.0 ± 36.24 µg/ml in HeLa cells, and 156.3 ± 19.86 µg/ml in MCF-7 cells. These results indicate that cytotoxic activity of *C. niveum* changes depending on the cell types and extracts.

In the current thesis, we have shown for the first time that *C. niveum* has cytotoxic properties in cancer cell lines. In order to identify the responsible compounds for the cytotoxic effects, activity-guided fractionation with activity should be performed and subsequently isolation of substances or active ingredients have to be done. These studies may open a path for the development of new and effective anticancer drugs from plants.

Key Words: *Cyclotrichium niveum*, cytotoxic activity, Lamiaceae.

9. KAYNAKLAR

1. Kanser Nedir? [online], [Erişim tarihi: 21.10.2013 okundu]. URL:
<http://www.kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir.html>
2. Ölüm Nedeni İstatistikleri. TÜİK Haber Bülteni [serial online], 2013 Nisan [Erişim tarihi: 10.08.2013 okundu]. Sayı:15847. URL:
<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847>
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P ve arkadaşları. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide (GLOBOCAN 2002. Kanser İnsidansı, Ölümler ve Dünya Geneline Yaygınlık). IARC Cancer Base No. 5 Sürüm 2.0. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2004.
4. Ferlay J, Autier P, Boniol M, ve arkadaşları. Avrupada Kanser Vakaları ve Ölümler, 2006. Annals of Oncology. 2007; 16: 481-488.
5. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures (Kanser Hakkında Bilgiler ve İstatistikler) 2008. Atlanta: American Cancer society.
6. Kayaalp O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 11.Baskı Ankara, Hacettepe-Taş Yayınevi 2005.
7. Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., Eds. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, University Press, Edinburgh University Press 10. 1988; 208-209.
8. Davis, P. H., Mill, R.R., Tan, K. Flora of Turkey and The East Aegean Islands, Vol: 7, Edinburgh University Press, Edinburgh. 1982.

9. Çetinus Ş.A. ve ark. Scavenging effect and antispasmodic activity of the essential oil of *Cyclotrichium niveum*. *Fitoterapia*. 2007; 78: 129–133.
10. Gülçin İ., Tel A.Z., Kireççi E., Antioxidant, antimicrobial, antifungal, and antiradical activities of *Cyclotrichium niveum* (BOISS.) MANDEN AND SCHENG, *International Journal of Food Properties*. 2008; 11: 450–471.
11. Emen S., Çeken B., Kizil G., Kizil M., DNA damage protecting activity and *in vitro* antioxidant potential of the methanol extract of *Cyclotrichium niveum*, *Pharmaceutical Biology*. 2009; 47 (3): 219-229.
12. Orhan İ. ve ark. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox subsp. caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47: 1304–1310.
13. Kahraman, A., Celep, F. and Doğan, M. Morphology, Anatomy and Palynology of *Salvia indica* L. (Lamiaceae), *World Applied Sciences Journal*. 2009; 6 (2): 289-296.
14. Temel, M. Batı Anadolu Bölgesinde Yayılış Gösteren *Origanum* L. Türleri Üzerinde Biyosistemik Çalışmalar, ESOGÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2000; 219 sayfa.
15. Türkiye'nin biyolojik zenginlikleri, Türkiye Çevre Sorunları Vakfı, Ankara. 1987.
16. Baytop T. *Farmasötik Botanik* 4. Baskı, Dilek Matbaası İstanbul. 1983.
17. Harmandar M. Doğa. *Turkish Journal of Chemistry*. 1988; 12(2): 188.

18. Güner A, Özhatay N, Ekim T & Başer KHC. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (supplement 2). vol. 11. Edinburgh: Edinburgh University Press. 2000; 197-210.
19. Başer, K.H.C. Essential Oils of Anatolian Labiateae: A Profile. Acta Horticulturae. 1993; 333: 217-237.
20. Baytop, T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevi. 1999; 455.
21. Kargioğlu, M., Cenkci, S. ve ark. An Ethnobotanical Survey of Inner-West Anatolia, Turkey, Human Ecology. 2008; 36: 763-777.
22. Özcan, A. *Scutellaria tomentosa* Bertol. Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 83s, Ankara. 1996.
23. Leblebici, E. in Davis, P.H., ed; Flora of Turkey and The East Aegean Islands, University Press, Edinburgh 7. 1982; 346-349.
24. Rechinger, KH (1952). *Calamintha leucotricha* Stapf., *Cyclotrichium glabrescens* Boiss. & Kotschy. Oesterreichische Bot Zeit 1952; 10: 62-64.
25. Başer K.H.C., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Özek, T. & Tümen, G. Essential oil of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. from Turkey. Journal of Essential Oil Research. 1996; 8: 569-570.
26. Başer, K.H.C., Demirci, B., Demirci, F., Kırimer, N. & Hedge, I.C. Microdistillation as a useful tool for the analysis of minute amounts of aromatic plant materials. Chemistry of Natural Compounds. 2001; 37: 336-338.

