

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***MYRTUS COMMUNIS* (MERSİN OTU)'İN MEME KANSERİ VE
BAŞ-BOYUN KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TERAPÖTİK
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan:
HACER ESRA GÜRSES**

**Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. ÖMER FARUK HATİPOĞLU**

Ankara-2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

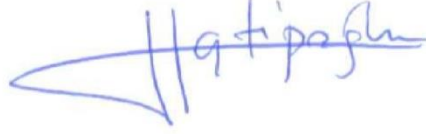
- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Hacer Esra GÜRSES


ONAY

Hacer Esra GÜRSES tarafından hazırlanan “MYRTUS COMMUNIS (MERSİN OTU)’İN MEME KANSERİ VE BAŞ-BOYUN KANSERİ HÜCRE HATLARINDA TERAPÖTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma, 09.01.2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oybirliği ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından TIBBİ GENETİK ANABİLİM dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

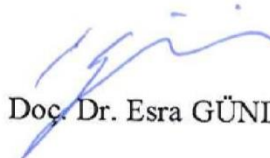
Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU (Başkan)



Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ



Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ



ÖNSÖZ

Okumak üzerine var olan dünyanın en güzel yolu olan bilim yolunun bir basamağını daha tamamlarken beni hiçbir dem yalnız bırakmayanlara sonsuz teşekkür etmek için ayırıyorum bu sayfayı. Bir ömrü yeni şeyleri öğrenmeye adanmış gibisi yok şüphesiz. Kendime yol olarak seçtiğim genetiğin keşfedilmeye açık bir derya olduğunu fark ettiğim anla başladım bu yolda adım atmaya. Lisans eğitimimle aralanan kapı, lisans sonrasında iyice açıldı. Gün geçtikçe daha anlam bulan, yeniliklere yenilik katılan bu alanda bulunmak, sabırla laboratuvarında çalışmak, insanlığın iyiliği için çabalyor olduğunu bilmek en büyük dayanak noktamdı. Karşılaşılan her zorlukta sabırla denemeye devam etmemi sağlayan da insanlık için ardında bırakabilecek bir şey olsun çabamdı, bu idi azmimim sebebi de. Elbet bir insan değiştiremezdi dünyayı, ama her insanın yaptığı küçük şeyler daha güzel bir dünyanın oluşmasına müjde idi. Bu noktada üzerime düşeni yapma adına genetik bilimi için bir taş da ben koyayım diye çalışmalarımı sürdürdüm ve sürdürmeye de devam edeceğim.

Eğitimimin bu aşamasında hazırladığım tezimde bana kıymetli tecrübeleri ile destek olan, teorik temelleri oluşturmam da yoluma ışık tutan, deneyler sırasında her türlü soruma yanıt olan, çalışmalarım boyunca bilgilerini hoşgörü ile aktaran değerli hocalarım Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ, Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ, Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR, Yrd. Doç. Dr. Sultan YILMAZ ÇİFTÇİ, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR, Dr. Eyüp ÜÇTEPE, Dr. Sadık ÇİĞDEM ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu alan sabrı ve çokça çalışmayı gerektirirken çalışmalarım sırasında her zaman neşeleri, bilgileri, maddi manevi destekleri ile yanımda olan çalışma arkadaşlarım Kübra FAKIOĞLU, Onur BENDER, Serap MEMİK, Yunus Emre BİLGİN, Gizem SEVİNÇ, Dilara ACER, Tuğçe YAŞAR, Esra EROĞLU, Elif Nihan ÇETİN, Catherine MOROSKİ- ERKUL, Ayfer BAYATOĞLU, Esin DEMİR, Emrah KARAGÖZ, Nazlı KURT, Birsen DOĞAN, Dilek GÜN'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarımı yüksek lisansımın başından itibaren daha da keyifli kılan grup arkadaşarım Bilge ATAR, Kübra YILDIRIM'a bana deneylerimde sabrıyla yardım eden Kübra AKBAŞ'a, her daraldığımda bir aydınlık bulmamı sağlayan Ayşe ÇELİK'e ve manevi desteğini üzerimden esirgemeyen Esmâ SULTAN'a çok teşekkür ederim.

Sevgileri ve tarifsiz fedakarlıkları ile her zaman yanımda olan tezimde de beni yalnız bırakmayan canım aileme haklarını hiçbir dem ödeyemeyeceğimi bilsem de çalışma disiplini ve eğitimimde aslolan yolu bana öğreten babam Sezai GÜRSES'e, merhameti ve duaları ile hep destek olan annem Nilay GÜRSES'e, tüm eğitimim boyunca maddi manevi desteğini benden esirgemeyen amcam Şaban GÜRSES'e, çalışma azmi ve değerli düşünceleri ile bana yoldaş olan kardeşim Enes GÜRSES'e nacizane teşekkür ederim.

Bu çalışmamın uygulama kısmında 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 113S920 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK'a ve çalışmamın uygulama kısmını destekleyen Turgut Özal Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim

Hazırladığım bu tezimin, diğer çalışmalar için de bir basamak oluşturmasını ümit ediyorum. Mersin otu ve kanser üzerine yapılan çalışmaların sınırlı olması, ülkemizde mersin otunun kolay yetiştiriliyor olması çalışmayı özgün kılmaktadır. Üzerine yapılacak çalışmaların arttırılması ile umarım ki bu çalışma ilerde tedaviye yönelik bir yol olur.

Hacer Esra GÜRSES

Ankara-Ocak 2015

ÖZET

[GURSES,Hacer Esra]. [*Myrtus communis* (Mersin otu)'in Meme Kanseri ve Baş-Boyun Kanseri Hücre Hatlarında Terapötik Etkisinin İncelenmesi], [Yüksek lisans tezi, Ankara, 2015].

Günümüzde ilerleyen teknoloji aracılığıyla hastalıkları moleküler seviyede anlayabilmek ve yeni tedaviler ortaya koyabilmek için yapılan genetik çalışmalar artmıştır. Bu çalışmaların büyük kısmının kanser hastalığı ilgili olduğu belirlenmiştir. Kanserin sebebi moleküler seviyede incelendiğinde farklı sinyal yolları merkezli tümörleşme olduğu tespit edilmiştir. Dünya sağlık örgütüncce yapılan incelemelere göre kanserin dünyada sağlık sorunları arasında başta geldiği söylenmektedir. Dünyada her yıl yaklaşık 12 milyon kişiye kanser tanısı konulduğu ve 7.6 milyon kişinin kanserden yaşamını yitirdiği bildirilmiştir. Eğer bu artış önlenmezse, dünya genelinde 2030'da 26 milyon yeni kanser vakasına ve 17 milyon ölüme ulaşılacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise her yıl 200 bin yeni kanser vakasının ortaya çıktığını bilinmektedir. Son otuz yılda yapılan çalışmalarda moleküler seviyede başarılı gelişmeler olduğu bildirilmiştir. Birçok çeşidi ve birbirinden farklı sebebi olan kanserin ülkemizde de oldukça sık görülmesinden ve ölüm oranlarının gün geçtikçe artmasından dolayı multifaktoriyel bir hastalık olan kanser çalışmaların odak noktasıdır. Birçok araştırmacı çalışmalarını bu yönde yoğunlaştırmıştır.

Bir Akdeniz ülkesi olan Türkiye'de kolayca yetişebilen *Myrtus communis* (mersin otu) kanserli hücelere uygulanmış, farklı kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında bu etkinin mitokondriyal yolak üzerinden olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda *Myrtus communis*'nin prostat kanserinde, lösemide, kolorektal adenokarsinomada kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü tespit edilmiştir. Amacımız daha önce mersin otu uygulaması yapılmayan hücre hatlarında mersin otunun etkisini tespit etmektir. *İn vitro* deneylerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda sağlıklı hücrelerde sitotoksitesinin düşük olduğu gösterilen mersin otu ekstraktının kanser ilaçları ile birlikte veya tek başına kullanımı için bir basamak oluşturacaktır.

Türkiye’de sık görülen kanserlerden olan meme kanseri ve baş - boyun kanseri bu araştırmada incelenmiştir. Üç farklı kanser hattında öncelikle apoptoz mekanizması araştırılmıştır. Bu çalışmada *Myrtus communis*’nin meme kanseri, baş-boyun kanseri üzerinde ne kadar etkili olduğu, apoptotik yolakta hangi genleri nasıl etkilediği sorularına cevap bulmak hedef alınan temel basamakları oluşturmuştur.

Çalışmada meme kanseri ve baş boyun kanserinde mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında mersin otunun hücreleri ölüme götürdüğü tespit edilmiştir. Bunun yanında fibroblast kontrol hücrelerinde mersin otunun sitotoksik etkisinin az olduğu görülmüştür. Ardından hücrelerin apoptoz yolağını kullanarak ölüme gittiğinin belirlenmesi amacıyla apoptoz yolağındaki görevli genlerin değişimi incelenmiş, hücre ölümünün apoptoz ile olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizlerin ardından pro-apoptotik genlerin ekspresyonunun arttığı, anti-apoptotik genlerin de ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. DNA tamirinde görevli Poly ADP Ribose Polymerase (PARP)’ın bu hücre hatlarında parçalanmasının tespiti de hücre ölümünün apoptotik yolakla olduğuna işaret etmiştir. Sonuç olarak meme kanseri ve baş-boyun kanseri tedavisinde mersin otu ekstraktının sitotoksitesisi az bir tedavi basamağı olabileceği bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler:Mersin otu, Kanser, Apoptoz, Baş Boyun Kanseri, Meme Kanseri

ABSTRACT:

[GURSES,Hacer Esra]. [*In Vitro* Investigation of Therapeutic Effects of *Myrtus Communis* (Myrtus) in Breast and Head-Neck Cancer Cell Lines], [Master thesis, Ankara, 2015].

Thanks to advancing technology, the genetic study of diseases at the molecular level has recently increased. The majority of these molecular studies are related with cancer. At the molecular level, cancer's etiology lies in various signalling pathways. Cancer has been identified by the World Health Organization as a leading health problem worldwide. Each year it is reported that worldwide approximately 12 million people are diagnosed with cancer, and 7.6 million people die of cancer. If no measures are taken, it is estimated that in 2030 there will be 26 million new annual cases of cancer worldwide with 17 million deaths. In Turkey alone, each year 200 thousand new cases of cancer are diagnosed. Successful developments in the study of cancer at the molecular level have been reported in the last thirty years. Cancer is a multifactorial disease with many different varieties which differ significantly from one another. Due to its complexity and variety, common occurrence and high death rate, scientists have focused heavily on cancer research. Accordingly scientists in Turkey have also turned their studies in this direction.

As a country located in the Mediterranean region, *Myrtus communis* (Myrtus) grows easily in Turkey and can be conveniently obtained for research in cancer. It has been reported that Myrtus causes apoptosis in several different cancer cell lines. Researchers showed that this effect is via the mitochondrial pathway and cytotoxicity is low in human peripheral blood monocytes and skin fibroblasts. Our aim is to determine the effect of *Myrtus communis* on cancer cell lines which have not yet been investigated such as breast as well as head and neck cancer. In some studies, *Myrtus communis* has been identified as effective in inducing apoptosis in prostate cancer, leukemia, and colorectal adenocarcinoma cancer cells. We are planning to investigate the mechanism of apoptosis in three different cell lines and determining which genes are involved in apoptosis induced by *Myrtus communis*.

In this study, we aim to examine the effect of *Myrtus communis* on breast cancer and head-neckcancer. How *Myrtus communis* affects cancer cell lines, which genes are affected by *Myrtus communis* in the apoptotic pathway are all questions we will try to get answer. Ultimately, this project aims to evaluate the efficacy of *Myrtus communis* extract, which has low cytotoxicity in healthy cells, as a stand-alone cancer treatment or as an adjuvant therapy alongside chemotherapy, radiotherapy and surgical intervention.

In this study, it was found that *Myrtus communis* extract causes cell death in breast and head and neck cancer cell lines. In addition, it was shown that *Myrtus communis* extract has little cytotoxic effect in a normal fibroblast cell line. Furthermore, to investigate whether cells were dying via apoptosis, changes in the expression of genes involved in the apoptotic pathway were investigated. It was found that cell death indeed occurred through apoptosis. Analysis revealed an increase in expression of pro-apoptotic genes and decrease in expression of anti-apoptotic genes. The presence of cleaved PARP in these cell lines after treatment further confirmed that cells were dying via apoptosis. In conclusion, it was found that *Myrtus communis* extract has little cytotoxic effect in non-cancer cells and, therefore, an initial step towards its potential use as a treatment for breast and head and neck cancer has been made.

Keywords: *Myrtus communis* (myrtus), Cancer, Apoptosis, Breast Cancer, Head and Neck Cancer

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZETLER	iii
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xv
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 Kanser.....	7
2.2 Meme Kanseri.....	8
2.2.1 Genel Özellikleri, Çeşitleri, Nedenleri.....	8
2.2.1.1 Meme kanseri nedenleri.....	8
2.2.1.2 Meme kanseri evreleri.....	11
2.2.1.3 Meme Kanseri Çeşitleri.....	12
2.2.1.3.1 Duktal Karsinoma.....	13
2.2.1.3.2 Lobular Karsinoma.....	14
2.2.1.3.3 İnvaziv Meme Kanseri.....	15
2.2.1.3.4 İnflamatuvar Meme Kanseri.....	15
2.2.1.3.5 Tekrarlayan Kanser.....	16
2.2.2 Genetik Faktörler.....	17
2.2.3 Tedavi yöntemleri.....	17
2.3 Baş ve Boyun Kanseri.....	18
2.3.1 Genel Özellikleri, Çeşitleri, Nedenleri.....	18
2.3.1.1 Baş ve boyun kanserinin nedenleri.....	18
2.3.1.2 Baş ve boyun kanseri evreleri.....	18
2.3.1.3 Baş ve boyun kanseri çeşitleri.....	22
2.3.2 Genetik Faktörler.....	23
2.3.3 Tedavi Yöntemleri.....	24
2.4 Myrtus communis (Mersin otu).....	25
2.4.1 Tarihçesi.....	25
2.4.2 Yapısı ve özellikleri.....	25

2.4.3 Uygulama alanları ve kanserle ilişkisi.....	30
2.5 Apoptoz.....	33
2.5.1 Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Bcl-2 Ailesi Üyeleri.....	35
2.5.2 BAX, BCL-2, KASPAZ 3, KASPAZ 9 ve PARP Yapısı ve Özellikleri.....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	39
3.1 MATERYAL.....	39
3.1.1 Kullanılan Hücreler Ve Özellikleri.....	39
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	40
3.1.3 Hücre Kültürü Donanımları.....	41
3.2 YÖNTEMLER.....	41
3.2.1 Hücre Kültürü.....	41
3.2.1.1 Hücre ekim işlemleri.....	42
3.2.1.2 Medyum Değişimi (75'lik flask için).....	42
3.2.1.3 Harvest İşlemi (75'lik flask için).....	43
3.2.1.4 Hücre sayımı.....	43
3.2.1.5 xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi.....	44
3.2.2. <i>Myrtus communis</i> (Mersin Otu) Muamelesi.....	46
3.2.3 Hücre Titrasyon Testi (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi).....	46
3.2.4 Hücre Sitotoksosite Testi (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi).....	47
3.2.5 mRNA İfadesinin Belirlenmesi.....	47
3.2.5.1 TRİZOL ile hücreden RNA izolasyonu.....	47
3.2.5.2 cDNA Protokolü.....	49
3.2.5.3 BETA AKTİN, BAX, BCL-2 Primerlerin hazırlanması.....	50
3.2.5.4 Gradyent PCR.....	51
3.2.5.5 Agaroz Jel Elektforezi.....	52
3.2.5.6 Jel Ekstraksiyonu.....	52
3.2.5.7 Real-time PCR için Standartların Hazırlanması.....	53
3.2.5.8 Real-time PCR.....	54
3.2.6 Protein İfadesinin Belirlenmesi.....	55
3.2.6.1 Protein İzolasyonu.....	55
3.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini.....	55
3.2.6.3 SDS-PAGE jel hazırlanması.....	56

3.2.6.4 Protein Örneklerin Hazırlanması.....	56
3.2.6.5. SDS-PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer.....	56
3.2.6.6 İmmunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Girilmesi ve Sonucun Filme Fiksasyon İşlemi	56
3.2.7 İstatistiksel Analiz.....	57
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	58
4.1. HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B HÜCRELERİNİN TİTRASYON GRAFİKLERİ.....	58
4.1.1 HUC-F hücrelerinin titrasyon grafiği.....	58
4.1.2 MCF-7 hücrelerinin titrasyon grafiği.....	59
4.1.3 UT-SCC-74A hücrelerinin titrasyon grafiği.....	59
4.1.4 UT-SCC-74B hücrelerinin titrasyon grafiği.....	60
4.2 HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRE PROLİFERAYONU ÜZERİNDE MERSİN OTU EKSTRAKTININ ETKİSİ.....	60
4.2.1 HUC-F hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi.....	61
4.2.2 MCF-7 hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi.....	62
4.2.3 UT-SCC-74A hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi.....	64
4.2.4 UT-SCC-74B hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi.....	66
4.3 MERSİN OTU EKSTRAKTININ HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC- 74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN MORFOLOJİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ.....	69
4.3.1 Mersin otu ekstraktının HUC-F hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi.....	70
4.3.2 Mersin otu ekstraktının MCF-7 hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi.....	71
4.3.3 Mersin otu ekstraktının UT-SCC-74A hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi.....	72
4.3.4 Mersin otu ekstraktının UT-SCC-74B hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi.....	73
4.4 MERSİN OTU EKSTRAKTININ MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE BAKILMASI.....	74

4.4.1 MCF-7 hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması..	74
4.4.2 UT-SCC-74A hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması.....	76
4.4.3 UT-SCC-74B hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması.....	77
4.5 MERSİN OTU EKSTRAKTININ MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE PROTEİN DÜZEYLERİNE BAKILMASI.....	79
4.5.1 MCF-7 hücre hattında western blot sonuçları.....	79
4.5.2 UT-SCC-74A hücre hattında western blot sonuçları.....	80
4.5.3 UT-SCC-74B hücre hattında western blot sonuçları.....	81
5.TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ.....	90
7.KAYNAKLAR.....	91

KISALTMALARAÇIK YAZILIŞI

AIF.....	Apoptosis-inducing factor
AHH.....	Aril Hidrokarbon Hidroksilaz
BAX.....	BCL2-associated X protein
BCL-2.....	B-cell CLL/lymphoma 2
Caspase(Kaspaz).....	Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE
DCIS.....	Ductal carcinoma in situ
EGFR.....	Epidermal growth faktör reseptör
IAP.....	Inhibitors of apoptosis proteins
LCIS.....	Lobular carcinoma in situ
MCF-7.....	Michigan Cancer Foundation-7
PARP.....	Poly (ADP-ribose) polymerase
TNF.....	Tümör nekroz faktörü
UT-SCC.....	squamous cell carcinoma

<u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u>	<u>SAYFA NO</u>
Şekil 1: Meme Kanseri Profili.....	12
Şekil 2: Duktal kanserin gösterimi.....	13
Şekil 3: Lobüller kanserin gösterimi.....	14
Şekil 4: Normal memeden kanserli hücrelerin lenf ve kan kanalına yayılması.....	15
Şekil 5: Baş ve boyun kanserinin görüldüğü bölgeler.....	22
Şekil 6: <i>Myrtus communis</i> bitkisi.....	27
Şekil 7: <i>Myrtus communis</i> Linn.....	28
Şekil 8: Dış ve iç apoptotik yollar.....	36
Şekil 9: Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter'da hücre sayım aşamaları.....	44
Şekil 10: Hücre sayımı ardından hesaplanması.....	44
Şekil 11: xCELLigence plate'ine ekim ve cihaza örneklerin yerleştirilmesi.....	45
Şekil 12: HUC-F hücre hattında titrasyon grafiği.....	58
Şekil 13: MCF-7 hücre hattında titrasyon grafiği.....	59
Şekil 14: UT-SCC-74A hücre hattında titrasyon grafiği.....	59
Şekil 15: UT-SCC-74B hücre hattında titrasyon grafiği.....	60
Şekil 16: HUC-F hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması.....	61
Şekil 17: HUC-F hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	61
Şekil 18: MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması.....	62

Şekil 19: MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	63
Şekil 20: MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC50 değerinin belirlenmesi.....	63
Şekil 21: UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması.....	64
Şekil 22: UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	65
Şekil 23: UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC50 değerinin belirlenmesi.....	65
Şekil 24: UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması.....	66
Şekil 25: UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	67
Şekil 26: UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC50 değerinin belirlenmesi.....	67
Şekil 27: HUC-F hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi.....	70
Şekil 28a: MCF-7 hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi b: MCF-7 hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.....	71
Şekil 29a: UT-SCC-74A hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi b: UT-SCC-74A hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.....	72

Şekil 30a: UT-SCC-74B hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi b: UT-SCC-74B hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.....	73
Şekil 31: MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BAX RT-PCR sonucu.....	74
Şekil 32: MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BCL-2 RT-PCR sonucu.....	75
Şekil 33: UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BAX RT-PCR sonucu.....	76
Şekil 34: UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BCL-2 RT-PCR sonucu.....	76
Şekil 35: UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BAX RT-PCR sonucu.....	77
Şekil 36: UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında BCL-2 RT-PCR sonucu.....	78
Şekil 37: MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β-aktin tayini.....	79
Şekil 38: UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β-aktin tayini.....	80
Şekil 39: UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β-aktin tayini.....	81

<u>TABLolar DİZİNİ</u>	<u>SAYFA NO</u>
Tablo 1: 2002 yılında yapılan çalışmada Türkiye’de en çok görülen kanser türlerinden ilk beşinin insidansının gösterimi.....	8
Tablo 2: Türkiye’deki kadınlarda meme kanseri hastalığının yaşa bağlı ölümlerinin dağılımı.....	9
Tablo 3: Tümörün T sınıflandırılması.....	20
Tablo 4: Tüm anatomik bölgeler için N sınıflandırılması.....	21
Tablo 5: <i>Myrtus communis</i> ’in taksonomik sınıflandırılması.....	26
Tablo 6: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri.....	36
Tablo 7: Mersin otu ekstraktının farklı dozlarda solüsyonların hazırlanması.....	46

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser tanısı konulan hastaların tedavilerinde mevcut cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemlere rağmen, çok başarılı sonuçlar elde edilememektedir. Çoğu kemoterapi tedavisinde sitotoksisite yan etkidir. Bundan dolayı kanser tedavisinde sitotoksisitesi az olan alternatif yollar aranmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar farklı kanser türlerinde moleküler seviyede çalışmalar yapmaya başlamış, terapötik hedef olarak da farklı metabolizmaları kullanmışlardır. Apoptoz, nekroz ve otofaji adıyla farklı hücre ölüm çeşitleri vardır. Bunların farklı sinyal yolları olması nedeniyle bu sinyal yollarına özgü anti-kanser ajanlar belirlenip, uygulanmaktadır. Bu anti-kanser ajanların DNA tamiriyle veya hücre metabolizmasındaki farklı yolları etkilemesiyle apoptozu indüklediği belirtilmiştir [1].

Üzerinde en çok çalışma bulunan apoptotik hücre ölümü sinyal yolağı, birçok kanser tipi için hedef alınmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler nedeniyle oluşan ve fiziksel bir süreç olan apoptotik hücre ölümü; proliferasyon, değişim ve matürasyon süreçleri ile tehlikeli hücrelerin organizmadan uzaklaşmasıdır. Apoptozdaki en önemli enzimlerin de yapısal ve fonksiyonel proteinleri hidrolize eden kaspazlar olduğu belirtilmiştir. Kaspaz aktivasyonuna iki yolağın sebep olduğu bilinmektedir. Birinci yolak olan dışsal yolak membran reseptörleri ve ligandlarıyla, ikinci yolak olan içsel yolak da mitokondri ile ilgilidir[2]. Bundan dolayı apoptoz temelli yapılan moleküler çalışmaların birçoğunda ilk olarak kaspaz yolağı incelenir.

Apoptoz pek çok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli görevler üstlenmiştir. Apoptotik indeks histolojik olarak apoptotik hücre sayısını yaşayabilir hücrelere oranlar ve bu indeks apoptozun şiddetini ya da oranını belirler[3]. Apoptoz şiddetini arttıran ajanlar belirlenerek, çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Araştırmalarda anti-kanser ilaçlar üzerine yapılan çalışmaların 1900'lü yıllarda başladığı belirtilmiştir. Bu çalışmalarda doğal ürünlerin kullanımının gittikçe arttığı da belirtilmektedir [4].

Antiseptik ve anti-inflamatuar ajan olan ve halk arasında da sıkça kullanılan mersin otunun, kanser türlerine tedavi edici ajan amaçlı kullanılması hedeflenmiştir.

Sitotoksik etkisi çok az olduğu bilinen mersin otu, özellikle Akdeniz bölgelerinde halk arasında kullanılmaktadır. Bu bilgi laboratuvar ortamına taşınmış, bazı kanser hücrelerinde mersin otunun apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [5].

Dünya sağlık örgütün tarafından yapılan istatistiksel analizde belirtildiği üzere; ülkemizde zaman geçtikçe artan, bayanlarda daha sık rastlanan meme kanseri tüm kadın kanserlerinin %23'ünü teşkil etmektedir. Meme kanserli hastalardaki 5 yıllık sağkalım oranları, gelişmiş ülkelerde %83 iken, gelişmekte olan ülkelerde %53 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi güçtür. Ancak mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Bu sıklık farkı, Türkiye'nin batısındaki yaşamın Avrupa'dakine benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Kadınlardaki 4 kanserden biri meme kanseri olup, kanserler arasında en sık ölüm nedenidir. Meme kanseri tedavisi olarak öncelikle kemoterapi önerilmekte, ardından radyoterapi, hormon tedavisi ve cerrahi girişimler denenmektedir. Meme kanserinde yüksek oranda metastaz görülmekte bundan dolayı cerrahi tedavi yetersiz kalmaktadır. Metastaz yeri genellikle akciğerdir. Metastazlı hastaların yaklaşık olarak %20'si 5 yıl ve daha uzun yaşarlar ve bu hastalara kemoterapi önerilir. Yüksek dozlu kemoterapi ile bu hastalar tedavi edilmeye çalışılmaktadır, ancak bu konudaki çalışmaların sonuçları çelişkilidir.

Meme kanserinin oluşumunda östrojenlerin esas etken olması nedeni ile hormon azaltımı terapisi veya östrojen biyosentezini engelleyen aromataz inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak bu terapi modelleri meme kanserlerinin yaklaşık 2/3'sini oluşturan hormona duyarsız, ya da başlangıç evresinde hormona cevap veren fakat daha sonraki evrede cevap vermeyen tümörlerin tedavisinde etkisiz olmaktadır. İstatistikler, ölüm oranlarının erken teşhis olanakları ve adjuvan terapiler sonucunda giderek azaldığını göstermektedir, [6] fakat metastazın meydana gelmesi, meme kanserinin tedavisini güçleştirmektedir.

Metastatik meme kanserinde yaşam süresi 15-20 ay olarak belirtilmiştir. Başarılı sitotoksik veya genotoksik kemoterapi, hormona duyarız, hızlı, progresif hastalık gösteren kadınlarda öncelikli olarak ele alınmaktadır[7]. Bir diğer tedaviyi güçleştiren durum ise cevapsızlık mekanizmasıdır.

İlaca baştan duyarız veya hastalık süresince edinilen direnç mekanizmasının moleküler düzeyde her hasta için modellenmesi mortalite oranlarını düşürecektir. Bu nedenle moleküler mekanizmaların daha detaylı tanımlanması, yeni terapötik hedeflerin gösterilmesi önem taşımaktadır[6-8].

Gün geçtikçe daha da yaygınlaşan baş-boyun kanseri Ege Üniversitesi kanser kayıt analizlerine (2007) göre erkeklerde %12.6, bayanlarda %5.6 görüldüğü belirtilmiştir. İlerleyen çalışmalara rağmen baş-boyun kanseri hastalarının hayatta kalma ve hastalık tedavi oranlarında net bir değişim görülmemiştir. Tümörün agresif olması ve metastaz yapması sebebiyle mevcut tedaviler yetersizdir. Bu nedenle, daha etkili ve daha az toksik terapötik yaklaşımları geliştirmek amacıyla, bu hastalığın biyolojisinin daha iyi bilinmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada baş-boyun kanserinin metastaz ve tümör tipleri kullanılmıştır.

Myrtus communis ile ilgili sınırlı sayıda kaynak olması ve ülkemizde kolay yetiştirilmesi sebebiyle bu çalışmada hedef seçilmiştir. Ayrıca ülkemizde görülme sıklıkları çok fazla olduğundan meme kanseri, baş-boyun kanseri hücreleri belirlenmiştir.

Apoptozda üç temel grup rol alır; ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar). Ölüm reseptörleri TNF (*Tumour Necrosis Factor*) reseptör gen ailesine aittir. Kaspazlar, sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz1,4,5,13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2,8-10) ya da "uygulayıcıları" (kaspaz 3,6,7) olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanıp ve ölüme yönlendirir ama infazı gerçekleştiremediği için bunu yapacak olanları aktive eder. İnfazı gerçekleştirenin uygulayıcı (effektör) kaspazlar olduğu, uygulayıcı kaspazların başlatıcı kaspazların akışını aktive ettiği bilinmektedir.

Apoptotik programın merkezi bileşeninin kaspazlar olduğu, kaspaz aktivasyonunun hücreye özgü ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir [9].

Kanser tedavisinde apoptozun önemli bir fonksiyonları vardır. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale ederek yeniden düzenlenmesi, önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirmiştir. Potansiyel tedavi yöntemlerinin üç kategoride toplandığını belirtmişlerdir: 1. Gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb), 2. Apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (büyüme faktörleri ve çözülebilir FasL vb), 3. Apoptozla ilişkili genlerin ifadesini (ekspresyonunu) düzenleyen farmakolojik küçük moleküller (Bcl-2 vb). Bugüne kadar non-steroidal antiinflamatuvarlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç olduğu ama bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlattığı ve apoptozla olan direnç tedavideki başarısızlığı getirdiği belirtilmiştir [5]. Üstelik bu tedavilerin, normal hücrelerde de apoptozu başlattığı bildirilmiştir. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen yeni birçok tedavi denemeleri preklinikte ümit verici olduğu söylenmiştir. Apoptozun önemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilmesini sağlamasından ve organizmanın iç dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar, insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizma olduğu belirtilmiştir.

Bu süreçte, kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları önemli yer tuttuğu ve bu konu ile ilgili yoğun araştırmaların sürmesi tıpta pek çok soruya yanıt getireceği inancını desteklediği bildirilmiştir[9].

İncelenme mekanizması olarak apoptoz yolları olan içsel ve dışsal yollar belirlenmiştir. Çalışmamızda bu yollar içerisindeki Bax ve Bcl-2 genler incelendi. Yapılan çalışmalarda Kaspaz 3'ün apoptoz yolağındaki en kritik medyatör olduğu, birçok hücrel proteini katalizlediği belirtilmiştir [10]. Apoptoz yolağında rol alan, hücreyi apoptozla götüren önemli bir ajandır[11]. Bcl-2 proteinlerinin programlanmış hücre ölümünü düzenlediği belirtilmektedir. Bütün Bcl-2 proteinleri dört BH domaininden en az bir tanesini içerir (Bcl-2 homolojisi).

Apoptotik ölümü engelleyen bir mitokondriyal membran proteini kodlayan ve apoptozisi baskılayan Bcl-2, hücre ölümünü, mitokondriyal membran permeabilitesini kontrol ederek düzenlemektedir. Antiapoptotik ve pro-apoptotik olarak iki gruba ayrılır. Pro-apoptotik grupların, yapısal özellikleri açısından, yalnızca BH3 domaini içeren proteinler (Bid, Noxa, Puma ve Bad) ve multidomain proteinler (Bax ve Bak) olmak üzere alt gruplara ayrıldığı belirtilmiştir. Antiapoptotik olanlarda Bcl-2, Bcl-x1, Mcl1, BHRL-1, bcl-w, bfl-1, brag-1, A1 olarak belirtilmiştir [12]. Kaspaz aktivitesini de, ya mitokondriden sitokrom *c* salınımını engelleyerek ya da Apaf-1'i bağlayarak inhibe eder. Farklı yollarla apoptozu engellendiği bilinen bu protein bir görevi Bax adlı proteine bağlanarak anti-apoptotik yolak oluşturmaktır. Fosforilasyona bağlı olarak ya da regüle olup anti apoptotik görev yaptığı bilinmektedir. Serbest radikal ürünlerinin inhibisyonu ile de anti-apoptotik yolak oluşturmaktadır. Mitokondriden sitokrom *c* salınımının önlenmesi ile de Bcl-2 işleve girip apoptozu engellemektedir [11].

Pro-apoptotik gen olan Bax, Bcl-2 protein ailesine aittir. Bcl-2 ile heterodimer oluşturan, apoptotik aktivatör olarak işlev gören bir proteindir. Bu proteinin, mitokondri membranı üzerinde yer alan anyon kanalları ile etkileşip, membran potansiyelinde değişiklik yaratarak sitokrom *c* salınımına ardından da Kaspaz-3 aktivasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir. Bu genin ekspresyonunun, bir tümör supresör olan p53 ile düzenlendiği ve p53 aracılığıyla gerçekleşen apoptoziste proteinin yer aldığı gösterilmiştir [13].

Kaspaz 8, ölüm reseptörü olan FAS molekülü ile birlikte çalışır. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar. Diğer kaspazlar da aktive olup hücrelerin apoptoza gitmesi gerçekleşir [14]. PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), DNA tamiri ve programlanmış hücre ölümünde görevlidir. Hücre çekirdeğinde yer alan PARP hücre stres ve DNA hasarında aktive olur. Hücre stres durumlarında farklı sinyal yollarıyla işlev yapar [15].

Mersin otunun çalışmada kullanılmasının önemli bir sebebi bu bitkinin ülkemizin Akdeniz bölgesinde kolay yetiştirilebilen bir bitki olmasıdır. Bu bitki halk arasında bazı hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda halk arasında şifalı bitki olarak geçen mersin otunu bilimsel bazda incelemeyi hedefledik. İlk olarak *in vitro* 'da yapılacak çalışma başarılı olduğu takdirde bir üst basamak olan fare deneylerine *in vivo* çalışma olarak geçilebilir. Bu iki basamakta da elde edilen anlamlı sonuçlar ışığında diğer basamağa geçilmesi önümüzdeki çalışmalar için hedeflenmektedir. Kanser çalışmalarında önemli bir basamak olacağına inanarak yola çıkılan çalışmada apoptoz yolları birçok yönüyle incelenecektir. Bu araştırmanın bundan sonraki çalışmalara da ışık tutacağına inanıyoruz.

Mersin otunun etken maddesi olan *Myrtus communis*'de kanser hücre hatlarında denendiği ve kanser hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığını belirlemişlerdir. MC'nin farklı biçimlerde farklı kanser hücre hatlarına uygulanmasıyla hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmiştir. Akut promiyelositik lösemi, akut monosit lösemi hücre hatlarına uygulanan MC'nin bu hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı belirtilmiştir. MC'nin apoptoz mekanizmasındaki kaspaz 3,8,9'a etkisi ve poly (ADP ribose) polymerase (PARP)'a etkisi araştırılmış ve artan MC ile kaspaz 9 miktarının azaldığı belirlenmiştir. Bu da mersin otunun etken maddesinin hücreyi apoptoza götürdüğünü göstermiştir. Mersin otunun kanserli hücre hatlarında uygulanmasının DNA degradasyonuna yol açtığı da tespit edilmiştir. Mersin otunun apoptozda etken birçok mekanizmada rol aldığı da belirlenmiştir.

Ülkemizde kolaylıkla yetişmekte olan mersin otu ile hastaları en az sitotoksiste ile tedavi edebilmek için bu konuda gerekli çalışmaların yapılmasını hedefleyen çalışmamız bundan sonraki araştırmalara da ışık tutacağını düşünmekteyiz.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser

Kanser, üzerinde çok fazla araştırma yapılan, günümüze kadar birçok bilim adamının üzerinde durduğu bir hastalıktır. Latince’de yengeç anlamına gelen “*crab*” sözcüğünden türetilmiştir. Bu hastalık başladığı bölgeden diğer organlara yayıldığında Yunanlı hekim Hipokrat bu tanımlamayı yapmıştır[16]. Kanser, hücrelerin farklılaşarak kontrolsüz, anormal ve aşırı derecede çoğalıp bir kitle ve tümör oluşturmasıdır. Kanserin birçok çeşidi vardır ama hepsi anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle başlamaktadır. Kansere sigara, kimyasallar, radyasyon, beslenme gibi dış kaynaklı sebepler yol açtığı gibi, kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün koşullar ve genlerdeki mutasyonlar da yol açmaktadır. Bu faktörler birlikte kansere neden olabileceği gibi tek başlarına da kansere sebep olabilirler [17].

Amerika’da ikinci ölüm sebebinin kanser olduğu belirtilmiştir. Hayatları boyunca erkeklerin yarısında ve kadınların üçte birinde kanser hastalığının görülebileceği belirtilmiştir. Günümüzde de milyonlarca insanın kanserli olduğu ve öncesinde kanser öyküsüne sahip olduğu belirtilmiştir [18].

Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi kanser tedavisinde kullanılan temel yöntemlerdir. Bunun yanında hormon tedavileri, hedefe yönelik tedaviler ve biyolojik tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu yöntemler tek başına kullanıldığı gibi birlikte de kullanılmaktadır. Genellikle kanserde birinci basamak olarak uygulanan cerrahi tedavi ilk uygulanan tedavidir. Bu tedaviden sonra adjuvan tedavi verilir. Cerrahi sonrası verilen kemoterapi adjuvan tedavidir. Neoadjuvan tedavi ise ilk basamak öncesi uygulanan tedavidir. Eğer tümör cerrahi olarak alınacaksa cerrahi uygulama öncesinde neoadjuvan kemoterapi uygulanır, ameliyat sonrası tekrar oluşma riskinin azaltılması ve hastalığın metastazının engellenmesi amaçlı adjuvan kemoterapi ve tümörün kontrol altında tutulması ve yan etkilerinin azaltılması amaçlı da palyatif kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Neo-adjuvan kemoterapi tedavi de tümörü sınırlı ve cerrahi olarak çıkarılması mümkün olan hastalarda, kitlenin küçültülüp ameliyatın kolaylaştırılması amacıyla verilir. Adjuvan kemoterapi tedavisi de hasta ameliyat olduktan sonra, tekrar oluşma riski değerlendirilerek lokal tekrarın önlenmesi veya hastalığın yayılmasını önlemek amacıyla verilir.

Palyatif kemoterapi tedavi ise yaygın hastalıkta tümörü geriletmek veya kontrol altında tutmak veya tümöre bağlı semptomların giderilmesi amacıyla verilir [19].

2.2 Meme Kanseri

2.2.1 Genel Özellikleri, Çeşitleri, Nedenleri

Meme kanserinin kadınlarda en sık görülen kanser türü olduğu ve %23 oranında görüldüğü belirtilmiştir. 100.000 kadında 45 yaşına kadar olanlarda 20.8’inde bu hastalık görülürken, bu değerin 45-60 yaş aralığında 186.7 kadında olduğu, 60-75 yaş aralığında ise 238.5 kadında olduğu belirlenmiştir [20]. 2005’teki kanser verilerinde meme kanserinin Türkiye’de insidansının 35-47/100.000 olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu kanserin ölüm hızı ve insidansının yaşla birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir[21]. 2000’li yıllarda Türkiye’nin farklı bölgelerinde meme kanseri dağılımının coğrafik, ekonomik, sosyal ve kültürel faktörlere bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Türkiye’nin batısında meme kanseri görülme sıklığı, doğu bölgelerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizin batı bölgelerinde 40-50/100.000 iken doğu bölgelerinde 20/100.000 oranında meme kanseri görüldüğü tahmin edilmektedir. Türkiye’de en sık rastlanılan kanserler içinde ikinci sırada meme kanserinin olduğu belirlenmiştir (Tablo 1) [22].

Tablo 1. 2002 yılında yapılan çalışmada Türkiye’de en çok görülen kanser türlerinden ilk beşinin insidansının gösterimi[22]

Organlar	Olgu Sayısı	Yüzde (%)	İnsidans* (100.000)
Akciğer	7802	15.26	11.26
Meme	5400	10.9	7.79
Mide	3407	6.88	4.92
Deri	3150	6.36	4.55
Mesane	2535	5.12	3.66
Diğer	27253	55	39.32
Toplam	49547	100	71.49

Türkiye’de meme kanserine bağlı ölüm oranları da incelendiğinde 45-64 yaş aralığında ölüm oranının arttığı belirlenmiş ve 70-74 yaşları arasında ise en sık olarak görüldüğü tespit edilmiştir (Tablo 2) [23].

Tablo 2.Türkiye’deki kadınlarda meme kanseri hastalığının yaşa bağlı ölümlerinin dağılımı [23]

Yaş Grubu	Bildirilen Ölüm Sayısı	%
15-24	4	0.4
25-34	44	4.1
35-44	163	15.4
45-54	287	27.1
55-64	231	21.8
65-74	188	17.8
75+	142	13.4
Toplam	1059	100

2.2.1.1 Meme kanseri nedenleri

Risk faktörü olarak uzun süreli oral kontraseptif ilaç alımı, östrojen, oksidatif stres, apoptozun engellenmesi, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınması, genetik yatkınlık, önceden geçirilen diğer kötü huylu meme hastalıkları, erken menarş, geç menopoz, obesitesi olan postmenopozal kadınlar, alkol kullanımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, ilk doğumunu geç yaşta yapmış kadınlar, pestisitlere maruz kalma belirtilmiştir.

Riski azaltan faktörler olarak da Asya ırkı, erken menopoz, 50 yaşından önce bilateral ooforektomi [24-25], emzirme [26-27],20 yaş öncesi gebelik [28], 14 yaş sonrası menarj, artan parite[29], fiziksel aktivite [30-31],selektif östrojen reseptör modülatörü kullanımı [32] bildirilmiştir.

Risk faktörü olmayan grup olarak da benign meme lezyonları [33], diyet (kahve, çay, diğer kafeinli içecekler, diyetsel fitoöstrojenler, meyve ve sebzelerin tutarlı bir etkisi saptanmamıştır) [34-35], ilaçlar (antibiyotikler, aspirin ve nonsteroid antiinflamatuvarların tutarlı bir etkisi saptanmamıştır) [36-37], düşükler [38], sigara [39] saptanmıştır.

Risk faktörü olarak reproduktif faktörlerin ilk primer meme kanseri için önemli olduğu belirlenmiştir [29]. Erken menapozun, geç yaşta menarşın, genç yaşta gebeliğin, gebelik sayısının artmasının, emzirme süresinin uzamasının azalmış meme kanseri riski ile bağlantılı bulunduğu ifade edilmiştir [26]. Meme dokusunun östrojene maruz kalma süresi erken menstruasyon yaşı ile uzar ve böylece erken menarş meme kanseri riskini arttırır [40]. İlk doğum yapma yaşı ile menstruasyon yaşı arasındaki sürenin uzunluğunun meme kanseri riskini arttırdığı ve uzun süren laktasyonların ovulatuvar dönem sayısını azaltarak koruyucu etki yaptığı varsayılmaktadır [41-42]. Evlenmemiş ve doğurmamış kadınlarda meme kanseri görülme olasılığının daha fazla olduğu ifade edilmiştir [43-44] [43, 44]. Geç menapozun ve ilk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmanın da meme kanseri riskini arttırdığı ifade edilmiştir.

Reproduktif faktörler ile farklı histolojik tipte meme kanserlerinin ilişkisi 27.397 invaziv meme kanserli kadında araştırılmıştır. Reproduktif faktörlerin hangi mekanizmayla meme kanseri gelişimine etkili olduğu tam anlaşılamamıştır ama laktasyon ve gebelik ve sırasındaki hormonal değişikliklerin koruyucu etkisi olduğuna inanılmaktadır [45]. Hormon replasman tedavisinin duktalden daha çok lobüler ve tübüler kanserde risk artışına sebep olduğu ifade edilmiştir [46]. Lobüler meme dokusunun da hormonlara duktal dokudan daha duyarlı olduğu söylenmiştir [47].

Yağdan zengin beslenme, diyetteki hayvansal yağların % 10'dan fazla olması meme kanseri riskini arttırmaktadır [48]. Ama diyetteki yağın % 5'in altında olması özellikle yağ içermeyen diyetle beslenme, tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir [43]. Bağırsaktan östrojen absorpsiyonunu engellediği için liften zengin gıdaların meme kanserini önleyebileceği düşünülmektedir. Alkol kullanan kadınlarda da meme kanseri daha fazla görüldüğü bildirilmiştir [43]. Diyetin etkisinin meme kanserinde çocuk ya da adölesanlarda erken yaşta oluştuğu, ileri yaşlardaki diyet değişikliğinin riskin azalmasına katkısının olmadığı bildirilmiştir [49].

Ayrıca meme kanseri mortalitesi, insidansının sosyoekonomik durumla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri mortalitesinin sosyoekonomik durumu düşük olan kadınlarda daha yüksek olduğu görülmüştür [50].

Meme kanserinde risk oluşturan en iyi saptanan etyolojik ajanın da radyasyona maruz kalınması olduğu ifade edilmiştir [49].

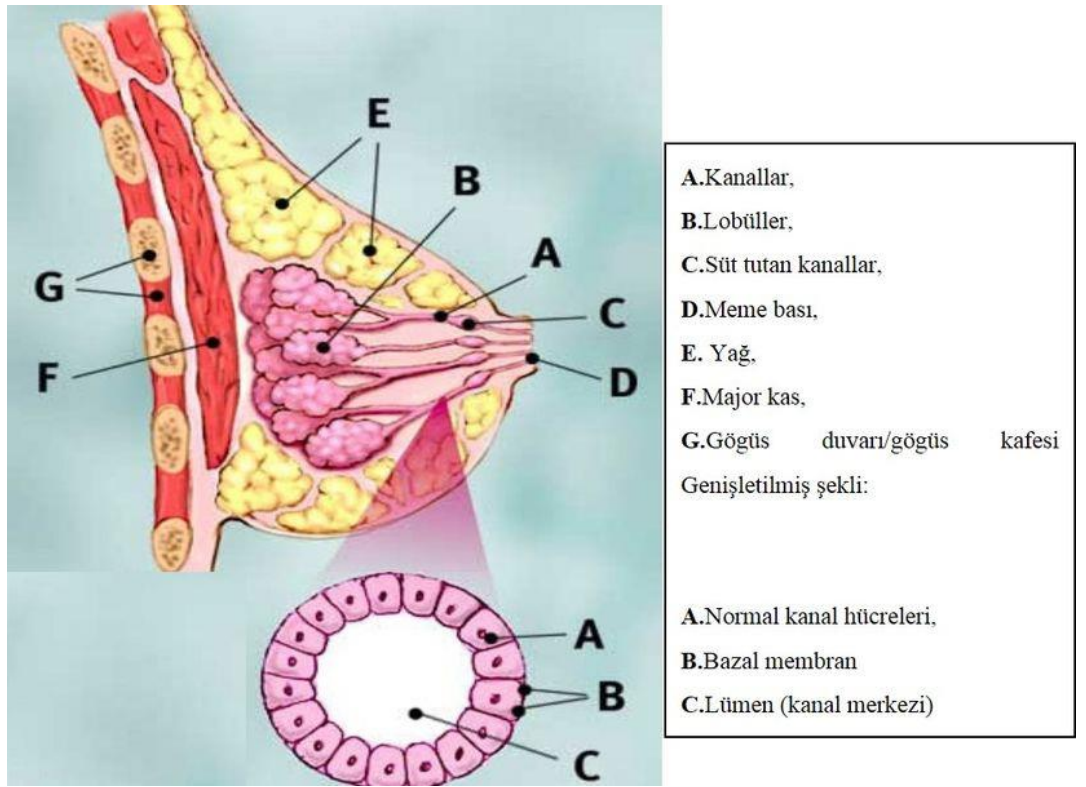
2.2.1.2 Meme kanseri evreleri

Amerikan Ulusal Kanser Merkezi meme kanserini tümör oluşumu ve etrafındaki dokulara sıçrama özelliklerine göre dört evreye ayırmıştır;

İnvaziv olmayan anormal hücreler Evre (Stage) 0'i oluşturmaktadır. Duktal karsinoma (ductal carcinoma in situ / DCIS) olarak tanımlanmaktadır. İnvaziv meme kanserinin erken evresi de Evre I olarak kabul edilir. Kanser başlangıç sayılıp meme dokusuna henüz yayılmamıştır. Tümoral doku büyüklüğü 2 cm'den büyük değildir. Evre (Stage) II'de tümör en fazla 5 cm ebatındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapıp yapmamasına göre gruplanmaktadır. Evre III ilerlemiş kanser tipidir. Kendi içinde üçe ayrılmıştır; Evre IIIA: 5 cm'den büyük olan tümördür, koltukaltı lenf düğümüne metastaz yapmış ve etrafındaki dokulara tutunmuştur. Evre IIIB: Göğüs duvarında ya da meme derisinde herhangi bir ebatta tümör veya koltukaltı lenf düğümüne ile karakterize evredir. Enflamatuvar meme kanseri olup meme kanserinin az görülen bir tipidir. Evre IIIC: bu tümör tipi herhang bir ebatta olabilir ve tümör koltukaltı ve göğüs lenf düğünlerine sıçramıştır. Lenf düğümlerinin önüne ve arkasına sıçrayarak buralara yayılırlar. Evre (Stage) IV'de uzak metastazik kanser olup karaciğer, kemik gibi vücudun çeşitli kısımlarına metastaz yapmıştır. Kanser tedavisi uygulanan ve kanserli dokusu uzaklaştırıldıktan sonra kanserin yeniden nüks etmesi durumu da tekrarlayan (rekürrent) kanser tipidir.

2.2.1.3 Meme Kanseri Çeşitleri

Meme kanserinin genelde süt bezlerinde, süt kanallarında ve lobüllerdeki hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile geliştiği belirlenmiştir. Ancak meme bezinin yağ ve fibröz doku bakımından zengin olan stromal dokularında daha az sıklıkta meme kanseri geliştiği ifade edilmiştir (Şekil 1) [51].



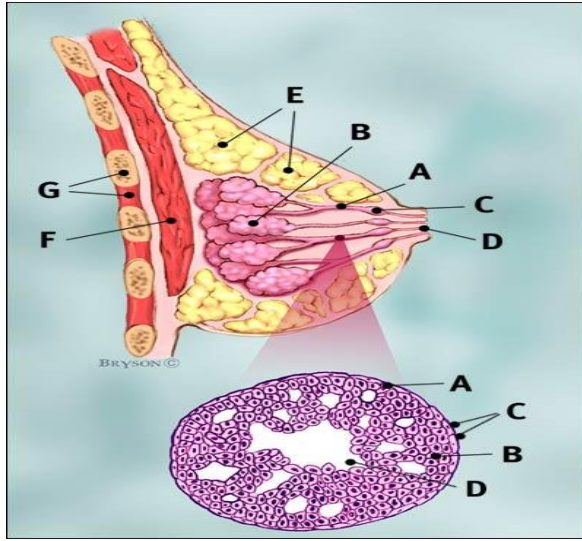
Şekil 1. Meme Kanseri Profili[51]

Meme kanseri; damarlar, süt kanalları, lobüller ve bazı durumlarda da aradaki dokular gibi memenin farklı bölgelerinde başlayabileceği gibi, farklı bölgelerde başlayan kanserler farklı karakteristikler gösterebileceği belirlenip buna göre çeşitlendirilmiştir. Bu çeşitler aşağıda belirtilmiştir[52].