27. Kılıç, T., Karahan, A., Dirmenci, T., Arabacı, T., Kocabaş, E. & Gören, A.C. Essential oil compositions of some species *Cyclotrichium* and antimicrobial activities. *Chemistry of Natural Compounds*. 2007; 43: 733-735.
28. Baytop T. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü (A dictionary of vernacular names of wild plants of Turkey). Ankara. Türk Dil Kurumu Yayınları (The Turkish Language Society), vol. 578; 1997.
29. Dirmenci T., DüNDAR E., Deniz G., Arabacı T., Martin E., Jamzad Z. Morphological, karyological and phylogenetic evaluation of *Cyclotrichium*: a piece in the tribe *Mentha* puzzle. *Turkish Journal of Botany*. 2010; 34: 159-170.
30. Schulz W.A. *Molecular Biology of Human Cancers*. 1. Baskı USA, Springer Science + Business Media, Inc., 2005.
31. Hanahan D, Weinberg RA The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
33. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*. 2002; 108: 153–164.
34. Range HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Range and Dale's Pharmacology*. 6 ed. NewYork: Churchill Livingstone; 2007; p.718-735.
35. Riddon R.W. *Cancer Biology*. 40. Baskı Michigan, Oxford University Press, 2007.

36. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *European Molecular Biology Organization Journal* 1984; 3(13):3257–62.
37. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 1986; 320(6057): 84–5.
38. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991; 252(5013):1708–11.
39. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proceedings of the National Academy U.S.A.* 1986; 83(1):130–4.
40. D. Malkin, F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, ve ark. Germ-line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990; 250: 1233.
41. T. Frebourg, J. Kassel, K. T. Lam, M. A. Gryka, N. Barbier, ve ark. Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1992; 89: 6413.
42. S. Yamamoto, A. Romanenko, M. Wei, C. Masuda, W. Zamarin, ve ark. Specific p53 gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Research*. 1999; 59: 3606.

43. Murphree AL, Benedict WF retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*. 1984; 223 (4640): 1028–33.
44. C. J. Sherr and F. McCormick: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002; 2:103.
45. Chu E, Sartorelli AC. *Cancer Chemotherapy*. Katzung BG, editor. *Basic & Clinical Pharmacology*. 10 Ed. The McGraw-Hill Companies. 2007, p. 878-907.
46. Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG, Supko JG, Wilson WH. *Chemotherapy of Neoplastic Diseases*. Brunton LL, editor. *GOODMAN & GILMAN'S the Pharmacological Basis of Therapeutics - 11 Ed*. The McGraw-Hill Companies. 2006.
47. Madhusudan S, Ganesan TS. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 618–635.
48. Weiland T, Berger A, Essmann F, Lauer UM, Bitzer M, Venturelli S. Kinetic Tracking of Therapy-Induced Senescence Using the Real-Time Cell Analyzer Single Plate System. *Assay Drug Development Technologies*. 2012; 10(3): 289-95.
49. Kaileh M. ve ark. : Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 113: 510–516.
50. Booth G.M. ve ark. : Cytotoxicity of Selected Medicinal and Nonmedicinal Plant Extracts to Microbial and Cervical Cancer Cells.

Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID 106746, 4 pages doi:10.1155/2012/106746.

51. Rahman A. ve ark. : Antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of the phytochemicals of whole *Leucas aspera* extract. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2013; 3(4):273-9.

52. Pacifico S. ve ark. : Apolar *Laurus nobilis* leaf extracts induce cytotoxicity and apoptosis towards three nervous system cell lines. Food and Chemical Toxicology. 2013; 62: 628–637.

53. Prakash P, Gupta N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 2005; 49 (2): 125-31.

54. Limem-Ben Amor I, Boubaker J, Ben Sgaier M, Skandrani I, Bhourri W, Neffati A, Kilani S, Bouhlel I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 125 (2):183-202.

55. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. Planta Medica. 2008; 74 (13):1560-9.

56. Houghton P., Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Chapman and Hall 1998.

57. Bagla, V.P. Isolation and characterization of compounds from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) with activity against bacterial, fungal and viral pathogens. University of Pretoria, Doktora Tezi, Pretoria, 2012.

10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde, çalışmalarımın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen, eğitim ve öğretimimde büyük emeği olan tez danışmanım, Prof. Dr. Mustafa Ark'a,

Tez çalışmalarımın konusunu teşkil eden *C. niveum* bitkisine ait ekstraları temin etmemi sağlayan ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İlkay Erdoğan Orhan'a,

Eğitim ve öğretimimde emekleri olan değerli hocalarım, Prof. Dr. Nurettin Abacıoğlu'na, Prof. Dr. Fatma Akar'a, Prof. Dr. Nilüfer Turan Dural'a ve Doç. Dr. Orhan Uludağ'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında tecrübe, bilgi ve zamanlarını benden esirgemeyen Dr. Ecz. Aysun Özdemir'e, Uzm. Ecz. Yaprak Dilber Şimay'a, Uzm. Ecz. Fatma Sezer Şenol'a ve Ecz. Burçin İbişoğlu'na,

ve EŞİME,

saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Metin
Soyadı: Yıldız
Doğum Yeri ve Tarihi: Kayseri-28.07.1985

Eğitimi:

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2002-2006
Yenimahalle Halide Edip Lisesi	1999-2002
Yenimahalle Halide Edip Ortaokulu	1996-1999
Yenimahalle Fatih İlkokulu	1993-1996
Çankaya İzciler İlkokulu	1991-1993

Yabancı Dili: İngilizce

Bilimsel Etkinlikleri:

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1. Yaprak Dilber Simay, Sanem Hosbas, Burcin Ibisoglu, **Metin Yildiz**, Aysun Ozdemir, Mustafa Ark. Rock inhibition reduces senescent cell size. FASEB J. 2013; 1105.2.