2.2.1.3.1 Duktal Karsinoma

Bu tür meme kanserleri genellikle sütü meme ucuna taşıyan süt kanalları sırasında görülür (Şekil 2). Meme kanserlerinin yüzde 85-90 civarı bu bölgede oluşur. Meme kanserinin erken formu olarak belirlenmiştir. Sebebi için kesin bir şeyler belirtilmemekle beraber genetik mutasyon sebebi olduğu düşünülmüştür[52].

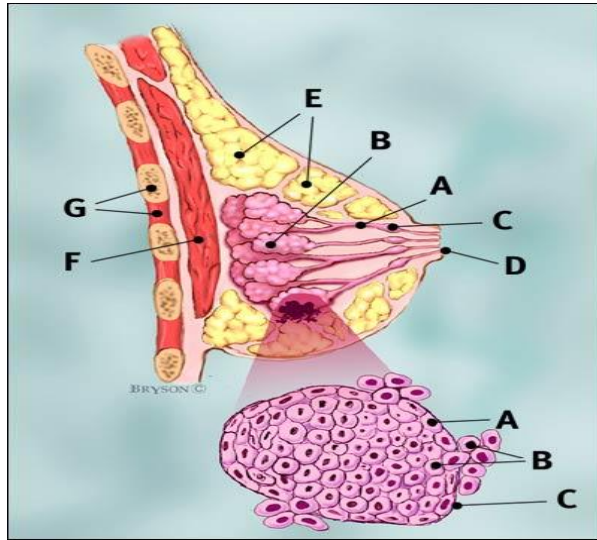
Eğer kanser DCIS (ductal carcinoma in situ) ise yayılcı cinste değildir ve başarıyla tedavi edilebileceği belirlenmiştir. Tamamen temizlendiği takdirde radyasyon tedavisiyle devam edilebileceği saptanmıştır[53].



Şekil 2. Duktal kanserin gösterimi.A.Kanallar, B.Lobüller,C.Süt tutan kanallar, D.Meme başı, E. Yağ, F.Major kas G.Göğüs duvarı/göğüs kafesi Genişletilmiş şekli;A. normal duct hücreleri,B. ductal kanser hücreleri,C. bazal membran,D. lümen[54].

2.2.1.3.2 Lobular Karsinoma

İnsidansı %1 - %20 arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu tür meme kanseri memede süt üretimini sağlayan bezlerde veya lobüllerde başlar (Şekil 3).



Şekil 3. Lobüller kanserin gösterimi. A.Kanallar, B.Lobüller, C.Süttutan kanallar, D.Memebaşı, E.Yağ, F.Major kas G.Göğüs duvarı/göğüs kafesi Genişletilmiş şekli; A.normal hücreler, B.bazal membranda bozukluk gösteren kanserli hücreler, C.bazal membran [54].

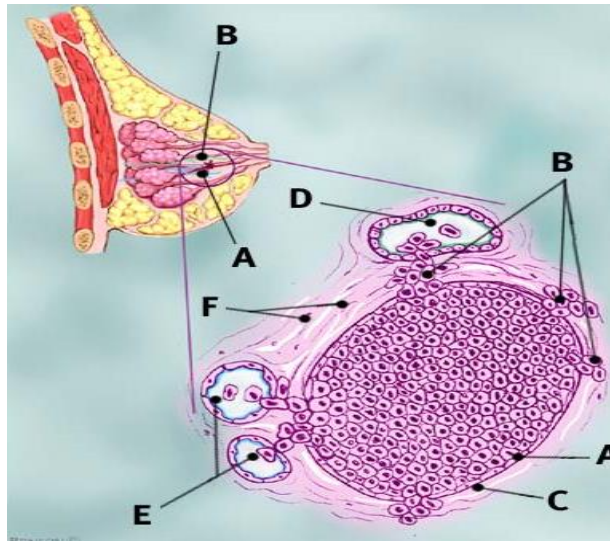
Lobüller memenin daha derin bir bölgesinde bulunurlar. Meme kanseri cinslerinden ancak yüzde 8'i lobüllerde oluşur. Eğer kanser LCIS (lobular carcinoma in situ) ise bu durumda sadece lobüllerde oluşur ve çevreye yayılmamıştır. Bununla birlikte invaziv lobüler karsinoma sık görülen invaziv kanserler arasında ikinci sırada geldiği belirtilmiştir. Bu meme kanseri türünün artması hormon tedavisi kullanımında da artmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. Yaş artışıyla beraber daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir.

Kemoterapi ve hormon tedavisi bu tür hastalarda sistematik olarak kullanılmaya başlanmıştır. %32-53 hastada kullanıldığı belirtilmiş ve sağ kalımı da arttırdığı görülmüştür[55]. Eğer tümörün çevresi temizse ve bir yere bağlı değilse Lumpektomi(memenin sadece tümörlü kısmının alınması) yöntemiyle tümör alınabilir. Tedavinin devamında radyoterapi uygulanabilir.

Eğer yayılcı tür bir kansere ve çevre meme dokularına sıçramışsa bu durumda mastektomiye(memeyle birlikte, memenin altındaki kasların ve koltuk altındaki lenf bezlerinin de çıkartılması) ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir [56].

2.2.1.3.3 İnvaziv Meme Kanseri

İnvaziv cinsteki meme kanserlerinin orjinal tümörün bulunduğu alandan dışarı memenin diğer dokularına veya vücudun diğer bölgelerine yayılma veya sızma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4) [57].



Şekil 4.Normal memeden kanserli hücrelerin lenf ve kan kanalına yayılmasıA.kan kanalları, B lenf kanalları. Genişletilmiş şekli;A.normal dukt hücreleri, B.kanserli hücreler, C.bazal membran, D.lenf kanalları, E.kan kanalları, F.Meme dokusu [54].

2.2.1.3.4 İnflamatuvar Meme Kanseri

Nadir rastlanan bir meme kanseri türü olan inflamatuvar meme kanserinde memede kırmızılık ve şişkinlik görüldüğü tespit edilmiştir. Bu görünüm, kanserli hücrelerin lenf damarlarının tıkanması sonucu ortaya çıktığı ve göğüs enfeksiyonu ile de karıştırıldığı belirtilmiştir [58].

2.2.1.3.5 Tekrarlayan Kanser

Bazı durumlarda belirli bir süre atlatıldığı sanılan kanser geri dönebilir. Bunun sebebi; kanser tamamen yok edilmiş gibi gözükse de bazı durumlarda tedaviden sonra da tespit edilemeyen kanser hücrelerinin vücudun bir yerinde kalmış olmalarından kaynaklanır. Tekrar memede ortaya çıkabileceği gibi vücudun diğer organlarında da ortaya çıkabileceği belirlenmiştir [59].

Meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalar üzere erken tanıda gelişmeler olmuştur. Bu kanserin biyolojisinin moleküler temeli üzerine de birçok çalışma yapılmıştır. Bunlara rağmen erken evre meme kanserli olguların %30'unda rekürrens görülmektedir [60].

Bir tümörün doğal seyrini önceden belirlemek için, kanserde tanı anında var olan, tedavi yapılmadığı durumda hastaliksız sağkalım ve genel sağkalımla ilişkili her türlü ölçümü ifade etmekte olan terim prognostik terimidir. Meme kanserinde bu amaçla kullanılan standart prognostik faktörlerin aksiller lenf nodu tutulumu ve sayısı, histolojik alt tip, tümör büyüklüğü, nükleer ve histolojik derece, ER (östrojen reseptör) ve PR (progesteron reseptör) durumu olduğu bildirilmiştir. Yaş, menapoz durumu, ırk gibi fiziksel etkenler, klinik etkenler, tümör boyutu ve büyüme şekli, tümörün yerleşimi, histolojik tür, tümörün derecesi, aksiller lenf nodu tutulumu, damar invazyonu, yaygın intraduktal komponent, cerrahi sınırlar, deri tutulumu, aksiller lenf nodu değişiklikleri, elastozis, lenfosit infiltrasyonu, tümör nekrozu olan patolojik özellikler, meme kanserinin evresi, kemik iliği metastazları, proliferasyon belirleyicileri, DNA içeriği, litik enzimler, steroid hormon reseptörleri, tümör baskılayıcı genler ve onkogenler olan biyolojik belirleyiciler meme kanserinin prognostik faktörleri olarak bildirilmiştir. Yanlınız hala üzerinde daha çok çalışma yapılmakta ve yenileri de bunlara eklenmektedir. Moleküler seviyede yapılan çalışmalar bunların bir parçasıdır ve üzerine birçok çalışma yapılmaktadır [61].

2.2.2 Genetik Faktörler

Meme kanserinin nedeninin çoğunlukla sporadik vakalar olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında yaklaşık %5-10 oranında kalıtsal nedenli ailesel meme kanserlerinin de görüldüğü ifade edilmiştir [62]. Normal popülasyonla anne, kız ve kız kardeşler arasında görülen meme kanseri karşılaştığında anne, kız ve kız kardeş arasında iki kat fazla bu kanserin görüldüğü belirtilmiştir. Aile hikayesinde meme kanseri olan gruplarda meme kanseri olma yaşı daha erken ve bilateral olma durumu mevcut olduğu bildirilmiştir [43]. Ailevi meme kanseri ile ilgili bazı genler üzerinde son zamanlarda yapılan çalışmalar artmış, bu genlerin meme kanseriyle ilgisi üzerinde durulmuştur[63].

17q21'e yerleşik olan BRCA-1'nin mutasyonu sonucu ailevi meme ve over kanseri meydana geldiği saptanmıştır. 13q12'ye yerleşik olan BRCA-2 geninin ise hastalığın erken ortaya çıkmasında ve bilateral olmasında önemli olduğu bildirilmiştir. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarına sahip kadınların meme kanserine yakalanma oranlarının %50-80 arasında değiştiği ifade edilmiştir[62]. Meme kanseri görülen bir kadında ikinci meme kanseri oluşma riskinin % 25-30 olduğu ve meme koruyucu cerrahi sonrası kalan meme dokusunun da risk altında olduğu bildirilmiştir. Ama bu riskin çok küçük bir risk olduğu, karşı memede oluşma riski kadar az ve senede % 0.5-1 olduğu saptanmıştır.

2.2.3 Tedavi yöntemleri

Psikolojik sıkıntının, sosyal stresin ve psikososyal desteğin etkisinin meme kanseri hastalarının tıbbi tedavisinde etkili olduğu ve tedavinin seyrini değiştirebildiği belirtilmiştir. Psikolojik desteğin ortadan kaldırmasının tedavinin etkisinde olumsuz sonuç oluşturabildiği bildirilmiştir[64]. Meme kanseri tedavisi için uygun görülen yöntemlerin de cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi ve hormon tedavisi olduğu belirtilmektedir.

Günümüzde kanser araştırmalarında doğru hedeflerin bulunması amacı ile moleküler hücre temelli çalışmalar önem kazanmaktadır. Buna binaen apoptotik yolaktaki genleri hedef alan birçok çalışma yapılmaktadır. Sitotoksik etkisi az olan bitkisel ajanlar da bu konudaki çalışma ajanlarıdır. *Myrtus communis*'de bu grupta çalışılması yapılan bir ajandır.

2.3 Baş ve Boyun Kanseri

2.3.1 Genel Özellikleri, Çeşitleri, Nedenleri

Baş ve boyun kanseri dünyada yaygın olarak 6. sırada malignant kanser olarak görülmektedir ve sağkalım oranı düşük olan kanser türüdür. Dünya çapında her yıl 550,000'den fazla baş ve boyun kanseri vakası hesaplandığı belirtilmiştir. Erkekler kadınlara oranla daha fazla bu kanserden etkilenirler [65]. Amerika'da, yılda 55,000 Amerikalı da gelişen baş ve boyun kanseri ve bu hastalıktan ölen 12,000 hasta ile birlikte %3 malignant baş ve boyun kanseri hesaplanmıştır[66]. Güney Amerikalı erkeklerde, ağız içi ve farenks kanseri dışında, larenks kanseri insidansının yaklaşık %50'nin üzerinde olduğu belirtilmiştir[67].2012'de American Cancer Society (ACS) 52,000'den fazla bireyde baş ve boyun kanserinden birinin tanısı konacağı belirtilmiştir. Saptanan baş ve boyun kanseri yassı hücreli kanserlerden ve varyantlarından oluşmaktadır [68].

2.3.1.1 Baş ve boyun kanserinin nedenleri

Bu kanserin risk faktörleri alkol, sigara kullanımı,insan papilloma virüsü enfeksiyonu (HPV) (orofarinks kanser için), ilgili organa göre viral etkenler, Epstein-Barr Virus (EBV) enfeksiyonu (nazofarenks kanseri) yaş, cinsiyet, meslek,ilaçlar, radyasyon, genetik faktörler, immünolojik etkenler, kimyasal ajanlar, travma, kronik iritasyon (sıvılar, yemekler, duman, buhar, toz vb.) kötü ağız hijyeniolarak belirtilmiştir[69]. Bu risk faktörlerinin dağılımının farklılığı sebepli dünyanın farklı bölgelerinde bu kanser türünün farklı alt tipleri görülmektedir [70].

2.3.1.2 Baş ve boyun kanseri evreleri

Bu bölge malignitelerinde diğer bölge bölgelerin malignitelerinin evrelendirilmesinde olduğu gibi TNM sistemi kullanıldığı, T-tümörün lokal yayılımını N- tümörün bölgesel (servikal) lenf nodu yayılımını, M- tümörün uzak organ metastazını gösterdiği belirtilmiştir. Baş-boyun kanserlerinde başvuru, tanı, tedavi ve takip aşamasında, prognozda tümörün primer (T) ve bölgesel (N) boyutunun önemli olduğu bildirilmiştir. Uzak metastazın başvuru anında sık görülen bir durum olmadığı saptanmıştır.

Aynı zamanda bu bölge kanserlerinde boyun lenf nodu metastazı (bölgesel-rejyonel tutulum) bazen klinik olarak çok belli olup (palpabl lenf nodu ve/veya radyolojik incelemede patolojik lenf nodu), bazen de gizli kalabilir. Bu nedenle bu hastalarda klinik olarak patolojik lenf nodu olmasa bile gizli metastaz yapma riski yüksek lezyonlarda da sıklıkla primer tümör rezeksiyonuna lenf nodu diseksiyonu da eklenir. Bununla birlikte evreleme için, klasik fizik muayene ve endoskopik inceleme sonrasında BT ve/veya MR gibi ileri radyolojik tetkikler de gerekebileceği belirtilmiştir [71]. Ayrıca çeşitli bölgelerde tümörün T sınıflandırılması yapılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Tümörün T sınıflandırılması

TÜMÖR LOKALİZASYONU	T1	T2	T3	T4
Dudak ve oral kavite	En büyük boyutu 2 cm ve daha az olan tümör	En büyük boyutu 2 cm'den büyük, 4 cm'den küçük olan tümör	En büyük boyutu 4 cm'den büyük olan tümör	Kemik korteksi, dil, boyun cildi, dilin ekstresek kasları, maksiller sinüs gibi komşu yapıları invaze eden tümör
Orofarenks	En büyük boyutu 2 cm ve daha az olan tümör	En büyük boyutu 2 cm'den büyük, 4 cm'den küçük olan tümör	En büyük boyutu 4 cm'den büyük olan tümör	Kemik korteksi, boyun yumuşak dokuları, dilin ekstresek kasları, gibi komşu yapıları invaze eden tümör
Hipofarenks	Hipofarenksin bir alt bölgesine sınırlı tümör	Hemilarenksin (kor-dun) fiksasyonu olmaksızın hipofarenksin birden fazla alt bölgesini veya bir komşu bölgeyi invaze eden tümör	Hemilarenksin (kor-dun) fiksasyonu ile birlikte hipofarenksin birden fazla alt bölgesini veya bir komşu bölgeyi invaze eden tümör	Kıkırdak veya boyun yumuşak dokuları gibi komşu yapıları invaze eden tümör
Nazofarenks	Nazofarenksin bir alt bölgesine sınırlı tümör	Nazofarenksin birden fazla alt bölgesini invaze eden tümör	Nazal kaviteyi ve /veya orofarenksi invaze eden tümör	Kafatabanı ve/veya kranial sinir(ler)i invaze eden tümör
Tükrük bezleri	En büyük boyutu 2 cm'den küçük olan tümör	En büyük boyutu 2 cm'den büyük, 4 cm'den küçük olan tümör	En büyük boyutu 4 cm'den büyük olan, 6 cm'den küçük olan tümör	En büyük boyutu 6 cm'den büyük olan tümör
Ta: Lokal yayılım (cilt, yumuşak dokular, kemik veya sinire) bulguları yok.Tb: Lokal yayılım (cilt, yumuşak dokular, kemik veya sinire) bulguları var				

Tüm anatomik bölgeler için N sınıflandırılması 2 ayrı şekilde yapılabilir (Tablo 4).

Tablo 4. Tüm anatomik bölgeler için N sınıflandırılması

N ₀	N ₁	N _{2a}	N _{2b}	N _{2c}	N ₃
Palpabl lenf nodu yok	En büyük boyutu 3 cm' den küçük tek, ipsilateral lenf nodu	En büyük boyutu 3 cm' den büyük, 6 cm' den küçük olan, tek ipsilateral lenf nodu	Hiçbirinin en büyük boyutu 6 cm' yi geçmeyen, multipl ipsilateral lenf nodları	Hiçbirinin büyük boyutu 6 cm' yi geçmeyen, bilateral veya kontrateral lenf nodları	En büyük boyutu 6 cm' yi geçen lenf nodu veya nodları

Yine tüm anatomik bölgeler için M sınıflandırılması şu şekilde yapılabileceği belirtilmiştir; M₀; uzak metastaz yok ve M₁; uzak metastaz var.

Bu TNM sınıflandırılması paralelinde evrelendirme ise şu şekilde yapılabileceği şu şekilde belirtilmiştir:

EVRE-I : T1 N₀ M₀

EVRE-II : T2 N₀ M₀

EVRE-III: T3 N₀ M₀

T1 N₁ M₀

T2 N₁ M₀

T3 N₁ M₀

EVRE-IV: T4 N₀ M₀

T4 N₁ M₀

N₂ M₀ tüm T'ler

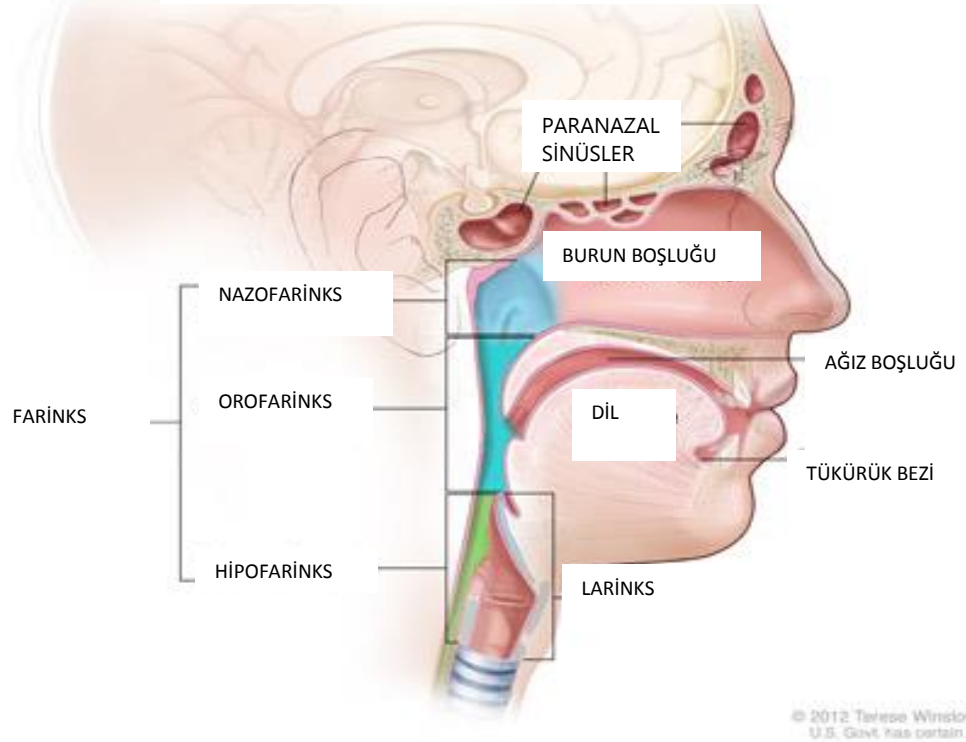
N₃ M₀ tüm T'ler

M₁ tüm T ve N'ler

2.3.1.3 Baş ve boyun kanseri çeşitleri

Yeme, içme, çiğneme, solunum ve konuşma gibi yaşamın temel fonksiyonlarını etkileyen baş ve boyun bölgesinde lokalize malign neoplazmlar, tüm vücut neoplazmalarının %5-7'si kadarını oluşturduğu belirtilmiştir. Baş-boyun kanserleri tükürük bezlerinden; parotis, submandibüler, sublingual, minör, üst solunum ve sindirim yolu mukozasından; oral kavite, nazo, oro ve hipofarenks, nazal kavite ve paranasal sinüsler, larenks ve trakea, servikal özefagus, tiroidden, temporal kemik ve kulaktan, baş-boyun cildinden ve kafatabanından malignitlerinden oluşmaktadır (Şekil 5).

BAŞ BOYUN KANSERİ BÖLGELERİ



Şekil 5. Baş ve boyun kanserinin görüldüğü bölgeler [72]

Baş ve boyun kanserli hastaların bir veya daha fazla semptom ile hastaneye başvurduğu ve kesin tanı için biyopsi yapılan bölgeyle beraber hücre yapısının da önemli olduğu belirtilmiştir. Baş ve boyun kanserinin histopatolojik incelemeleri adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinom olarak gruplanmıştır. Bezsiz dokularda ortaya çıkan adenokarsinomlar baş ve boyun kanserinin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Adenom olarak görülen bu kanser tipi benign bir bezsiz tümördür. Birçok organdan köken alan yassı hücreli karsinom da skuamöz hücreli karsinomdur. Mukoz membranları da kapsayan ve vücudun her tarafında görülebilen bu tür baş boyun kanserinin dünyada en sık görülen 6. kanser türü olduğu belirtilmiştir[73]. Bu tip kanser hastalarının üçte ikisi ileri evrede hastaneye başvuran hastalardır [74]. Baş ve boyun kanseri tedavileri gelişmesine rağmen son 40 yılda sağ kalım oranında iyileşme görülmediği belirtilmiştir [75]. Bu hastaların içinde ileri evre hastalık görülen kişilerde iki yıl içerisinde %50-60 oranında bölgesel nüks ve %20-30 oranında uzak metastaz görüldüğü belirtilmiştir[76].

2.3.2 Genetik Faktörler

Baş-boyun skuamöz hücreli kanserler ileri yaşta kişilerde daha sık görülmekle birlikte, aynı kişide birden çok lezyon gelişebilir. Preinvaziv ve invaziv şekillerin varlığı, preinvaziv formdan invaziv hastalığa geçiş gösterebilmesi, sigara, alkol gibi dış etmenlerin etyopatogenezde rol alması, ikinci malignitelerin sık görülmesi nedeni ile normal dokunun transformasyonla displaziden invaziv karsinoma geçişini içeren çok basamaklı tümörigenezisteki genetik değişikliklerin tanımlanmasına sebep olmaktadır [77].

Baş-boyun kanserlerinde tümör baskılayıcı genlerden p53'ün rolünün olduğu saptandığından bununla ilgili araştırmalar da artmıştır. Bunun yanında bir diğer hücrel onkogenin epidermal growth faktör reseptör (EGFR) geni olduğu bildirilmiştir. Baş-boyun kanserlerinde araştırma konusu olan diğer bir grubun da hücre çoğalması, bölünmesi farklılaşma ve apoptozda rolü olan myc ailesi olduğu bildirilmiştir.

p16 (INK4) tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonu bu kanser tipi için en sık rastlanan genetik değişikliklerden birisidir. Baş-boyun kanseri hücre kültürüne p16 genini yüksek düzeyde üretebilecek şekilde dizayn edilen adenovirus (Ad5-p16) *in vitro* olarak uygulandığında hücre büyümesinin %96'ya varan etkinlikte ekspresyonunun düşebileceği bildirilmiştir[78].

Tümör süpressör gen olan ING3 geninin de baş boyun kanseri ile ilişkisi üzerine çalışılmıştır. Özellikle larinks ve dil tümörlerinde ING3 ekspresyonun düşmesinin mortaliteye eğilimi arttırdığını ifade etmişlerdir[79].

2.3.3 Tedavi Yöntemleri

Bu kanser türü için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler kullanıldığı ama bununla birlikte moleküler hedefli tedaviler kullanılmaya başlandığı belirtilmiştir[80]. Tedavi oluşturulmasında önemli faktör, bu bölge malignitelerinin köken aldıkları bölgede lokal invazyon yaparak ve bölgesel lenf nodlarına metastaz yaparak sınırlı kalma eğiliminde olması gerektiği belirtilmiştir (loko-rejyonel yayılım). Bazı bölgeler ve patolojiler haricinde uzak metastazın bu tümörlerde ender görüldüğü saptanmıştır. Bundan dolayı cerrahi ve radyoterapiyi içeren lokal tedavinin yeterli olduğu belirtilmiştir.

Tümörün histolojisi, hastalığın lokal veya bölgesel yaygınlığı ve hastanın genel durumuna bağlı tedavi tipinin değiştiği, gerektiğinde birinin uygulandığı gerektiğinde tedavilerin birlikte uygulandığı belirtilmiştir. Bu kanser türünde genelde cerrahi primer tedavi seçeneğidir. Erken evre olgularda primer cerrahi tedavinin yeterli olduğu saptanmıştır. İleri evre olgularda ise genellikle radyoterapi, ender olarak da kemoterapi ile kombine edildiği ifade edilmiştir. Olguların az bir bölümünde özellikle erken evre tümörlerde (T₁N₀) tek başına radyoterapinin kullanılabilceği, ileri evre olguların az bir kısmında ise radyoterapi ve kemoterapi tedavi yöntemidir. Rekürrent, rezidüel hastalıklarda cerrahi ile kurtarma girişimi yapıldığı, çok ilerlemiş ve inreze tabl olgularda ise ağrının kontrolü gibi palyatif amaçlı terminal dönem bakımını içeren tedavi uygulandığı ifade edilmiştir [81].

Sitotoksik etkisi az olan bitkisel ajanlar kullanılarak bu kanser tipinde de çalışmalar sürdürülmektedir. *Myrtus communis*'de bu tür hücre hattı üzerinde çalışmamızda kullanılmış bir ajandır.

2.4 *Myrtus communis* (Mersin otu)

2.4.1 Tarihçesi

Mersin otu bitkisi yüzyıl öncesinden bu yana bilinen kullanılan bir bitkidir. İbraniler'in "*güzel kokulu bitki bahçeleri*" adını verdikleri çok miktarda baharat bitkisinin doğal olarak yetiştiği verimli topraklara sahip vadilerinde bulunan bu bitkinin yapraklarının İbranilerce çokça kullanıldığı belirtilmiştir. Yunan mitolojik hikayelerinde kullanılan mersin otu antik Yunanistan'da da mutfakta ve tıpta kullanılmıştır. Yunanlılar ağır yemeklerinden sonra sindirimi kolaylaştırmak için bu bitkiden yapılan içecekleri içerlerdi. Galyalılar da defne, nane ve mersin bitkisinin dallarından yaptıkları küçük çelenkleri taç şeklinde başlarına takarlardı[82].

Mersin ağacının İslam kültüründe de önemli yeri olduğu belirtilmiştir. Bununla ilgili farklı rivayetlerden bahsedilmektedir. Nuh peygamberin tufan sonrasında gemiden indikten sonra ilk mersin ağacı diktiği rivayet edilmiştir. Adem peygamberin ise cennetten dünyaya inerken yanında üç şeyi getirdiği rivayet edilmektedir. Bunlar buğday, hurma ve dünya çiçeklerinin en iyisi, güzeli olarak ifade edilen mersin ağacıdır[83]. Bu manevi değerleri bu bitkiye yüklenmesi sebebiyle bazı yörelerimizde mersin bitkisinin taze dallarının kabir ziyaretinde kullanıldığı ve bazı yerlerde de vefat eden kişinin yıkanacağı suya mersin yapraklarının atıldığı anlatılmaktadır[84].

2.4.2 Yapısı ve özellikleri

Myrtaceae familyasının yaklaşık 100 cins ve 3000 türü kapsayan büyük bir familya olduğu ve çoğunluğunun Güney Amerika ve Avustralya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yetiştiği belirtilmiştir (Tablo 5)[85]. Yalnızca *Myrtus communis* 'in Akdeniz çevresinde yayıldığı belirtilmiştir. Farklı habitat (yetiştirme yeri- ortamı) şartlarında yetişebilen mersin bitkisi geniş ekolojik değişkenlik göstermektedir. Üreme kapasitesi büyük olmakla birlikte yavaş büyümektedir [86]. Ama uzun ömürlü bir bitkidir; gövde çevresinin 100 yılda ancak bir metre olabildiği belirtilmiştir.

Tablo 5. *Myrtus communis*'in taksonomik sınıflandırılması [87]

TÜBİTAK- Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı	
Kingdom:	<i>Plantae</i>
Subkingdom:	<i>Tracheobionta</i>
Division:	<i>Magnoliophyta</i>
Class:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclass:	<i>Rosidae</i>
Order:	<i>Myrtales</i>
Family:	<i>Myrtaceae</i>
Genus:	<i>Myrtus</i>
Species:	<i>Myrtus communis Linnaeus</i>

Bitki içeriği flavonoidler, kumarinler, uçucu bitki yağı, sabit yağ, lifler, şekerler, sitrik asit, malik asit ve antioksidanlar gibi etkin bileşenlerden oluşmaktadır. Kimyasal bileşenleri ve farmakolojik profili sebebiyle bu bitki kapsamlı inceleme altına alınmıştır. Orta Doğu ve Kuzey Amerika'nın ılıman bölgeleri, Akdeniz bölgesi ve Avustralya' da doğal olarak yayılım gösterdiği belirtilmiştir[88].

M. communis bitkisi Türkiye, Tunus'un kıyı bölgeleri, Fas, ve Fransa' da yabancı olarak yetişmektedir. Bununla birlikte İran, İspanya, İtalya, Eski Yugoslavya ve Korsika' da kültürü yapılmaktadır[88].

Ülkemizde de Akdeniz Havzasının tipik doğal bitkilerinden olan *M. communis* 'in; Ordu, Sinop, Trabzon, İzmir, Samsun, Muğla ve Hatay illerinde doğal olarak bulunduğu belirtilmiştir[89]. Bu bitki ülkemizde "Mersin" adıyla bilinmektedir, ama Güney sahillerinde "murt", "hambeles" ve "adi mersin" adlarıyla da bilindiği, bazı yerlerde ise yaprağına "bahar" dendiği belirtilmiştir[90].

Myrtus communis L. (mersin, murt)'un Akdeniz florasının karakteristik bir temsilcisi olduğu ve küçük yapraklı, 1,8-2,4 m boyunda ve yarıklı kabukları olan çekici, aromatik bir çalı olduğu belirtilmiştir (Şekil 5). Hoş kokulu beyaz çiçekleri Mayıs ve Ağustos ayları arasında görüldüğü, yenilebilen mavi-siyah meyveleri yazın olgunlaşır. Yaygın olan myrtle 2.4-3 m uzunluğunda dik gövdeli, dalları yakın ve yaprakları dört mevsim yeşildir. Bitkinin kökü dallanmış, koyu yeşil yaprakları da parlak, tüysüz, sert, zıt şekilde, eşli ve helezonik şekilde oval ve mızraksı şekildedir. Bitki orta boyda 2 cm çapında kalın sarı arterlere ve ince pedinküllerinde aksiller beyaz çiçeklere sahiptir (Şekil 6). Taç yaprakları beyaz bezelerle ve ince tüylerle kaplıdır. Bunlar da etrafa hoş bir koku vermektedir.



Şekil 6.*Myrtus communis* bitkisi

Meyveleri bezelye büyüklüğünde olup yuvarlak, elips şeklinde mavi, beyaz veya siyahtır. Bunlar farklı boyutlarda (0.7-1.2 cm) ve şekillerdedir. (Şekil 7). Tüysüz meyveleri yuvarlak orta kısımları şişkin, dış kısımları da 4-5 parçalı çanağa sahiptir. Olgun meyveleri ilk olarak soluk yeşildir, sonra koyu kırmızıya döner ve sonunda tam olgunlaşınca çivit mavisi rengini alır. Olgunlaşmamışken acı tatları olan meyveleri, olgunlaştığında tatlılaşır. Son derece kuraklığa dayanıklı, az miktarda suya ihtiyaç duyan bir bitkidir. Toprağının sulamaları arasında kuru olması sağlanmalıdır. Nemli yerlerde, 800 m. rakımlı yerlere kadar yetişebilmektedir. Çiçeklenme zamanı da yaz mevsimidir[91].



Şekil 7. *Myrtus communis* Linn.

Meyveleri antiseptik, kanama durdurucu[92], karminatif[93], yatıştırıcı, emenagog[93], ağrı kesici, hemostatik[94] antiemetik, kardiyotonik, antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Yapraklarının da çeşitli farmakolojik etkileri mevcuttur; kanamayı durduran, antiseptik, hipoglisemik, laksativ, hemostatik. Köklerin de antibakteriyel özelliklerinin olduğu bildirilmiştir.

Bu bitkinin geleneksel olarak antiseptik, dezenfektan ve hipoglisemik ajan olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bitkinin farklı kısımları farklı işlevlerde kullanılmaktadır; örneğin et ve soslar için tatlandırıcı veya kozmetik enstitüsünde. Yapraklarından elde edilen esansiyel yağ Fransa'da dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda Paris'teki hastanelerde romatizmal hastalıklarda lokal uygulamalar için tavsiye edildiği ve solunum, mesane ile ilişkili hastalıklarda kullanıldığı belirtilmiştir[95]. Bu bitki lif, şeker ve antioksidanla birlikte birçok aktif biyolojik bileşik içerir[96]. Meyvelerinde flavonoid, antosiyanin fenolik bileşiklerini içerir. Tohumlarında %12-15 oleik, linoleik, miristik, palmitik, linoleik ve lorik asit olan gliserid içerirler.

Çalışmalardaki myrtle meyvelerindeki yağ asidi analizinde 14 yağ asidinin mevcut olduğu belirtilmiştir. Oleik asidin en çok bulunduğu (%67.07) içeriğinde palmitik asit (%10.24) ve stearik asit (%8.19) oranlarında bulunmaktadır[97].

Bitkinin meyvelerinin içeriğinde; sitrik asit, malik asit, reçine, tanen, yağ, şeker, flavonoidler, antosiyanin, glukozit, arabinosit, kamferol, 3-o-glükoz mirisetin, kuersetin, mirisetin, 3-di-o-galaktosid, 3-o-glukosid, mirisetin 3, kafeik asit bulunduğu belirtilmiştir[98]. Yapraklarında tanen, flavonoid, kumarin, myrtucommulone A & B, semimyrtucommulone, kafeik, gallik ve ellajik asit mevcuttur[99].

Köklerinde taninler, alkaloidler, glikosidler, şekerler, yağ, gallik asitler, fenolik asitler, kuersetin ve patuletin varlığı saptanmıştır[100]. Fitokimyasal çalışmalarda mersin bitkisinin çeşitli kısımlarından elde edilen bileşiklerin şunlar olduğu belirtilmiştir: 1,8-sineol (ökaliptol), mirtenol, alfa pinen, jeraniol, nerol, kamfen, beta pinen, mirsen, limonen, gama terpinen, p-simen, terpinolen, linalol, linalil asetat, kafur, bornil asetat, karyofilen, alfa terpineol, alfa terpinil asetat, mirtenil asetat, neril asetat, jeranil asetat ve metil öjenol uçucu yağda bulunmaktadır[101]. Pentasiklik triterpen asitleri (kloroform ekstresindeki); oleanolik asit, krataegolik asit ve terminolikasit [102]. Gövdesinin petrol eteri ekstresinde bulunan bileşikler; heksakosanoat, oktakosanol ve betasitositerol[103]. Mısır'da yapılan bir çalışmada saptanan bileşikler; (sadece farklı olanlar) terpin-4-ol formilester, timol format, 4-terpinol ve beta-elemen. Flavonoid bileşikler; galaktozil 3-mirisetin, ramnozil mirisetin, galaktozil 3-kuersetin, glukozil 3-kuersetin, patuletin, kamferol, kaffeik asit, mirisetin-3-ramnoglikozid, mirisetin 3,3'- digalaktozid, mirisetin 3'-glukozid, eskulin, eskuletin, kuersetin-3-beta (6'-0-galloilgalaktozid), gallik asit, ellajik asit, ellagitanninler, proantosiyanidinler[104]. Antosiyanidin pigmentleri; delphinidin, petunidin, malvidin, peonidin, siyanidin-3-monoglukozid ve siyanidin-3,5-diglukozid (meyvalanda). Tanenler en yüksek oranda yapraklarda bulunurlar; yapraklarda %14-19 civarında olan tanen miktarı köklerde %6.64,-6.8'e düşmektedir. Açıl floroglukinoller; mirtukommulon-A,B,C ve mirtukommulon-D. Ayrıca alkanlar, reçine, çeşitli vitaminler (A,B ve C vitaminleri), bol şeker ile malik ve sitrik asit de saptanmıştır.

Avcı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bornova araştırma alanında bulunan Mersin (*Myrtus communis* L.) bitkilerinde farklı hasat zamanlarının uçucu yağ oranlarına etkisini araştırmaktır. Bu çalışmada *M.communis*'in yapraklarından elde edilen uçucu yağ oranları ile diğer araştırmacıların bulmuş oldukları sonuçların paralel olduğu ve Bornova ekolojik koşullarında en yüksek uçucu yağ oranını sağlayabilmek için en uygun hasat zamanının temmuz ayı olduğu belirtilmiştir[105]. Bizim çalışmamızda da mersin otu ekstraktı temmuz ayında hasat edilen bitkilerden elde edilmiştir.

2.4.3 Uygulama alanları ve kanserle ilişkisi

Myrtus communis(mersin, murt)içeriğinin zenginliği sebebiyle çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu bitkinin eski Yunan zamanından beri önemli bir ilaç olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bu bitkiyi yaprakları, meyveleri ve çiçekleri sebebiyle yetiştirmektedirler. Yaprakları ve meyveleri mide ülseri, ishal, dizanteri, kusma, romatizma, kanamalar, derin sinüsler gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Mersin bitkisinden elde edilen uçucu yağ bileşiminde bulundurduğu komponentler sebebiyle tıpta ve ilaç sanayinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir[105]. Çok sıkı ve ince dokulu olan mersin bitkisinin odununun marangozculukta ince işlerde kullanıldığı belirtilmiştir[106].

Araştırmacılarının en çok dikkatini çeken bu bitkiden elde edilen uçucu yağıdır (Mersin Esansı; Oleum Myrti). Bu yağın yapraklarda daha çok bulunduğu, meyve ve çiçeklerde daha az olduğu bildirilmiştir. Başlıca kullanım alanı olarak da parfümeri,kolonya gibi şeylerde koku verici olarak, çeşitli içeceklerde, şekerlemelerde, çeşni karışımlarında, soslarda, dondurmada ve fırıncılık ürünleri belirtilmektedir. *Myrtus communis*'in farmakolojik etkileri olarak; anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-mollussisidal, böcek öldürücü, anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-diabetik, kolesterole karşı koruyucu, anti-mutajen, kanser hücrelerinde apoptoza götürme, kardiyovasküler aktivitesi, tekrarlayan aftöz ülserle karşı koruma, karaciğer iskemisine karşı koruma, anti-ülser, ağrı kesici aktivitesi belirtilmiştir[107].

Endüstride mersin bitkisi esas olarak gıda,eczacılık, parfümeri ve kozmetik alanında kullanıldığı belirtilmiştir. Ayrıca yüksek oranda içerdiği tanen dolayısıyla tanenin kullanıldığı tüm alanlarda kullanıldığı bildirilmiştir. Bu alanlar;tıpta,astrenjan, antidiyareik, antibakteriyel, antienflamatuar olarak, dericilikte tabaklama işlemi için, fotoğrafçılıkta ve lastik endüstrisi.

Belirlenen terapötik dozlarda herhangi bir yan etkinin veya sağlık tehlikesinin gözlemlenmediği belirtilmiştir. Nadiren bu bitkiden elde edilen yağın kullanımı sonrasında bulantı, kusma ve ishal gözlemlenmiştir. Mersin otundan elde edilen yağın aşırı dozu (10 g'dan fazlası) yüksek sineol sebebiyle zehirlenmeye yol açabilmektedir. Bu zehirlenmenin belirtisi olarak da kan basıncının düşmesi, dolaşım bozuklukları, solunum yetmezliği görüldüğü belirtilmiştir[108].

Bu bitkinin en önemli özelliklerin biri olarak antikanserojen aktivite olması belirtilmiştir. Lakin folklorik tıpta da laboratuvar çalışmalarında da mersin bitkisinin çok tanınmadığını, üzerinde çok çalışmanın olmadığını belirtmişlerdir.

Günümüzde kullanılan ilaçların çoğunun, doğal olarak bulunanprototip maddelerin birtakım sentetik işlemlerle daha uygun ve etkili hale getirilmesiyle elde edildiği belirtilmiştir. Bu sentetik işlemlerin halen devam ettiği ama yeni kemoterapötik ajanların oluşturulmasında karşılaşılabilecek en büyük sorunun yeni prototip maddelerin bulunması olduğu bildirilmiştir. Protip maddelerin kaynağı olarak ise 1.000.000'a yakın bitkiler alemi bildirilmiştir. Protiplerle ilgili sıkıntının kanser ilaçlarında da mevcut olduğu, bundan dolayı yeni prototiplere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Bundan dolayı mersin bitkisinin güçlü antikanserojen aktivitesi bir çalışma alanı oluşturmaktadır.

Mersin bitkisi ile yapılan örnek bir çalışmada değişik bitki ekstraktları kullanılarak AHH (Ari Hidrokarbon Hidroksilaz) enzim aktivitesi ve 3HBenzo (a) piren'in DNA'ya bağlanması üzerine olan etkileri incelenmiştir. Çalışma esnasında distile suda hazırlanan ekstraktlarından hiçbirisinin etkili olamadığı belirtilmiştir. Lakin bazı organik solventlerle elde edilen ekstraktların bir kısmı her iki aktiviteyi de belirli oranlarda inhibe etmişlerdir. Mersin bitkisinin de butanolik ekstraktının 2 mg'lık konsantrasyonda AHH aktivitesini inhibe etmiştir, ayrıca 3H-B (a) P'nin inek timüs DNA' sına bağlanmasını da aynı dozlarda engellediği belirtilmiştir. Çalışma sonunda antikanserojen aktiviteye sahip maddelerin suda çözünmediği, organik solventlerle elde edilen ekstraktların etki güçlerinin daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Başka bir grup tarafından yapılan çalışmada da mersin bitkisinin de içlerinde olduğu 10 adet bitkinin etanolik ekstraktlarının AHH enzim aktivitesine ve 3H-B (a) P'nin fare karaciğer mikrozomal proteinine bağlanmasına olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada mersin bitkisinin diğer bitkilerden daha yüksek bir aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Mersin bitkisinin bu etkisi bol miktarda flavonoid içermesine bağlanmıştır. Bunun yanında antikanserojen aktiviteye sahip başka maddeler de bu olayda söz sahibi olabilir[109].

Mersin otu ile ilgili yapılan antikanserojen çalışmaların ilklerinin bunlar olduğu belirtilmiştir. Daha sonraki zamanlarda bu bitkinin farklı kanser tipleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve mersin otunun farklı kanser türlerinde kanserli hücreleri apoptoza götürdüğü bildirilmiştir. Buna örnek 2008'de Tretiakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mersin otunun farklı kanser hücrelerini mitokondriyal yoldan apoptoza götürdüğü belirtilmiştir [5]. Ayrıca Mothana ve arkadaşlarının 2011'de bitkilerle yaptıkları çalışmada mersin bitkisinin anti-kanser özelliği üzerinde durulmuştur [110].

2.5 Apoptoz

Apoptozun ilk tanımlanması 1842 yılında Vogt tarafından yapılmıştır; Yunanca'da apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinden oluşan terim, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak belirtilmiştir. Apoptoz terimini ilk defa patolog Kerr, Wyllie ve Currie'nin 1972 yılında kullandığı ifade edilmiştir [111].

Hasara uğramış hücrelerin veya organizmada görevini tamamlamış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümüne apoptoz denilmektedir. Birtakım genetik faktörler veya hücre dışı lezyonlar ile aktive edilen ve hücre tarafından programlanmış bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol eden bir olan apoptoz, yaşamın farklı evrelerinde büyük önem taşımaktadır [112].

Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur. Bu da; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısının artması ve bunun aksine apoptoz oranının artması hücre sayısının azalması ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelmesi anlamındadır [113].

Apoptoz gelişim sırasında, immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları ve normal dokunun metabolik döngüsü gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerde, Alzheimer hastalığının da dahil olduğu bazı major nörodejeneratif bozukluklarda, otoimmün bozukluklarda, AIDS'de ve malignitelerin dahil olduğu daha birçok patolojik durumlarda da rol aldığı belirtilmiştir [114]. Tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün yalnızca apoptozla olduğu, çok hücreli organizmalarda da genetik oluşumlu hücre hasarının engellenmesi veya hücrenin tamamen yok edilmesin de apoptozun rol aldığı belirtilmiştir. Tüm bunlardan dolayı hasar yayılması ve tümör oluşumu engellenir. Apoptozdan önce hücresel replikasyon işlemi durur DNA onarımı gerçekleşir, eğer bu sırada DNA tamiri gerçekleşemezse hücre apoptoza gider.

In vitro çalışmalarda, apoptoz olayının hızlı bir olay olduğu, apoptotik uyarıdan sonra hücrenin hızla ortamdan uzaklaştığı; yuvarlaklaşırken içeriği bir araya toplanıp, sitoplazmasının büzüldüğü bildirilmiştir. Büzülme kabarma gelişimi esnasında şiddetle gelişen aktivitelere yansır. Protoplazma zardan uzaklaşır, apoptotik cisim oluşur ve tüm bu olaylar birkaç dakika sürer. Apoptotik hücrelerin birlikte fagositozu için ise 12-18 saat gibi daha uzun bir zaman gerekir [115]. Fagositoz sırasında makrofajlar ile apoptoza uğrayan hücrelerin yutulduğu ve komşu hücrelerin apoptoza uğrayan hücrelerin sergilediği fosfolipidlerin gibi moleküler belirteçlerin tanındığı ifade edilmiştir. Son derece düzenli gerçekleşen hücre büzülmesi, tomurcuklanma ve kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu ile apoptozun karakterize edildiği de belirtilmiştir [116].

DNA çözülmesi, kromatin yığılması apoptozun önemli basamaklarıdır, apoptoz işlemi aktive edildikten 1 saat ya da daha uzun bir süre sonra DNA'da tek iplikte bir çentikle başlayan çok karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür. DNA yarıklanması, DNA'yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesini de artırır. endonükleaz enziminin aktivasyonunun muhtemelen Ca/Mg oranının 1 ya da daha fazla oluşuna bağlı olabileceği belirtilmiştir. DNA fragmentasyonunun da apoptoz çalışmalarında DNA laddering, DAPI boyama gibi yöntemlerle de incelendiği belirtilmiştir [117].

Hücredeki kalsiyum iyonlarındaki artış ile aktive olan enzimler hücre iskeletinin yıkılmasında etkilidir. Kaspazlar (Cysteine Aspartate Specific Proteases-CASPASE) da bu enzimlerin en önemlileridir. Bu enzimler apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubudur. Başta inaktif olan proteinler çeşitli yollarla aktive edilirler. Sonrasında hücresel hedeflerdeki tetrapeptid motifleri tanıyıp, mevcut substratı bir karboksil tarafından ayırır. Apoptoz sırasında meydana gelen pek çok şekilsel ve hücresel değişimler, bu enzimlerin görevli olduğu süreçler sonucunda gelişir. Kaspaz aracılı apoptozun aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir; 1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptoz, 2. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptoz ve 3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozdur. Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlandığı ve işlevlerine göre üç gruba ayrıldığı belirtilmiştir; 1. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9, 10), 2. Etkili (Efektör) kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ve 3. Enflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1,4,5, 11, 12, 13 ve 14) [118].

Ekstrinsik yolak, hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptoz tipidir. Tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligand gibi bir ölüm faktörü sırası ile reseptörlerine bağlanır. Fas ligand komşu hücrelerin plazma membranına bağlıdır. Ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman yapısal bir değişiklik meydana gelip, birkaç reseptör bir araya gelerek, oligomerizasyon gerçekleşir. Sonunda hücre dışından gelen moleküllerin bağlanmasıyla Kaspaz 8' i aktive eden sinyaller yayılır (Şekil 8) [119]. Ekstrinsik yolakta kaspaz 8 başlatıcı kaspazdır, reseptör ile apoptotik proteazlar arasındaki ilk bağlantıdır. Aktive olan Kaspaz 8, diğer kaspazları (Kaspaz 3, 6, 7) aktive eder. Sonuç olarak enzim kaskadı spesifik hedef proteinini kırar ve apoptoz meydana gelir. Enzim kaskadının hedeflediği proteinlerin proteolizi, hücre yıkımını oluşturur. Hedef proteinler arasında hücre iskeleti proteinleri; aktin, nukleusun büzülmesine neden olan laminler ve DNA'yı nukleozomlar arasından kırarak DNA ladder oluşturan DNaz mevcuttur. İntrinsik yolak da, mitokondri/ sitokrom c aracılı apoptoz tipidir. DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücre içinden gelen uyarı, apoptozun intrinsik yolağını mitokondrinin dış membranına etki eden Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığıyla indükler. Apoptozun intrinsik yolağı dışarıdan gelen uyarılara (FAS, TNF) duyarlı değildir [120].

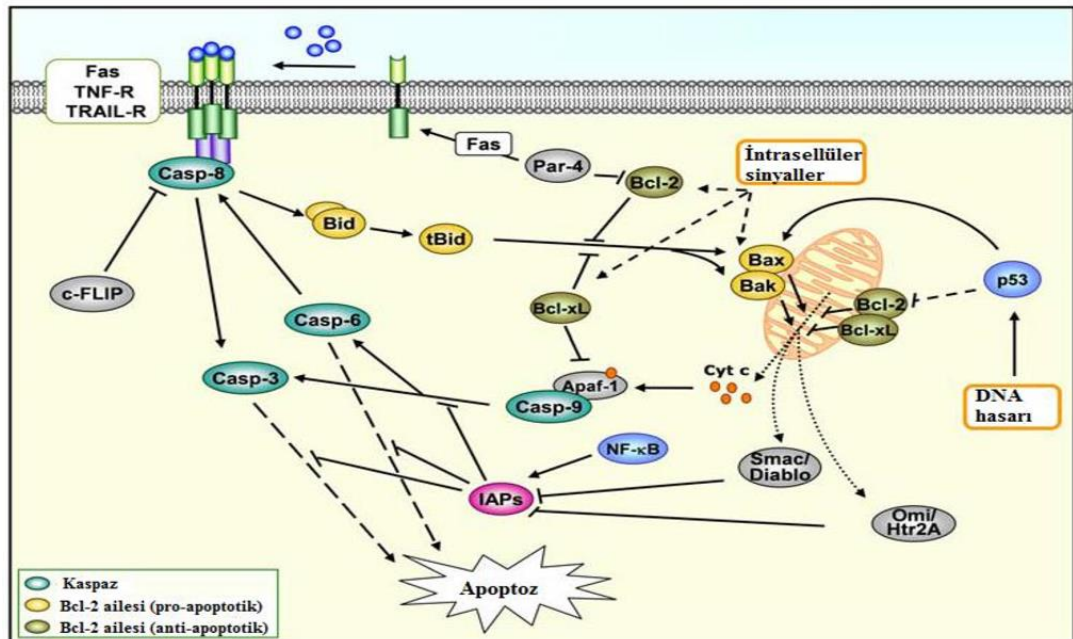
2.5.1 Pro-apoptotik ve Anti-apoptotik Bcl-2 Ailesi Üyeleri

Bcl-2 ailesinin yaklaşık 20 üyesi olduğu ve hepsinin en az bir protein-protein ilişkisine aracılık eden Bcl-2 homoloji (BH) domaini içerdiği belirtilmiştir. Aile üyelerinin çoğu ya üç ya da dört BH domaini paylaşır. Bcl-2 proteinleri alt gruplara ayrılır; bir grup hücreyi apoptoza götüren pro-apoptotik, diğer grup da apoptozu inhibe eden anti-apoptotik gruptur (Tablo 6). Pro-apoptotik moleküllerden oluşan grup içinde BH3 only proteinleri olarak isimlendirilen alt grup vardır. BH3 only proteinleri pro-apoptotik moleküllerin aktivitesini ya indükler (BH3 only aktivatörleri) ya da anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak inhibe eder. Mitokondri dış membranı üzerinde biraraya gelen Bcl-2 ailesinden Bax ve Bak molekülleri, oligomerize olur ve membran üzerinde bir kanal oluşturur. Altı ya da sekiz molekülün oligomerizasyonu, Bax ve Bak proteinlerinin şekilsel değişikliği sonrası insersiyonundan sonra meydana gelir. BH3 only proteinlerinden Bid ve Bim tarafından indüklenir. Mitokondri içinde bulunan Sitokrom c ve Prokaspaz 9'un salınımını sağlar [120].

Tablo 6: Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri.

Pro-apoptotik üyeler	BH3-only pro-apoptotik üyeler	Anti-apoptotik üyeler
Bax	Puma	Bcl-2
Bak	Noxa	Bcl2l10
Bok	Bmf	Bcl-xL
Bfk	Bik	Mcl-1
Bcl-rambo	Bim	Bcl-w
Bcl-G	Bad	Bfl-1
	Bid	Bcl2l12

Prokaspaz 9 ve Sitokrom c sitoplazmaya serbestlenip, apoptozom adlı halkasalkompleksi oluşturur. Bununla birlikte dATP de Apaf-1'e bağlanır. Kofaktör proteini olan Apaf-1 Prokaspaz 9 aktivasyonunda görevlidir. Başlatıcı kaspaz olan Kaspaz 9 intrinsik yolağın anahtarıdır. Kaspaz 9 aktivasyonundan sonra Kaspaz 3, 6 ve 7 aktive olup, apoptoz yolağını aktifleştirir (Şekil 8) [120].

**Şekil 8.**Dış ve iç apoptotik yollar [121]

2.5.2 BAX, BCL-2, KASPAZ 3, KASPAZ 9 ve PARP Yapısı ve Özellikleri

Apoptoz regülasyonunun Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlandığı belirtilmiştir. 20 üyesi olan bu ailede Bax proapoptotik gendir, Bcl-2'de apoptoz inhibitörüdür, antiapoptotiktir[122]. Öncelikle proapoptotik protein olan Bax, apoptotik sinyalin alınmasından sonra mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler[123]. Sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında rol alırken, AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelir[122-124]. Hücrenin yaşamını ya da ölümünü belirleyen önemli bir kapı; mitokondrinin dış membranıdır. Bu membrandaki kanallların açılıp kapanmasında anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler görevlidir. Bazı anti-apoptotik sinyaller dış mitokondriyal membran kanallarını kapalı tutmaya çalışırken bazıları tersine pro-apoptotik ölüm sinyalleri de bu kanalları açmak için çalışır.

Sitozol içine serbest bırakılabilir mitokondriyal moleküllerin arasından en önemlileri sitokrom c ve Smac\DIABLO'dur. Sitokrom c molekülleri, apoptozom oluşturmak üzere Apaf-1 ile bir araya gelir. Apoptozom prokaspaz 9'u etkileyerek aktif kaspaz 9'a çevirir ve pro-kaspaz 3,6, 7'yi sırayla aktive eder. Böylece bunları öldürücü kaspazlar haline getirir. Daha sonra, ürünleri apoptotik hücre fenotipi oluşturan çeşitli "ölüm substratlarına" ayırır. Normal olarak, çok sayıda apoptoz inhibitörleri (IAPs), kaspazlara yapışır ve onları inaktif yapar. Fakat, yine mitokondriden salınan Smac/DIABLO bu IAP'lara zıt çalışarak kaspazları IAP inhibisyonundan korur [125].

Kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonlarının kanser tedavilerinde önemli rol aldığı belirtilmiştir [126][126]. Örneğin, yeni tedavi yöntemi olarak Bcl-2 antisense ilk klinik çalışmalarda non-Hodjkin's lenfoma gibi bazı hastalıkların olumlu sonuç verdiği bulunmuştur. Apoptozda asıl görevli olan sistein proteazlardır [127]. Kaspazlar proteolitik olarak aktif enzimleri parçalar ve normalde hücrede inaktif olan proenzimler olarak sentezlenirler [128] . Özel aspartik asit sistein proteazını kodlayan Ced-3 genine bağlı proteolitik akış apoptozda önemli role sahiptir [129-130] . Bu Ced-3 geninin substratlarından birinin de apoptoz boyunca parçalanan poli ADP riboz polimeraz (PARP) olduğu saptanmıştır [131]. PARP; DNA tamirinde görevlidir, bu enzimin proteolitik yıkımı da DNA onarımını engeller [132]. PARP aynı zamanda Ca/Mg'ye bağlı ve DNA'yı apoptoz boyunca parçalayan endonükleazları inhibe eder. PARP Ced-3 tarafından parçalanır ve apoptozu ortaya çıkaran iki anahtar fonksiyonu inhibe eder [122]. Bu genler membran fosfolipid simetrisindeki azalmasıyla ve plazma membranındaki karbonhidrat kaybıyla aktive olur. Bu yolların ikisi de hücreyi apoptozu götürür.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. MATERYAL

3.1.1 Kullanılan Hücreler Ve Özellikleri

MCF7 Hücre Hattı ve Özellikleri (*MCF7 (ATCC® HTB-22™)*)

MCF7, 1970' de meme kanseri olan 69 yaşında Kafkas bir kadından elde edilmiş ve Michigan Cancer Foundation-7 kısaltması olan (MCF-7) olarak isimlendirilmiştir. MCF-7 hücre hattı insan meme dokusundan ve metastatik bölgelerden elde edilir. Hücre çeşidi olarak sadece epitel hücreleri içerir. Bu hücre hattı transfeksiyon için uyumludur. Sıvı azotta dondurulmuş olarak saklanır. Hücre kültürü şartları %5 CO₂ ve 37⁰ olarak belirlenmiştir [133].

HUC-F Hücre Hattı ve Özellikleri (*Riken:RCB0153*)

HUC-F hücre hattı etnik kökeni Japon olan bir bayanın göbek kordonundan elde edilmiş fibroblast hücreleridir. Morfolojik yapı olarak fibroblastlarla aynı özelliklere sahiptir. Hücre kültürü şartları antibiyotiksiz ortamda 37⁰ ve %5 CO₂ olarak belirlenmiştir[134].

UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B Hücre Hatları ve Özellikleri (The University of TURKU)

Baş ve boyun skuamoz hücreli karsinom (UT-SCC)'un farklı türleri mevcuttur. Çalışmamızda Finlandiya'da Turku Üniversitesinden alınan UT-SCC-74A primer tümör ve UT-SCC-74B boyun metastazı kullanılmıştır. UT-SCC-74A (74A) hücre hattı 31 yaşındaki dilinin sağ marjinde SCC olan G1-G2 evresinde bir erkekte elde edilmiştir (T3N1M0). UT-SCC-74B (74B) hücre hattı ileri safha boyun metastazından elde edilmiştir [80].Hücre kültürü şartları antibiyotikli ortamda 37⁰, DMEM medyum ve %5 CO₂ olarak belirlenmiştir. UT-SCC-74B hücre hattı UT-SCC-74A'nın metastaz halidir. Primer hücre hattı erkek hastanın tümörlü boyun epitel dokusundan hastalığın G1 evresinde elde edilmiştir. Hücre kültürü şartları UT-SCC-74A şartları ile aynıdır.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Hettich Rotina 380R santrifüj (Germany)
Nüve Bench Top santrifüj (Turkey)
Memmert Benmari WNB-14 (Germany)
Shimadzu AUW220D Hassas terazi (Japan)
Herolab UV transluminator (Germany)
Thermo scientific (Pipet Tabancası)
VWR International Vortex (Germany)
Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA)
VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea)
Thermo Scientific OWL EASYCASTTM B2 Jel elektroforez sistemi (USA)
Qiagen RT-PCR cihazı
Techne TC-5000 PCR cihazı (Gradient PCR)(USA)
Schimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan)
Schimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan)
Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA)
Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK)
Consort EV265 elektroforez güçkaynağı (Belgium)
Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı
Mikrodalga fırını SAMSUNG MV71E (Korea)
VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı(Korea)
Leica DM IL LED Mikroskop
Thermo BioSafety Cabinet Class II (Steril Hücre Kültürü Kabini)
Sanyo CO2 inkübatörü
Roche xCELLigence (Canlı hücre proliferasyon analiz cihazı)
BioRad Cell Counter (Hücre Sayım Cihazı)
Sanyo -80oC buzdolabı
Nüve Steamart (Katı ve sıvı otoklav)
Thermo Varioskan (Florasın Okuyucu)
Mini and Midi Format Electrophoresis Systems (Bio-Rad) (Running)
The Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) (Transfer)
The ChemiDoc MP system(Bio-Rad) (Görüntü)

3.1.3 Hücre Kültürü Donanımları

12 kuyucuklu petri, 6 kuyucuklu petri, 25cm² hücre büyütme kapları,75cm² hücre büyütme kapları ,MCF-7 hücre hattı, HUC-F hücre hattı, UT-SCC-74A hücre hattı, UT-SCC-74B hücre hattı, Fetal Bovine Serum, Tripsin-EDTA, Kriyovial tüp, Penisilin/Streptomisin, L-Glutamin, DMEM, Penisilin, Steril pipetler (5, 10ml) , Şırınga filtreleri (0.22 µm),

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Hücre Kültürü

Çalışmada ticari olarak temin edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattı, fibroblast hücre hattı ve Turku Üniversitesi'nden üniversitemize gelen 74A ve 74B baş ve boyun kanseri hücre hatları kullanıldı.

Hücrelerin kültür edilmesi süresince DMEM/High Glucose medyumunu kullanıldı. % 5 CO₂ içeren nemli 37°C'lik etüvde büyütüldü. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan hücre hatlarının medyumları şu şekilde hazırlandı; 500 mL DMEM/High Glukoz (HY-SH30243.01) medyumun içerisine, 50 mL FBS (Wisent- 080110 veya HY- CH30160.02), 5mL penisilin /streptomysin(HY-SV30010), 4 mL L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL) ve 0,5mL Plasmocin (ant-mpt (Invitrogen) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Çalışma hücre kültürü çalışma kuralları göz önünde bulundurularak, titizlik içerisinde sürdürüldü. Her çalışmadan yarım saat önce kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin, çalışma öncesinde % 70'lik alkol ile temizlendi. Önce ateş yakıldı, daha sonra havalandırma açıldı.

3.2.1.1 Hücre ekim işlemleri

1. Hücreler çalışma boyunca 37°C inkübe edildiğinden çalışmada kullanılacak solüsyonlarında ısısının aynı olması gerektiğinden solüsyonlar her zaman çalışma öncesinde 37°C'de ısıtıldı
2. -196 °C'de sıvı azotta saklanan stok hücreler, buradan alınarak 37 °C'deki ısıtıcıda eriyene kadar bekletildi.
3. Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, titiz bir şekilde açıldı.
4. 3 ml medyum konan falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler aktarıldı.
5. 25 °C'de 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
6. Santrifüj ardından süpernatant atıldı.
7. Hücrelerin üzerine pelletin yoğunluğuna göre gerekli miktarda medyum konulup, ekim yapılacak flaskın boyutuna göre hücrelerin üzerine medyum eklendi (Örneğin;75'lik flask için 10 mL olacak şekilde).
8. Pipetaj yapılarak hücreler çözüldü ve medyum bulunan flask içerisine hücreler eklendi,flaska yayılacak şekilde sallandı ve 37°C % 5 CO₂'lik etüve konuldu.

3.2.1.2 Medyum Değişimi (75'lik flask için)

1. Medyum 37 °C'de ısıtıldı.
2. 75'lik flastaki medyum uzaklaştırıldı.
3. 10 mL medyum eklendi ve etüve kaldırıldı.
4. Medyum hücre tipi ve yoğunluğuna göre sürekli kontrol edilip gerektiğçe değiştirildi. Bu süreçte pasaj gerektiğinde hücreler pasajlandı.

3.2.1.3 Harvest İşlemi (75'lik flask için)

1. Flasktaki medyum boşaltıldı.
2. Flaska 4 ml 1xPBS ilave edilerek varsa ölü hücreler uzaklaştırıldı ve böylece flaskta tutunan canlı hücreler kaldı.
3. 3 mL tripsin-EDTA (HY-SV30031.01) eklenip, etüve konuldu, hücrelerin kalkması sağlandı (Trypsin-EDTA 37°C'de aktivite olan bir kimyasaldır, bundan dolayı 37°C'de inkübe edildi).
4. 3 mL medyum eklenip, pipetaj yapılarak falkon tüpe aktarıldı.
5. 25 °C'de 1100 rpm'da 3 dk. santrifüj yapıldı.
6. Süpernatant atıldı ve medyum eklendi, tekrar santrifüj edildi.
7. Medyumun tamamı hücrelere zarar vermeden dikkatlice çekildi.
8. Medyumda hücreler çözülüp eşit bir şekilde hücre kültür tabaklarına (well=kuyucuk) tekrar ekildi. Bu ekim sırasında kullanılacak well-platelerin boyutları önemlidir. Her plate için uygun sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi.

3.2.1.4 Hücre sayımı

1. Flasktan yukarıda belirtildiği gibi kaldırılan hücreler medyumda çözündürülüp karışım homojenize edildi, hücre sayımı için; 10 µl Tryphan Blue, 10 µl hücre örneği ile karıştırıldı.
2. Bu karışımdan 10 µl alınıp, Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter cihazının slaytına eklenip, bu cihazda hücre sayımı yapıldı (Şekil 9).
3. Konsantrasyon (hücre/ml) =canlı hücre sayısı ve canlılık oranı belirlenir. Ekim yapılacak plate'e uygun hesap yapıp, ekim gerçekleştirildi (Şekil 10).
4. 16 well plate için her welle belirlenen hücre sayısında hücre ekildi. Bu hücre sayısı hücre hattından hücre hattına değişiklik göstermektedir. Bundan dolayı öncelikle bu kuyucuklara farklı sayılarda hücre ekildi, ardından uygun hücre sayısı belirlendi (Şekil 11). Diğer deney aşamalarında da kuyucuklara buna uygun hücre sayısında ekim yapıldı. RNA izolasyonu için 12'lik well platelere ekim yapılırken, protein izolasyonu için 6'lık well plate kullanıldığından bu platelere de hücre tipine uygun sayıda hücre ekildi.



Şekil 9. Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter'da hücre sayım aşamaları



Örnek hesaplama:

1 ml 1.10×10^7

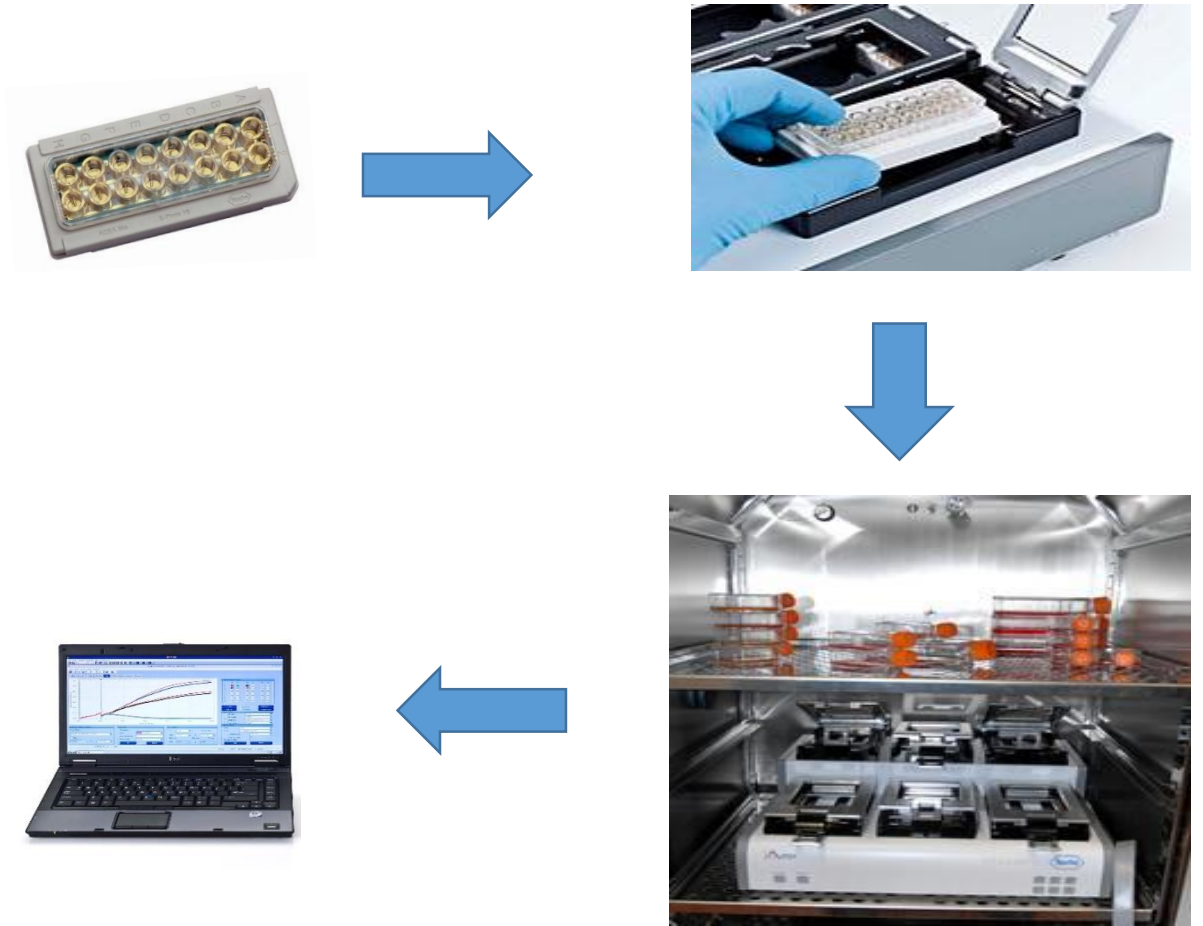
? 12×10^5

?=0,109ml hücre karışımından alınacak, üzerine medyum ile tamamlanacak. (12×10^5 =kuyu başı 5000 hücre x 24 kuyu, xCELLigence plateleri için)

Şekil 10. Hücre sayımı ardından hesaplanması

3.2.1.5 xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

1. xCELLigence özel platelerine DMEM'den 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutuldu.
2. Pasajdan elde edilen hücreler hücre sayımı yapıldıktan sonra xCELLigence özel platelerine hücre tipine özgün olarak belirlenen sayıda ekilir.
3. Ekim ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu plateler bekletildi.
4. Cihaza plateler yerleştirilir ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı. (Şekil 11).



Şekil 11. xCELLigence plate'ine ekim ve cihaza örneklerin yerleştirilmesi

3.2.2 *Myrtus communis* (Mersin Otu) Muamelesi

Ticari olarak satın alınan mersin otu ekstraktı DMEM+DMSO içerisinde çözülerek son konsantrasyon 4000 µg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7. Solüsyonların hazırlanması:

25µl DMSO + 25 ml DMEM = %0,1'lik DMSO çözeltisi	
20 mg bitki ekstraktı + 5 ml %0,1'lik DMSO = A =4000 µg/ml	→stok solüsyonu
1 ml A + 1ml %0,1'lik DMSO = B = 2000 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 2000 µg/ml
1 ml B + 1 ml %0,1'lik DMSO = C = 1000 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 1000 µg/ml
1 ml C + 1 ml %0,1'lik DMSO = D = 500 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 500 µg/ml
1 ml D + 1 ml %0,1'lik DMSO = E = 250 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 250 µg/ml
1 ml E + 1 ml %0,1'lik DMSO = F = 125 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 125 µg/ml
1 ml F + 1 ml %0,1'lik DMSO = G = 62,5 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 62,5 µg/ml
1 ml G + 1 ml %0,1'lik DMSO = H = 32 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 31 µg/ml
1 ml H + 1 ml %0,1'lik DMSO = I = 16 µg/ml	Final Konsantrasyonu = 16 µg/ml
1 ml I + 1 ml %0,1'lik DMSO = J = 8µg/ml	Final Konsantrasyonu = 8 µg/ml

Bu dozlar xCELLigence platelere 3'er tekrarlı uygulandı. Hücrelere proliferasyon analizi yapıldı.

3.2.3 Hücre Titrasyon Testi (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi)

1. Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı. Hücre sayımı gerçekleştirildi.
2. xCELLigence özel platelerine DMEM'den 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutuldu.
3. 16 well-plate xCELLigence plate'lerine üçer tekrarlı 10.000,7500,5.000 ve 2.500 sayısında hücreler ekildi.
4. Ekim ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu plateler bekletildi.

5. Cihaza plateler yerleştirilir ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı. (Şekil 11).
6. Ekim ardından hücrelerin proliferasyonlarındaki farklılıklar, zamana ve sayısına bağlı bu platelere ekim için en uygun sayı belirlendi.

3.2.4 Hücre Sitotoksosite Testi (xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi)

1. Hücreye harvest işlemindeki ilk basamaklar uygulanarak hücreler kaldırıldı. Hücre sayımı gerçekleştirildi.
2. xCELLigence özel platelerine DMEM'den 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutuldu.
3. Cell titration deneyi sonucunda belirlenen hücre sayısı 16'lık well platelere ekildi.
4. Cihaza plateler yerleştirilir ve cihaz program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.
5. 24 saat sonrasında yukarıda belirtilen dozlarda mersin otu ekstraktı üçer tekrarlı uygulandı.
6. İlerleyen saatlerde hücrelerin çoğalma eğrileri takip edildi. Etkili doz belirlenip IC₅₀ değeri tespit edildi.

3.2.5 mRNA İfadesinin Belirlenmesi

3.2.5.1 TRİZOL ile hücreden RNA izolasyonu

Her hücre hattı için xCELLigence kullanılarak dozlar belirlendikten sonra hücreler 12'lik wellere her doz için üçer tekrarlı ekildi, inkubatörde inkübe edildi. 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktı uygulandı ve tekrar 24 saat sonra aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyondan önce invert mikroskopuyla hücrelerin fotoğrafları çekildi. Mersin otu ekstraktı uygulanan hücrelerin şekilleriyle kontrol grupları kıyaslandı. Hücrelerin şekillerinde değişiklikler gözlemlendi.

1. 12'lik wellerdeki medyum boşaltıldı
2. Soğuk 1XPBS'le (1 mL) iki kez yıkandı.
3. Her bir kuyucuğa 400 µl TRİZOL (Invitrogen, Cat. No.15596-026) ilave edildi ve kuyucuklar iyice yıkandı, pipet ucuyla da iyice kazındı.
4. Her kuyucuktaki hücreler 1.5 mL'lik ependorf tüplere alındı.
5. 100 µL kloroform(Merck, 102431) eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı.
6. 12.000 x rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrasında üç faz oluşur, üstteki şeffaf kısım (süpernatant) yeni ependorf tüpe aktarıldı.
8. 500 µL 2-propanol (Merck, cat. No.100995) eklenip, sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 9.12.000 x rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
10. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. % 75'lik etanolden (Merck, cat. No. 100993) 1000 µL eklendi ve hafifçe sallandı.
11. 12.000 x rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
12. Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi.
13. 40 µL PCR-grade DEPC (Invitrogen, 46-2224) su eklenerek RNA pipetejla çözüldürüldü.
- 14.RNA'lar nanodropta ölçüldü, konsantrasyonları ve OD değerleri belirlendi.
15. RNA diğer deneyler kullanılmak üzere -80° C'de saklandı.

3.2.5.2 cDNA Protokolü

- Tüm RNA'lar sabit bir sayıya eşitlendi. (RNA konsantrasyonuna göre 1 veya 2 µg gibi)
- Hesaplama işlemi şöyle yapılır;

Örneğin izole ettiğimiz RNA değeri $X=274,2$ ng/µl olsun. Bunu 1 µg'ya eşitlemek istiyorsak;

$$274,2 \text{ ng} = 0,274 \text{ µg}$$

(0,274'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$0,274 \times 3,65 \approx 1,0001 \text{ µg}$$

$$3,65 \text{ µl} = \text{alınacak RNA miktarı}$$

- Hesaplamaları yaptıktan sonra çalışmaya geçilir.

(NOT: RNA ve kitin içinde bulunan malzemeler her zaman buzda bekletilmelidir.)

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartıldı.
2. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu.
3. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2µl ise 11µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9µl su tüplere konur).
4. Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

➤ Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (örnek sayısıyla çarpılarak mix hazırlanır).

- | | |
|---|-----|
| • 5X Reaction Buffer | 4µl |
| • Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl) | 1µl |
| • 10mM DNTP Mix | 2µl |
| • RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/µl) | 1µl |
| • Oligo(dT) ₁₈ primer | 1µl |

5. Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 9 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Toplam hacim 20 µl olacak (11 önceden vardı 9 µl mix ekledik toplam 20 µl oldu).

6. 42 °C 60 dk inkübasyona bırakıldı, Sonra 70°C de 5 dk bekletildi. Spin atırıldı.

7. Elde edilen cDNA'lar -70°C de saklandı.

3.2.5.3 BETA AKTİN, BAX, BCL-2 Primerlerin hazırlanması

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/mL'lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 µL alınarak 80 µL 1×TE tamponu eklendi.

Kullanılan primerlerin sekansı şu şekildedir:

BAX PRİMERİ:

Hrs:5'GTCCAATGTCCAGCCCATGA3'

Hras:5'AGCTGAGCGAGTGTCTCAAG3'

BCL-2 PRİMERİ:

Hrs:5'GGTGAAGTGGGGGAGGATTG3'

Hras:5'GGCAGGCATGTTGACTTCAC

BETA AKTİN PRİMERİ:

Hrs:5'TTCCTGGGCATGGAGTCCT3'

Hras:5'AGGAGGAGCAATGATCTTGATC3'

3.2.5.4 Gradyent PCR

Real-time PCR 'da kullanılacak olan primerlerimizin çalışma sıcaklığını bulmak için aşağıdaki solüsyonlar ve program kullanılarak gradyent PCR yapıldı.

SOLÜSYONLAR	MİKTAR
NH4 BUFFER	2,5 μ L
MgCl	2,5 μ L
dNTP	0,5 μ L
PRİMER(REVERSE)	0,5 μ L
PRİMER(FORWARD)	0,5 μ L
TAQ POLİMERAZ	0,2 μ L
NUCLEASE FREE WATER	16,3 μ L

Gradyent pcr yapmak için belirlenen β -AKTIN, BAX, BCL-2genleri için belirlenen program koşulları şu şekildedir:

INITIAL DENATURATION	95°C	5dk	1cycle
DENATURATION	95°C	30sn	32 cycle
ANNEILING	53-67°C	30sn	
EXTENSION	72°C	1dk	
FINAL EXTENSION	72°C	5dk	1cycle

BAX,BCL-2 VE Beta-aktin için uygun sıcaklık 58°C olarak belirlendi.

3.2.5.5 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü.

1. 100mL 1xTAE (Tris/Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu.
2. Mikrodalga fırında homojen olana kadar tutuldu.
3. 1.8 µL ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı.
4. PCR ürünlerinden 5µL alınarak 1µL 6xLoading dye(Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.
5. Jel, 110 V'de yaklaşık 15-20 dk. yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntülendi.

3.2.5.6 Jel Ekstraksiyonu

Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. No 28704) ile yapıldı.

1. Jel ekstraksiyonu yapılacak PCR ürünleri (20µL) yeni hazırlanmış taze kalın taraklı jele yüklendi.
2. Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütüldü.
3. Karanlık odada bantlara bakılıp, hangisinin alınacağına karar verildi.
4. DNA bantları bant kesici (extractor) ile dikkatlice alındı.
5. Kesilen jel parçası tartılıp ependorf tüpe aktarıldı.
6. Örneğin; 1 Jel 40 mg = 40µL hesabına göre kaç kuyucuk kesildi ise 2 ya da 3 oranda 2x40, 3x40 düşünüldü.
7. 40xörnek sayısı kadar QG tamponu eklendi (QIAGEN).
8. 50 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
9. Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapıldı. (Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı, eğer turuncu ya da mor renk oluşursa renk sarı olana kadar 10µL 3M sodyum asetat eklenir.)
10. Süpernatant mor kapaklı spin kolona aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
11. Altındaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı.
12. İçindeki alkolün tamamen uzaklaşması için boş olarak tekrar santrifüj yapıldı.

13. Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtuldu. Toplama tüpleri atıldı.
14. 30µL EB buffer (QIAGEN) eklendi. 4dk. oda sıcaklığında bekletildi.
15. 13.000 rpm'de 1dk. santrifüjlendi. DNA değeri spektrofotometrede okutuldu.

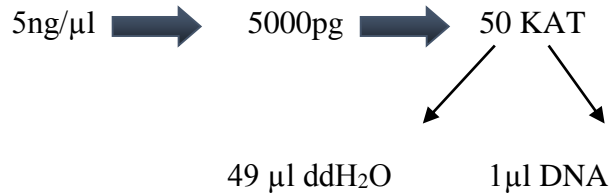
3.2.5.7 Real-time PCR için Standartların Hazırlanması

Jel ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan standart hazırlanır.

Primere ait jel ekstraksiyonu yaptıktan sonra spektrofotometrede konsantrasyon ve kalite ölçümü yapıldı.

ÖRNEK:

BETA-AKTİN geninin jel ekstraksiyon sonucu:



Şeklinde hesaplama ile sulandırma katsayısı bulundu. Sonrasında 1:10 miktarında seri dilüsyon yapıldı. Standartlar birinci standart hazırlandıktan sonra dilüe edilerek sırayla hazırlandı.

3.2.5.8 Real-time PCR

Real-time PCR'da kullanılan sybr green ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlık olmalı, metal bloklarda ve aşağıdaki miktarlarda (bir örnek için) çalışılmalıdır.

BİLEŞENLER	MİKTAR
FORWARD PRİMER	0,5 µl
REVERSE PRİMER	0,5 µl
SYBR GREEN MASTER MİX	12,5µl
NÜKLEAZ-FREE SU	9 µl
cDNA	2,5 µl
TOPLAM	25 µl

Real Time PCR'da cihaza çalışılan gene göre program girildi.

Denatürasyon için 15' 94 °C,

Annealing 30' (her gen için normal PCR'daki çalışma sıcaklığının 2°C altı seçildi).

Extention 30' 72 °C, cycle çalışmaya göre 45 seçildi.

Aynı şekilde housekeeping gen olan β-aktin ile normalize edildi.

Analizde okunan β-AKTIN, BAX, BCL-2 değerleri excel programında yerleştirilip oranlamaları, ortalama değerleri hesaplanıp varsa ekspresyon değişimine bakıldı.

3.2.6 Protein İfadesinin Belirlenmesi

3.2.6.1 Protein İzolasyonu

1. Flasklarda yeterli yoğunluğa ulaşmış hücreler gereken protokol ile flasktan kaldırıldı ve hücre ayımı yapıldı.
2. Toplam protein izolasyonu için kuyu başına belirlenen sayıda hücre hücre tipine göre 6 kuyucuklu well-platelere ekildi.
3. 24 saat ardından mersin otu ekstraktı belirli 4 dozda uygulandı. 24 saat daha inkübe edildikten sonra izolasyonu yapıldı.
4. Hücreler üzerine 1X PBS eklendi. PBS'le yıkayıp, kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden kaldırıldı.
5. Soğuk santrifüjleme işlemiyle +4°C'de 4000 rpm'de 5' santrifüj edildi.
6. Hücre pelleti elde edildi. Toplam protein içeriği eldesi için hücre özütleme tamponu içerisine alınan hücreler 2.5 dakika boyunca sonikasyon işlemi gerçekleştirildi.
7. 15 dakika 13200 rpm'de +4°C'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alındı ve 20°C'de saklandı.

3.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

1. Protein miktar analizi Bradford yöntemi kullanıldı (Bio-Rad).
2. Proteinler Coomassie brilliant blue G-250 ye bağlandı ve tayini bu sayede yapıldı. Normalde protone halde kırmızı/kahverengi renkte olan boya proteinle bağlanınca mavi renkte görüldü. Bu değişim Varioskan Flash'da 595 nm'de absorbans ölçülerek belirlendi (Thermo Electron North Ame).
3. BSA (Bovine Serum Albumin) 1,5 µg- 7,5 µg aralığında alınarak standartlar oluşturuldu.
4. Daha sonra örneklerde 2 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve üzerlerine 100 µl Bradford solüsyonu eklenip karanlıkta 5 dakika beklendikten sonra 595 nm de ölçüm yapıldı.

3.2.6.3 SDS-PAGE jel hazırlanması

SDS-Page (sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforez) proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek için kullanılmaktadır. Poliakrilamid jellerle yapılan elektroforez, hem moleküler ayırım hem de elektroforetik harekete dayalı olduğundan örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar.

3.2.6.4 Protein Örneklerin Hazırlanması

1. İzole edilen proteinlerin jele yükleneceği miktarı immunoblotlama yöntemi için Bradford sonuçlarına göre standart eğriye bağlı olarak tespit edildi.
2. Ardından 1:3 oranında yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°C’ de 5 dakika tutuldu ve buza alındı.

3.2.6.5 SDS-PAGE Jelin Yürümesi ve PVDF Membrana Transfer

1. Örnekler protein belirteçler ile birlikte 100 V’da 5’, 240 V’da 20’ saat SDS içeren yürütme tamponunda yürütüldü.
2. Jel üzerinde olan protein örnekleri PVDF membrana transfer edildikten sonra (% 15 Metanol içeren 1X Transfer Tamponu), yağsız süt tozu ile 30’ oda sıcaklığında çalkalandı. (100 ml %0,001 Tween-20 içeren Tris Tuz Solüsyonu için 5g süt tozu).

3.2.6.6 İmmunoblotlama İçin Birincil ve İkincil Antikorların Girilmesi ve Sonucun Filme Fiksasyon İşlemi

1. Uygun birincil antikorla (protokolde belirlenen oranda (1:1000 oranı gibi) antikor: % 5 süt solüsyonu) gece boyu +4°C inkübe edildi.
2. 5’er dakikalık üç kez TBS-T ile yıkama sonrasında uygun ikincil antikorla (1:4000; antikor: % 5 süt solüsyonu) oda sıcaklığında 30’ inkübe edildi.
3. Daha sonra uygulamaların ardından 5’er dakikalık aralıklarla TBS-T ile üç kez yıkandı.
4. Kemiluminesans madde ile 1 dakika boyunca muamele edildiler. Daha sonra streç filme sarılan membranlar,
5. Sonuçlar β -aktin yükleme kontrolü ile karşılaştırılarak tartışıldı.

Çalışmada kullanılan antibodyler şu şekildedir;

Kaspaz-3 (8G10) Rabbit mAb #9665, PARP Antibody #9542, Kaspaz 9 (C9) Mouse mAb #9508, β -Actin (N-21): sc-130656, Bax (D2E11) Rabbit mAb #5023, Bcl-2 Antibody #2876

3.2.7 İstatistiksel Analiz

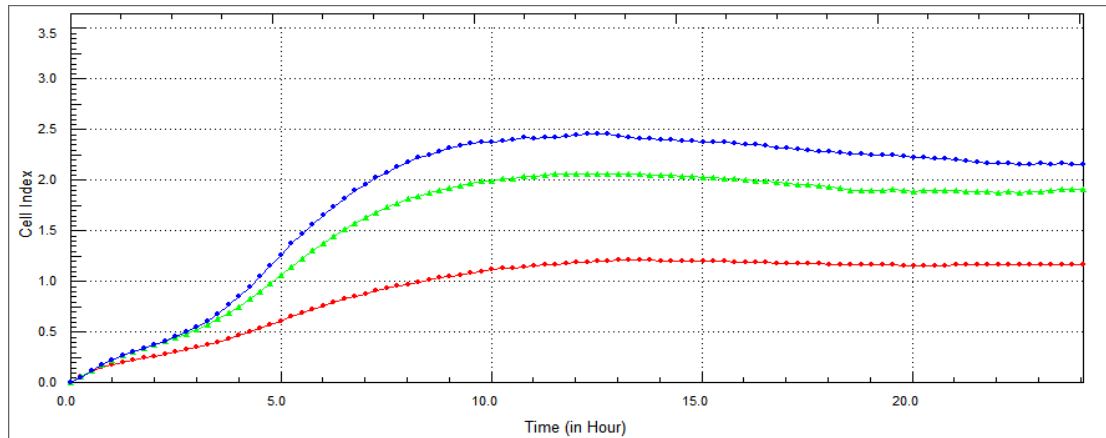
Çalışmanın xCELLigence ve RT-PCR sonuçları SPSS 18.0 programı kullanılarak analiz edildi. Unpaired 1-tailed T test uygulandı. xCELLigence analizi için IC₅₀ değerinin gösterdiği uygun dozun, t testine göre de anlamlı aralıktan seçilip seçilmediği kontrol edildi. T testi sonucunda seçilen doz aralığı p<0.05 değerinin altında çıkması, belirlenen dozun uygunluğunun istatistiki kontrolü olarak kullanıldı. MCF-7, UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücre hattı için de aynı kontrol yapıldı. Datalar kontrol ve doz uygulanan grupların üçer tekrarları kıyaslanarak hesaplandı. RT-PCR'da her üç hattı için BAX ve BCL-2 geninde analiz edilirken SPSS 18.0 programı kullanılarak analiz edildi. Paired 1-tailed T uygulandı. Belirlenen dört farklı dozda p değeri 0.05'den küçük çıktığından anlamlı sonuç elde edildi.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B HÜCRELERİNİN TİTRASYON GRAFİKLERİ

xCELLigence cihazı çalışmamızda mersin otu ekstraktının meme kanseri ve baş-noyun kanseri hücre hatlarındaki etkisinin belirlenmesinde, IC50 değerinin tespit edilmesinde kullanılmıştır. Bu çalışmaya geçmeden önce bu cihazdaki 16 kuyulu E-Plaka'lar için en uygun hücre konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu plakalara farklı sayılarda hücreler ekilmiştir. Çok fazla sayıda ekilen hücreler kısa zamanda çoğalıp plakada çoğalmak için yer bulamayacağından, az ekilenin de yetersiz geleceğinden en uygun sayıdaki hücre sayısının bulunması hedeflemiştir. Zamanla sürekli hücre sayısının artmadığı plato faza ulaşıldıktan sonra proliferasyonun sabit kaldığı, cell index'deki değerin en az 1'e ulaştığı değer belirlenmiştir. Cell index 1'in altında ise kullanılamamaktadır, hücre sayısı çok az gelmektedir. Bu sayının üzerindeki değerler de kendi aralarında değerlendirilip her hücre hattı için en uygun sayı belirlenmiştir.

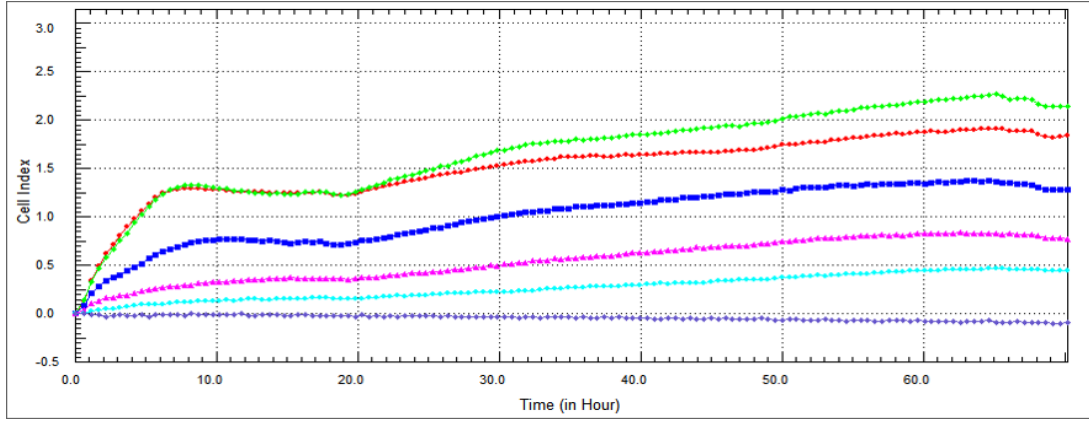
4.1.1 HUC-F hücrelerinin titrasyon grafiği



Şekil 12. HUC-F hücre hattında titrasyon grafiği. Bu grafik de lacivert: 20 000, yeşil: 10 000, kırmızı: 5 000 hücreyi göstermektedir.

Yapılan titrasyon deneyinden sonra HUC-F hücre hattı için en uygun değerin 10.000 olduğu tespit edilmiştir.

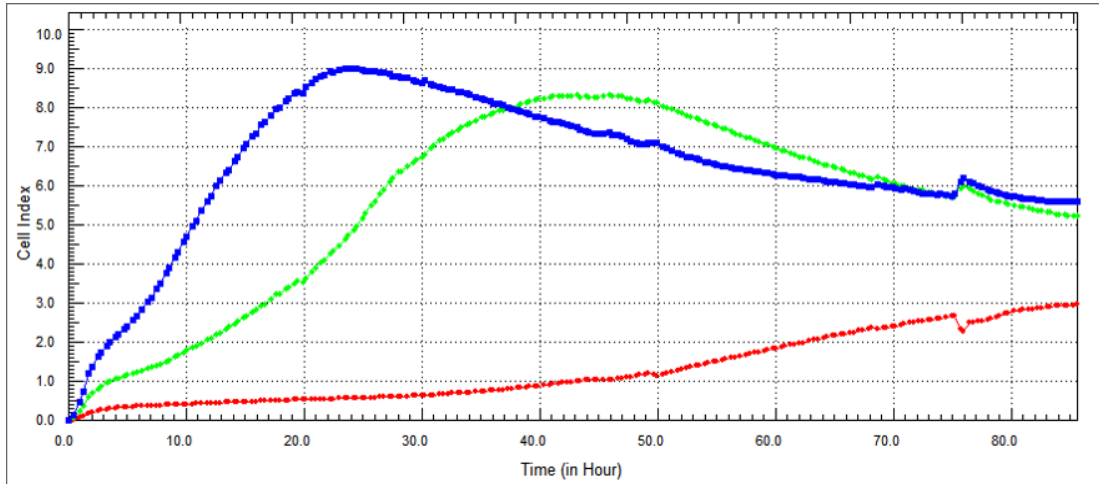
4.1.2 MCF-7 hücrelerinin titrasyon grafiği



Şekil 13. MCF-7 hücre hattında titrasyon grafiği. Bu grafik de yeşil: 20 000, kırmızı: 15 000, lacivert: 10 000, pembe: 5 000, turkuaz: 2 500, mor: sadece dmehücreyi göstermektedir.

MCF-7 hücre hattı için titrasyon deneyinden sonra en uygun hücre sayısının 5000 olduğu belirlenmiştir. Bu sayının üzerindeki hücrelerde ani artış olması, altındaki hücre sayılarında da yapılacak deney için hücre sayısının yetersiz kalacağı gözlemlenmiştir.

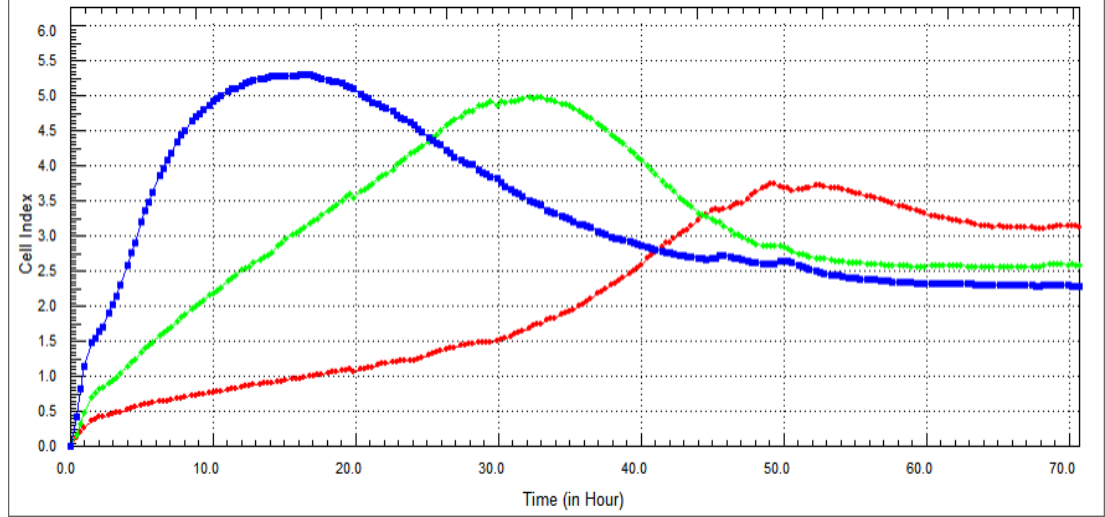
4.1.3 UT-SCC-74A hücrelerinin titrasyon grafiği



Şekil 14. UT-SCC-74A hücre hattında titrasyon grafiği. Bu grafik de lacivert: 20 000, yeşil: 10 000, kırmızı: 5 000 hücreyi göstermektedir.

UT-SCC-74A hücre hattında uygun hücre sayısı olarak 10 000 tespit edilmiştir.

4.1.4 UT-SCC-74B hücrelerinin titrasyon grafiği



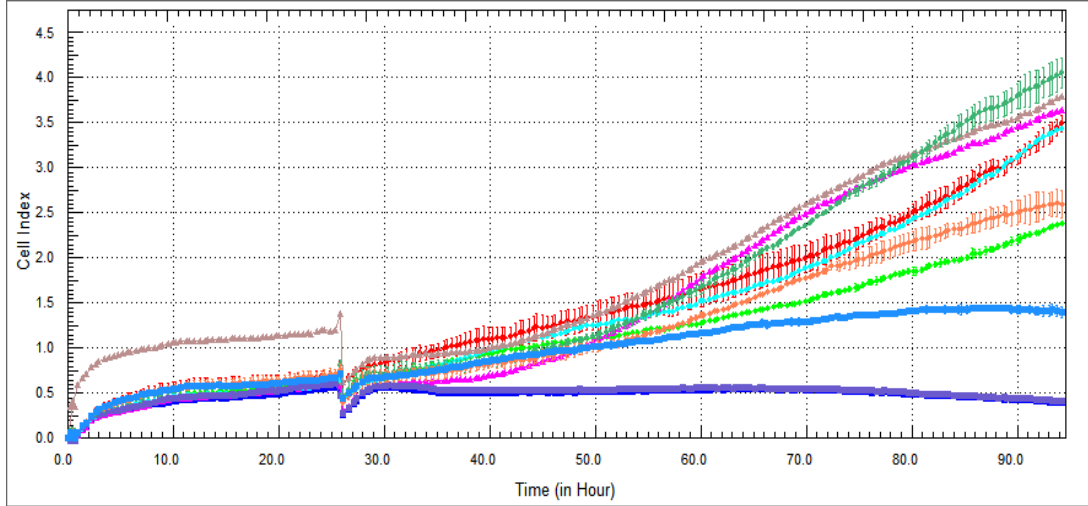
Şekil 15. UT-SCC-74B hücre hattında titrasyon grafiği. Bu grafik de lacivert: 20 000, yeşil: 10 000, kırmızı: 5 000 hücreyi göstermektedir.

UT-SCC-74B hücre hattında da 10 000 ekilecek hücrenin bu deney için uygun olacağı belirlenmiştir.

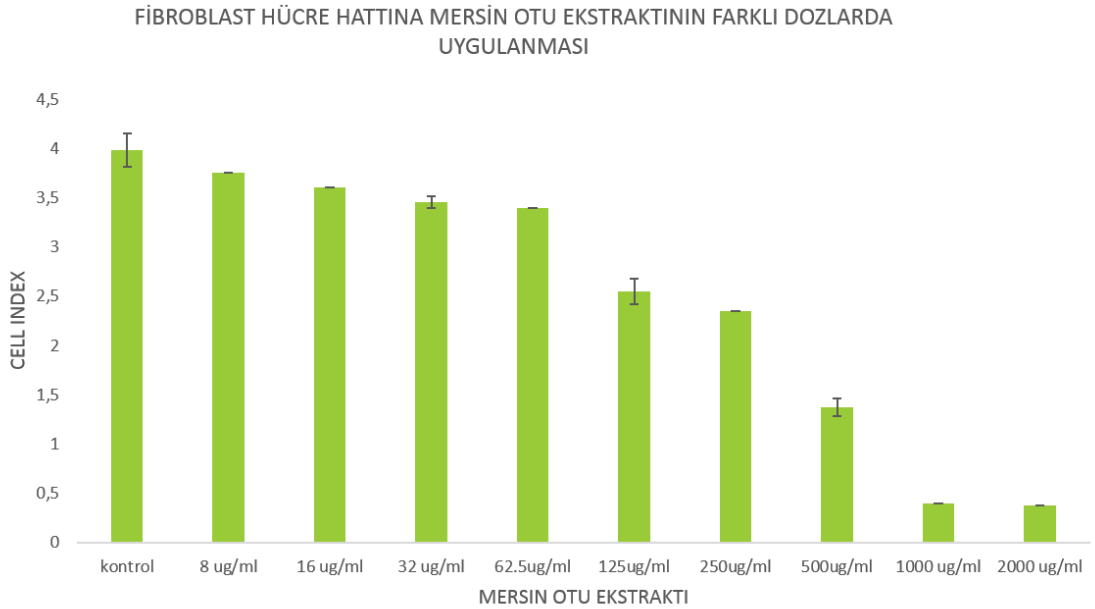
4.2 HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRE PROLİFERAYONU ÜZERİNDE MERSİN OTU EKSTRAKTININ ETKİSİ

Çalışmada kullanılan hücre hatlarına mersin otu ekstraktı farklı dozlarda üçer tekrarlı uygulanmıştır. xCELLigence cihazı kullanılan bu aşamada hücreler için IC50 (Hücre büyümesinin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon) değerinin bulunması hedeflenmiştir. Cihazın 16 kuyulu E-Plaka'larına hücreler belirlenen sayılarda ekilmiş, 24 saat ardında farklı dozlardaki mersin otu ekstraktı uygulanmıştır. Hücrelerdeki değişim kontrol grubuna göre kıyaslanarak her hücre hattı için IC₅₀ değeri tespit edilmiştir.

4.2.1 HUC-F hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi



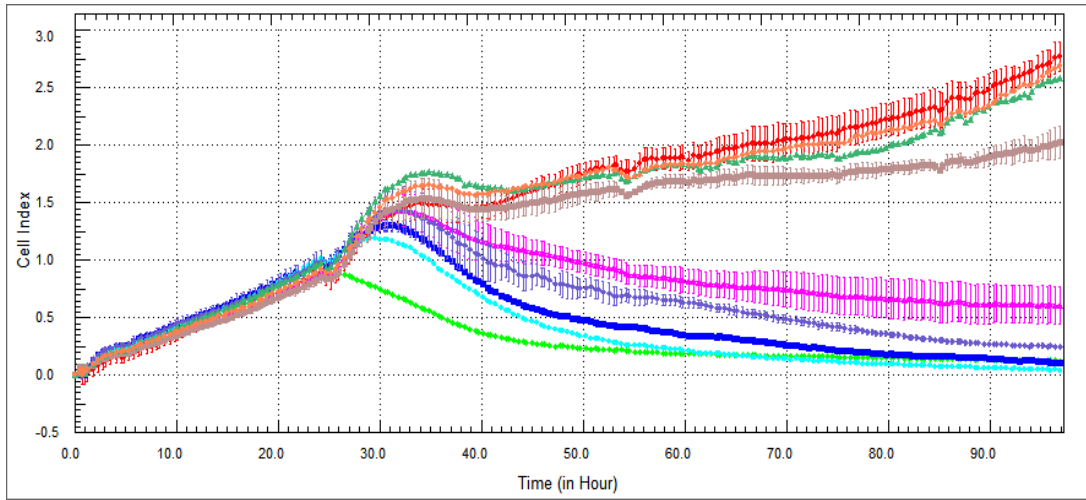
Şekil 16. HUC-F hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması. Grafikte her renk farklı dozda mersin otu ekstraktını ifade eder. Koyu yeşil: kontrol, Açık pembe: 8 µg/ml, Pembe: 16 µg/ml, Kırmızı: 32 µg/ml, Turkuaz: 62.5 µg/ml, Turuncu: 125 µg/ml, Açık yeşil: 250 µg/ml, Mavi: 500 µg/ml, Lila: 1000 µg/ml, Lacivert: 2 000 µg/ml.



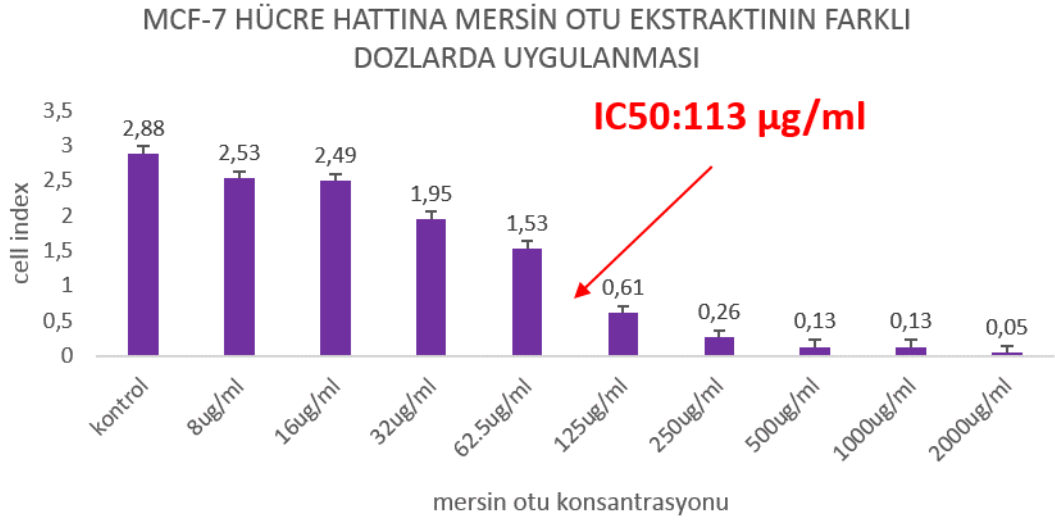
Şekil 17 . HUC-F hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi.

HUC-F hücre hattı bu çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan fibroblast hücreleridir. Bu hücre hattında mersin otu ekstraktının değişimi izlenmiş, farklı konsantrasyonların etkisi belirlenmiştir. Yüksek dozların kontrol grubu olan bu hücre hattında hücreleri ölüme götürdüğü gözlemlenirken diğer hücre hatları için tespit edilen IC₅₀değerindeki dozların bu hücre hattında hücreleri büyük bir oranda ölüme götürmediği gözlemlenmiştir. Bu da sitotoksik etkisinin fibroblast hücre hattında az olduğunu göstermiştir. Yalnız yüksek dozların bu hücre hattını da ölüme götürdüğü azalan cell index değerlerinden gözlemlenmiştir.

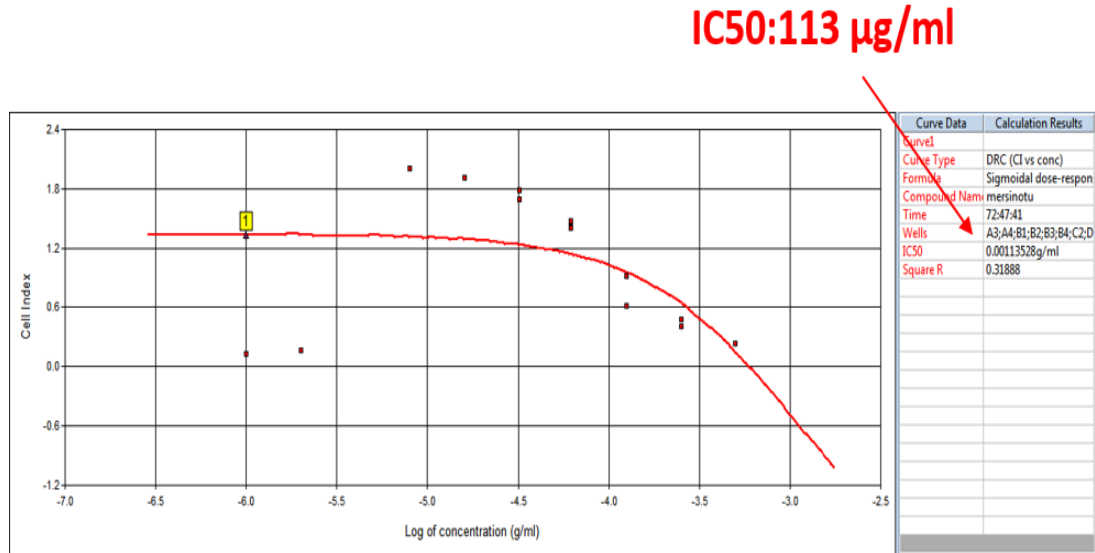
4.2.2 MCF-7 hücresinde mersin otu ekstraktının etkisi



Şekil 18 . MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması. Grafikte her renk farklı dozda mersin otu ekstraktını ifade eder. Kırmızı: kontrol, Mavi: 8 µg/ml, Turuncu: 16 µg/ml, Koyu yeşil: 32 µg/ml, Açık pembe: 62.5 µg/ml, Pembe: 125 µg/ml, Mor: 250 µg/ml, Lacivert: 500 µg/ml, Turkuaz: 1000 µg/ml, Açık yeşil: 2 000 µg/ml.



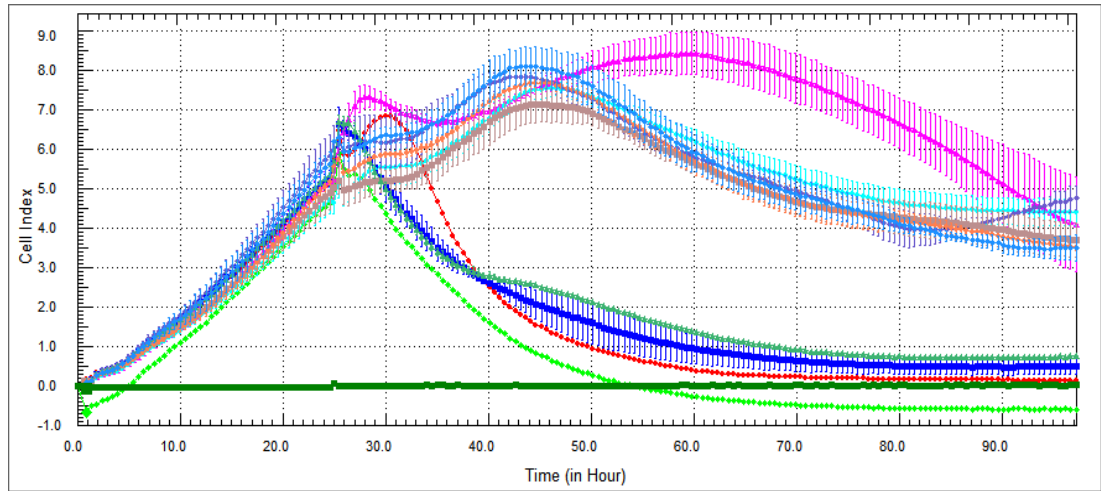
Şekil 19. MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi. (Kontrol ve 62,5 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,002$ 'dir, kontrol ve 125 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,005$ 'dir, IC_{50} değeri de bu değerler arasında çıkmıştır.)



Şekil 20. MCF-7 hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC_{50} değerinin belirlenmesi. xCELLigence RTCA software sistemi kullanılarak hesaplanması.

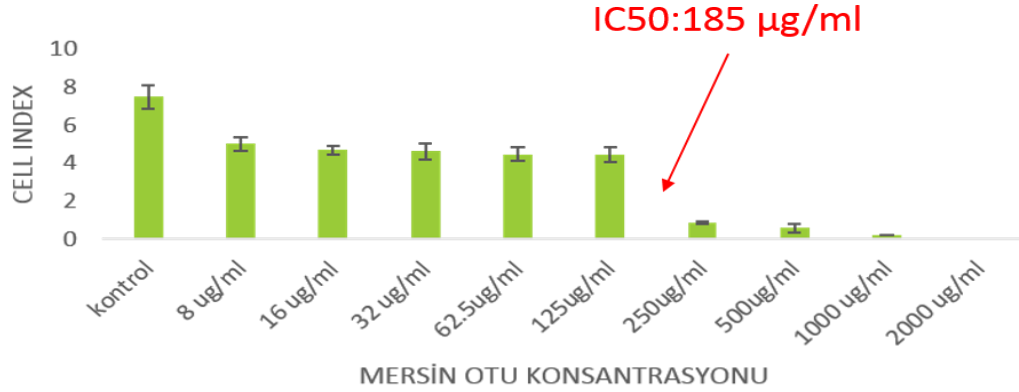
MCF-7 meme kanseri hücre hattında 3'er tekrarlı farklı dozlarda mersin otu ekstraktı uygulanması ardından kontrol grubuna göre hücre sayılarındaki değişiklik gözlemlenmiş, IC_{50} değeri belirlenmiştir. Yukardaki üç grafik de bu değişimi belirtmektedir. İlk grafik de hücre ekiminden 24 saat sonra madde uygulandığı ve her dozun farklı karakter gösterdiği belirlenmiştir. Ardından elde edilen cell index değerleri ile farklı konsantrasyonlardaki değişim hesaplanmış hücre sayısındaki değişim belirlenmiştir. Ayrıca bu değer xCELLigence RTCA software kullanılarak da hesaplanmış ve IC_{50} değeri 113 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Belirlenen IC_{50} değerinin arasında bulunduğu dozlar ile yapılan T-testi sonucunda p değerleri 0,05'den küçük olduğundan anlamlı sonuç elde edilmiştir.

4.2.3 UT-SCC-74A hücresinde mersin otu ekstraktının etkisi

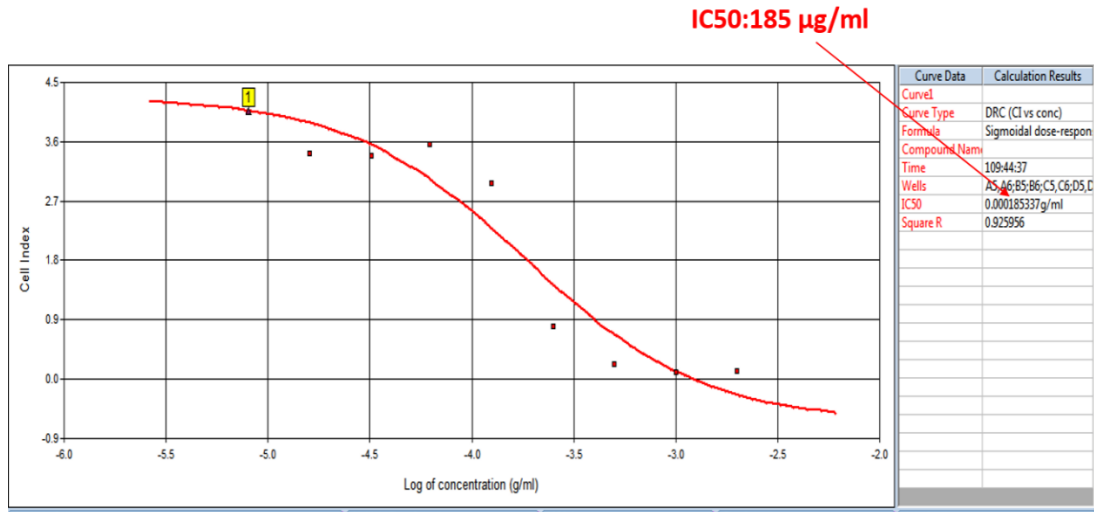


Şekil 21. UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması. Grafikte her renk farklı dozda mersin otu ekstraktını ifade eder. Pembe: kontrol, Mor: 8 $\mu\text{g/ml}$, Turkuaz: 16 $\mu\text{g/ml}$, Lila: 32 $\mu\text{g/ml}$, Turuncu: 62.5 $\mu\text{g/ml}$, Mavi: 125 $\mu\text{g/ml}$, Yeşil: 250 $\mu\text{g/ml}$, Lacivert: 500 $\mu\text{g/ml}$, Kırmızı: 1000 $\mu\text{g/ml}$, Açık yeşil: 2000 $\mu\text{g/ml}$, Koyu yeşil: sadece dmem.

74A HÜCRE HATTINA MERSİN OTU EKSTRAKTININ FARKLI DOZLARDA UYGULANMASI



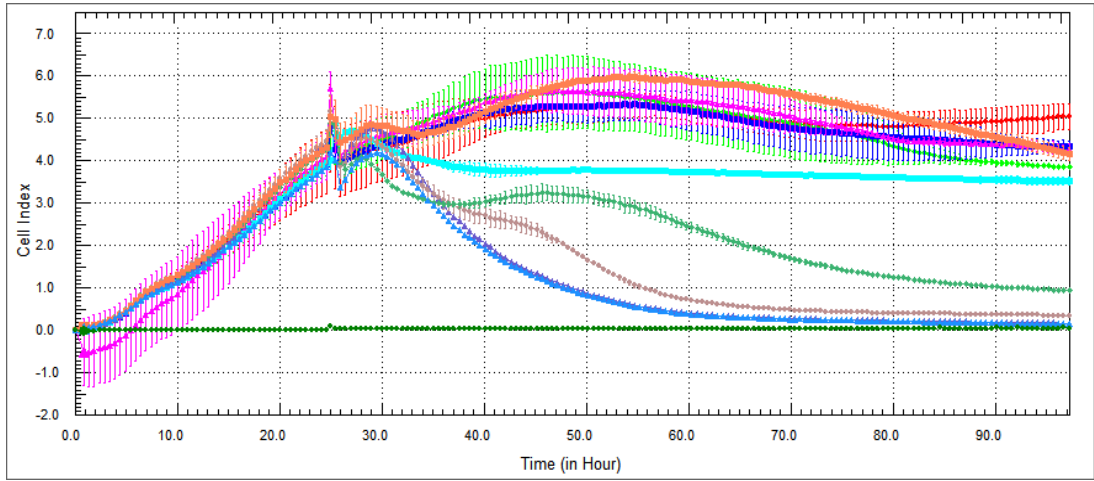
Şekil 22. UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi. (Kontrol ve 125 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,008$ 'dir, kontrol ve 250 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,001$ 'dür, IC_{50} değeri de bu değerler arasında çıkmıştır.)



Şekil 23. UT-SCC-74A hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC_{50} değerinin belirlenmesi. xCELLigence RTCA software sistemi kullanılarak hesaplanması.

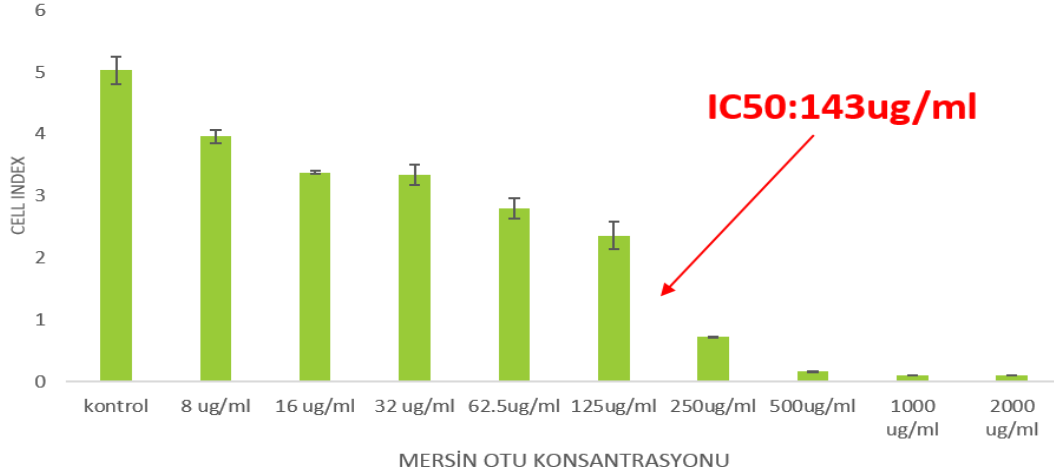
UT-SCC-74A hücre hattı için belirlenen sayıdaki hücreler E-Plakalara ekilmiş, 24 saat ardından mersin otu ekstraktı farklı dozlarda üzer tekrarlı olmak üzere hücrelere uygulanmıştır. Hücrelerin sayısındaki değişim izlenmiş, IC_{50} değeri tespit edilmiştir. Yukarıdaki üç grafik sonucunda belirlenen değer $185 \mu\text{g/ml}$ 'dir. Belirlenen IC_{50} değerinin arasında bulunduğu dozlar ile yapılan T-testi sonucunda p değerleri $0,05$ 'den küçük olduğundan anlamlı sonuç elde edilmiştir.

4.2.4 UT-SCC-74B hücrelerinde mersin otu ekstraktının etkisi

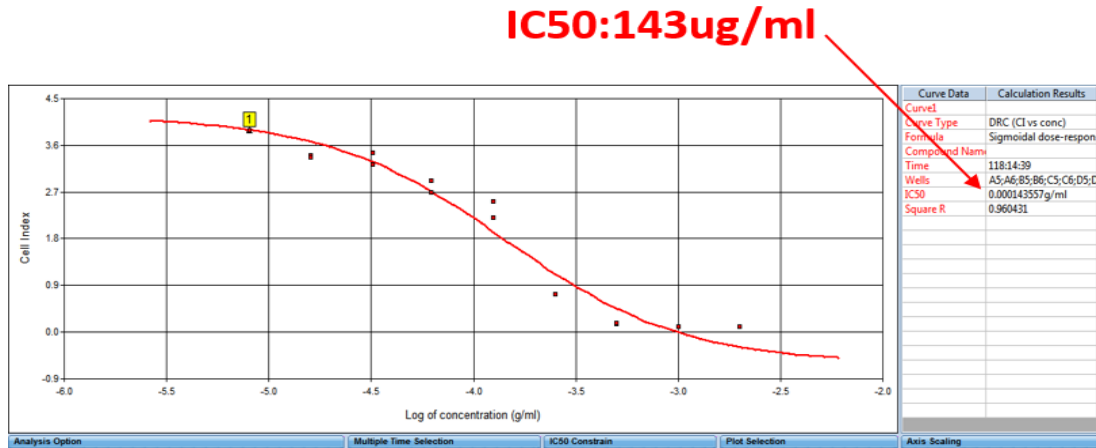


Şekil 24. UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması. Grafikte her renk farklı dozda mersin otu ekstraktını ifade eder. Kırmızı: Kontrol, Lacivert: $8 \mu\text{g/ml}$, Pembe: $16 \mu\text{g/ml}$, Turuncu: $32 \mu\text{g/ml}$, Açık yeşil: $62.5 \mu\text{g/ml}$, Turkuaz: $125 \mu\text{g/ml}$, Yeşil: $250 \mu\text{g/ml}$, Lila: $500 \mu\text{g/ml}$, Mor: $1000 \mu\text{g/ml}$, Mavi: $2000 \mu\text{g/ml}$, Koyu yeşil: sadece DMEM.

74B HÜCRE HATTINA MERSİN OTU EKSTRAKTININ FARKLI DOZLARDA UYGULANMASI



Şekil 25. UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından mersin otu ekstraktının sitotoksik etkisinin belirlenmesi. (Kontrol ve 125 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,0009$ 'dur, kontrol ve 250 µg/ml doz verilen mersin otu ekstraktı grupları arasındaki fark anlamlı olup, $p=0,0001$ 'dir, IC_{50} değeri de bu değerler arasında çıkmıştır.)



Şekil 26. UT-SCC-74B hücre hattına farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından IC_{50} değerinin belirlenmesi. xCELLigence RTCA software sistemi kullanılarak hesaplanması.

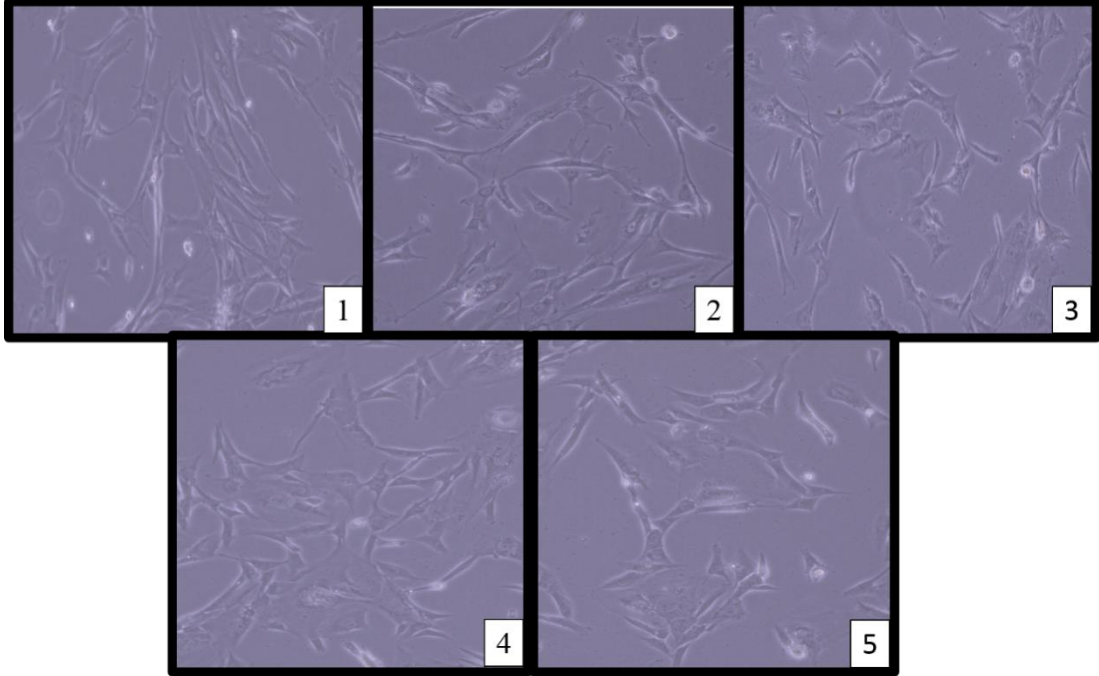
UT-SCC-74B hücre hattında da aynı şekilde belirlenen sayıdaki hücreler E-Plakalara ekilmiş 24 saat ardından mersin otu ekstraktı farklı dozlarda üçer tekrarlı uygulanmıştır. Bu hücre hattında da değişim izlenmiş, IC₅₀değeri hesaplanmıştır. UT-SCC-74B hücre hattı için de IC₅₀değeri 143µg/ml olarak belirlenmiştir. elirlenen IC₅₀değerinin arasında bulunduğu dozlar ile yapılan T-testi sonucunda p değerleri 0,05'den küçük olduğundan anlamlı sonuç elde edilmiştir.

Tüm hücre hatları için IC₅₀değerleri xCELLigence cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu cihaz ile hücrelerin her saatteki değişimi rahatça gözlemlenmiş, hücrelere uygulanacak maddenin zamanı bu şekilde belirlenmiştir. Ne zaman hücrelerin tamamen ölüme gittiği, ya da hangi zaman aralığında nasıl değiştiği de rahatça tespit edilmiştir. Kullanılan hücre hatlarında çok yüksek miktardaki dozların hücreleri tamamen ölüme götürdüğü gözlemlenmiştir (2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml). Düşük dozlarında kontrole yakın davrandığı hücreleri çok etkilemediği görülmüştür (8 µg/ml, 16 µg/ml gibi). Tüm veriler ışında IC₅₀değerleri belirlendikten sonra ikinci adım olarak apoptoz hücre ölümü ile mersin otu ekstraktının kanser hücrelerini ölüme götürdüğünü araştırmak amacı ile apoptoz yollarındaki gen değişimlerinin incelenmesine karar verilmiştir. Tretiakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kanser hücrelerine mersin otu ekstraktı uygulanması ardından hücrelerin apoptoz yolağını kullanarak hücre ölümünü gerçekleştirdikleri belirtilmiştir [5]. Bundan dolayı çalışmada apoptoz yolağındaki gen değişimleri incelenmiştir.

4.3 MERSİN OTU EKSTRAKTININ HUC-F, MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN MORFOLOJİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ

IC₅₀değerinin belirlenmesi için 2000 µg/ml'den 8µg/ml'e kadar olan dozlarda mersin otu ekstraktı geniş doz aralığında incelenmiştir. Bu değer tespitini ardından belirlenen dört doz diğer deney aşamalarında kullanılmıştır. Belirlenen dozlar 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml ve 32 µg/ml'dir. Bu dozlar belirlenirken hücre sayısının değişiminde en etkili olanlar seçilmiştir. Çok yüksek dozlar hücreleri neredeyse tamamen ölüme götürdüğünden, düşük dozlarda hücre üzerine çok etki etmediğinden aradaki dozlar seçilmiştir. Bu dozların arasında IC₅₀değeri de bulunmaktadır. Bu belirlenen dört doz kullanılarak western blot ve RT-PCR analizi yapılmış, apoptotik yolaktaki genlerin değişimleri incelenmiştir. Bu analizler için hücre ekimleri protein izolasyonunda 6'lık well-plate'e, RNA izolasyonunda da 12'lik well-plate'e yapılmıştır. İzolasyon öncesinde mersin otu ekstraktı uygulanan gruptaki hücrelerin morfolojilerindeki değişimler net bir şekilde gözlemlenmiştir. Aşağıda da bu hücrelerin şekilleri gösterilmektedir. Fibroblast hücre hattında madde uygulaması ardından hücre şekillerinde değişiklik gözlemlenmezken, kanser hücre hatlarında hücre morfolojilerinin değiştiği gözle görülmüştür.

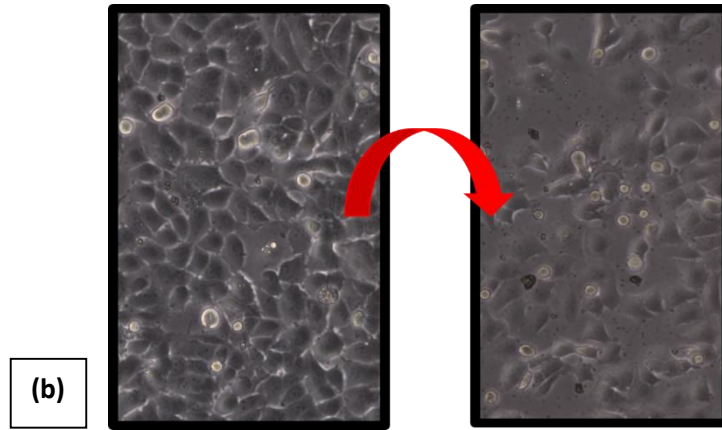
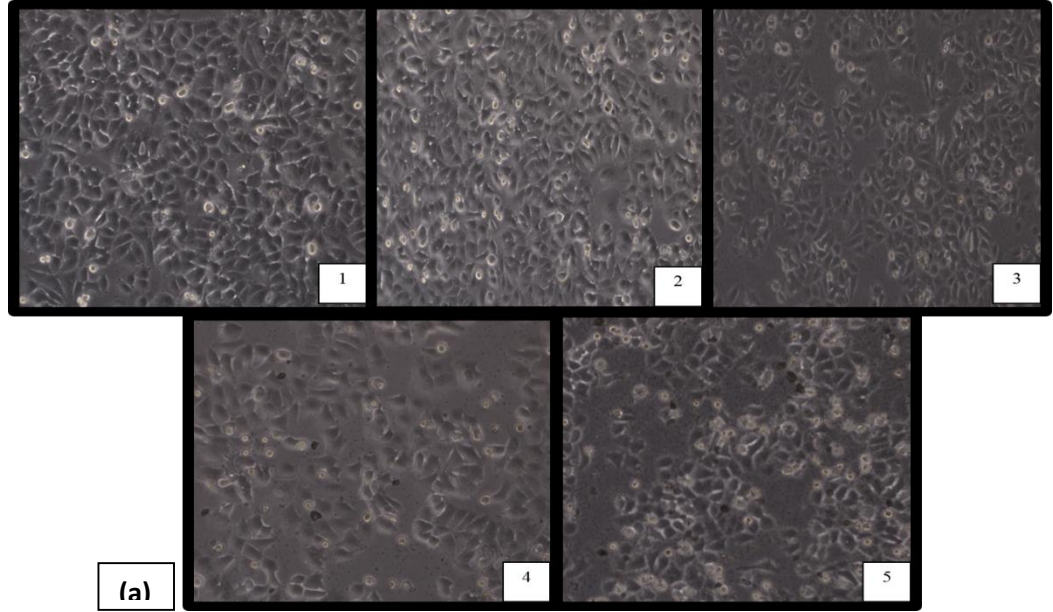
4.3.1 Mersin otu ekstraktının HUC-F hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi



Şekil 27.HUC-F hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi (10x büyütme) (1. Kontrol, 2. 32 µg/ml, 3. 62,5 µg/ml, 4. 125 µg/ml, 5. 250 µg/ml).

HUC-F hücrelerinde mersin otu uygulanan grupla kontrol grubu kıyaslandığında değişimin olmadığı görülmüştür.

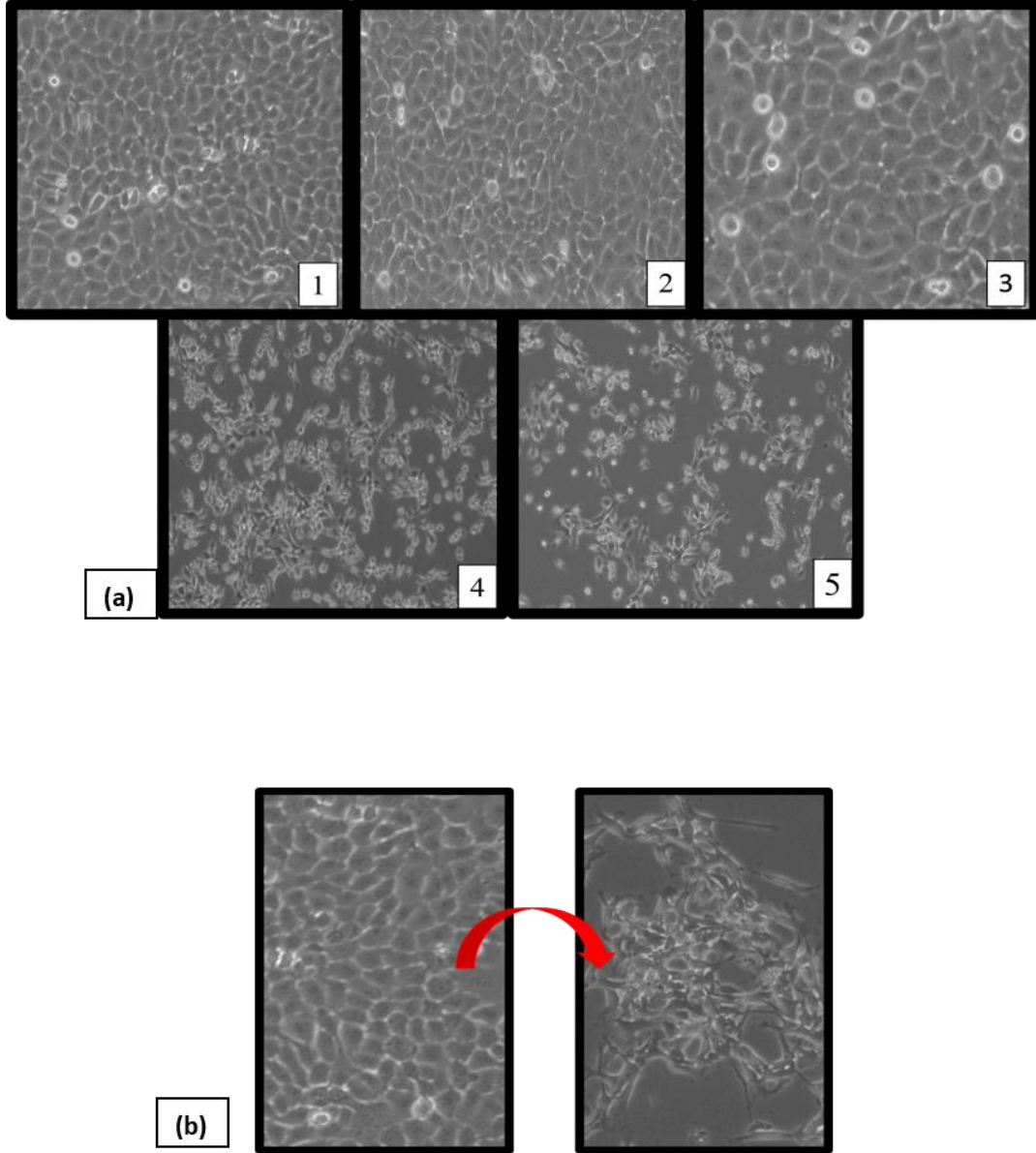
4.3.2 Mersin otu ekstraktının MCF-7 hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi



Şekil 28a: MCF-7 hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi (10x büyütme) (1. Kontrol, 2. 32 µg/ml, 3. 62,5 µg/ml, 4. 125 µg/ml, 5. 250 µg/ml) **b:**MCF-7 hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.

Hücrelerin morfolojilerinde madde uygulaması ardından değişiklik gözlemlenmiştir.

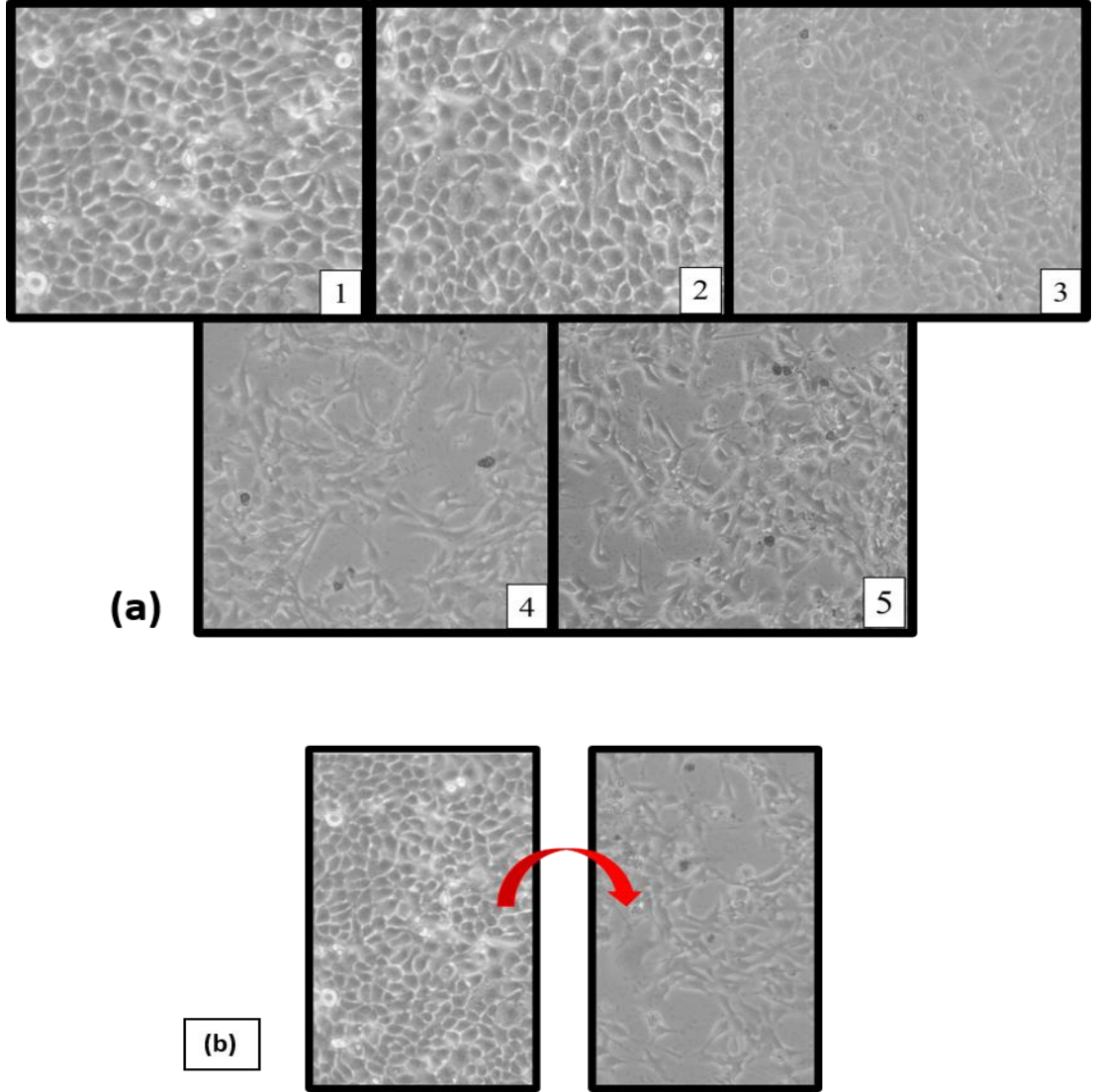
4.3.3 Mersin otu ekstraktının UT-SCC-74A hücresine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi



Şekil 29a:UT-SCC-74A hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi (10x büyütme) (1. Kontrol, 2. 32 µg/ml, 3. 62,5 µg/ml, 4. 125 µg/ml, 5. 250 µg/ml) **b:**UT-SCC-74A hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.

Hücrelerin morfolojilerinde madde uygulaması ardından değişiklik gözlemlenmiştir.

4.3.4 Mersin otu ekstraktının UT-SCC-74B hücrelerine uygulanması ardından morfolojilerinin gözlemlenmesi



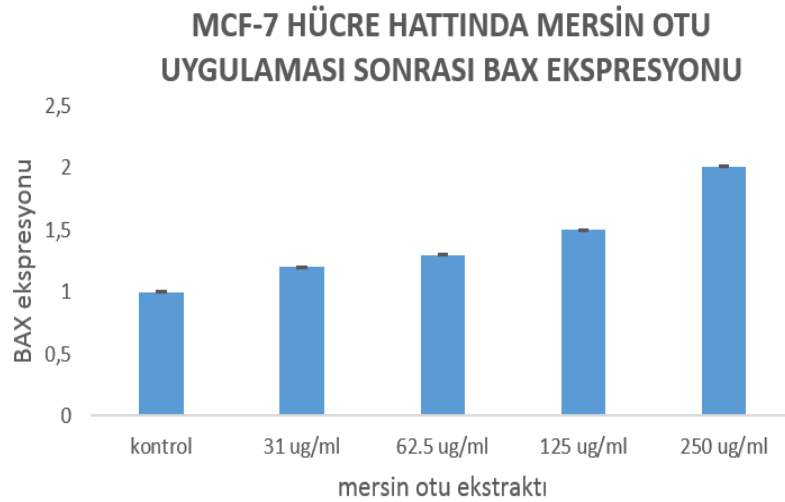
Şekil 30a: UT-SCC-74B hücre hattına 6 well-plate'e ekiminden 24 saat sonra farklı dozlarda mersin otu ekstraktının uygulanması ardından hücre şekillerinin gözlemlenmesi (10x büyütme) (1. Kontrol, 2. 32 µg/ml, 3. 62,5 µg/ml, 4. 125 µg/ml, 5. 250 µg/ml) **b:** UT-SCC-74B hücre hattında mersin otu uygulanan (125 µg/ml) ve kontrol grubun kıyaslanması, büyütülmüş hali.

Hücrelerin morfolojilerinde madde uygulaması ardından değişiklik gözlemlenmiştir.

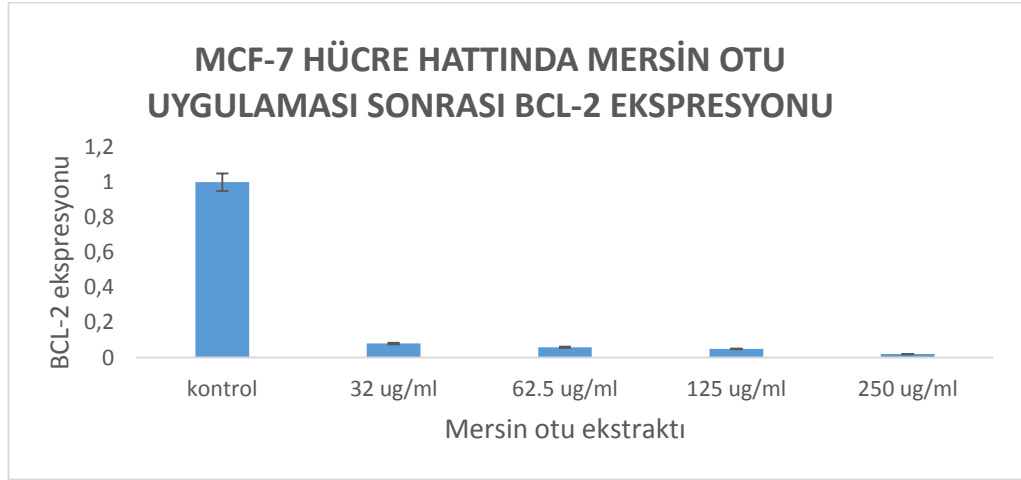
4.4 MERSİN OTU EKSTRAKTININ MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN RT-PCR İLE GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE BAKILMASI

Meme kanseri ve baş-boyun kanseri hücre hatlarında apoptotik hücre ölüm yolağını kullanarak hücrelerin ölüme gittiğini gözlemlemek için apoptozdaki önemli rolü olan BAX (Pro-apoptotik), BCL-2 (Anti-apoptotik) genleri seçilmiş, RT-PCR yapılmıştır. Böylece bu hücre hatlarında mRNA düzeyindeki değişiklikleri belirlenmiştir. Hücrelerin apoptoz yolağını kullanarak ölüme gittiği bu yapılan deneylerde gözlemlenmiştir. Bunu teyit etmek amacıyla ardından western blot analizi ile de bu genler protein seviyelerinde incelenmiştir.

4.4.1 MCF-7 hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması



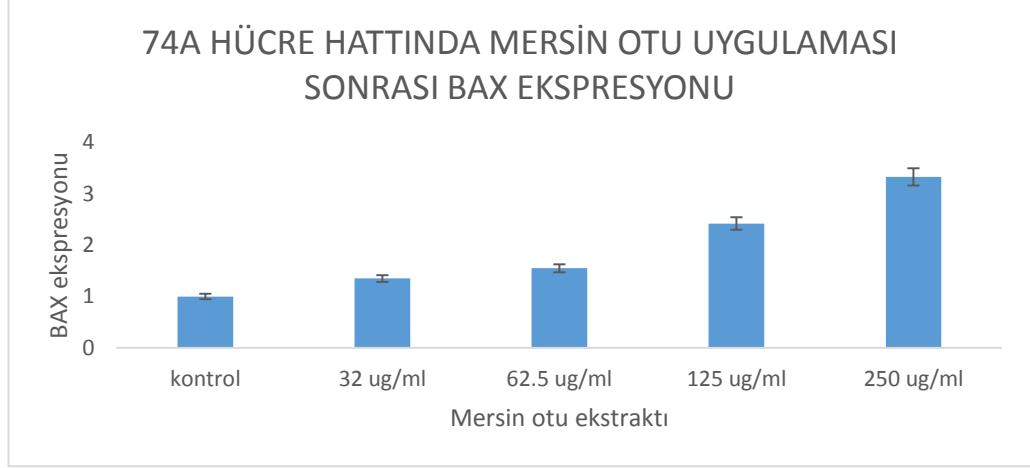
Şekil 31. MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BAX gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması. (Kontrole göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri: 32 $\mu\text{g/ml}$ =0,007, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ =0,005, 125 $\mu\text{g/ml}$ =0,001, 250 $\mu\text{g/ml}$ =0,0001'dir)



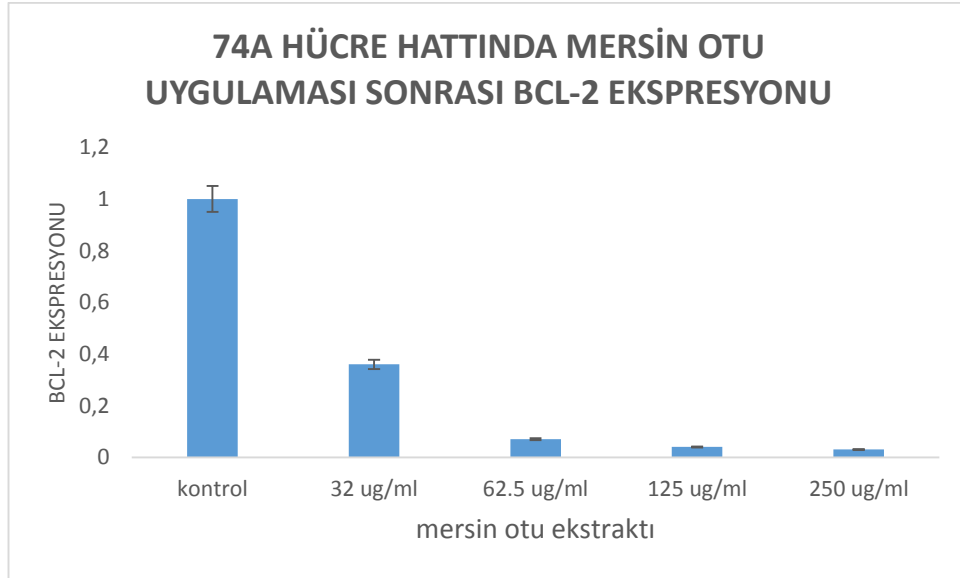
Şekil 32. MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BCL-2 gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması. (Kontrole göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri: 32 $\mu\text{g/ml}$ =0,004, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ =0,0001, 125 $\mu\text{g/ml}$ =0,001, 250 $\mu\text{g/ml}$ =0,0001'dir)

MCF-7 meme kanseri hücre hattında RT-PCR ardında pro-apoptotik gen olan BAX'ın kontrol grubuna nazaran 125 $\mu\text{g/ml}$ ve 250 $\mu\text{g/ml}$ mersin otu ekstraktı uygulanan gruplarında arttığı görülmüştür. Anti-apoptotik gen olan BCL-2 geninin ise tüm dozlarında kontrol grubuna göre düşüş gözlemlenmiştir.

4.4.2 UT-SCC-74A hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması



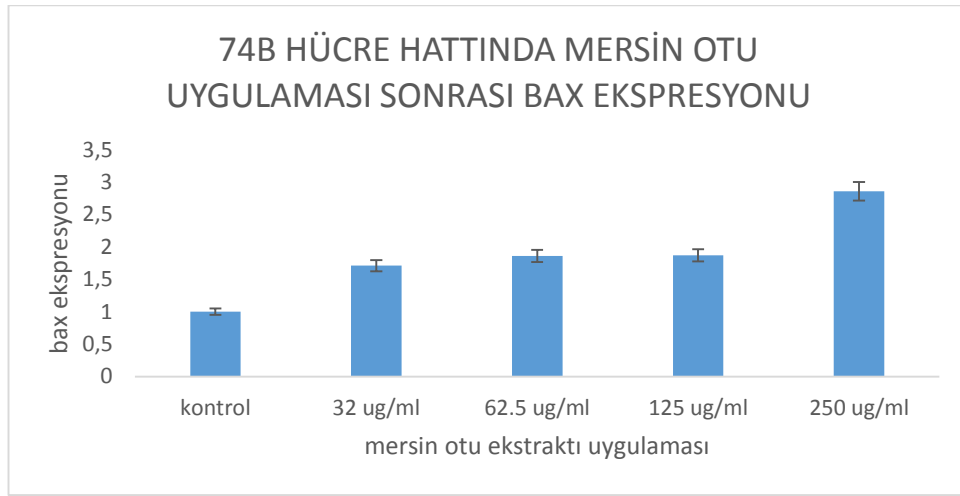
Şekil 33.UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BAX gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması.(Kontrole göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri:32 $\mu\text{g/ml}$ =0,004, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ =0,001, 125 $\mu\text{g/ml}$ =0,001, 250 $\mu\text{g/ml}$ =0,0001'dir)



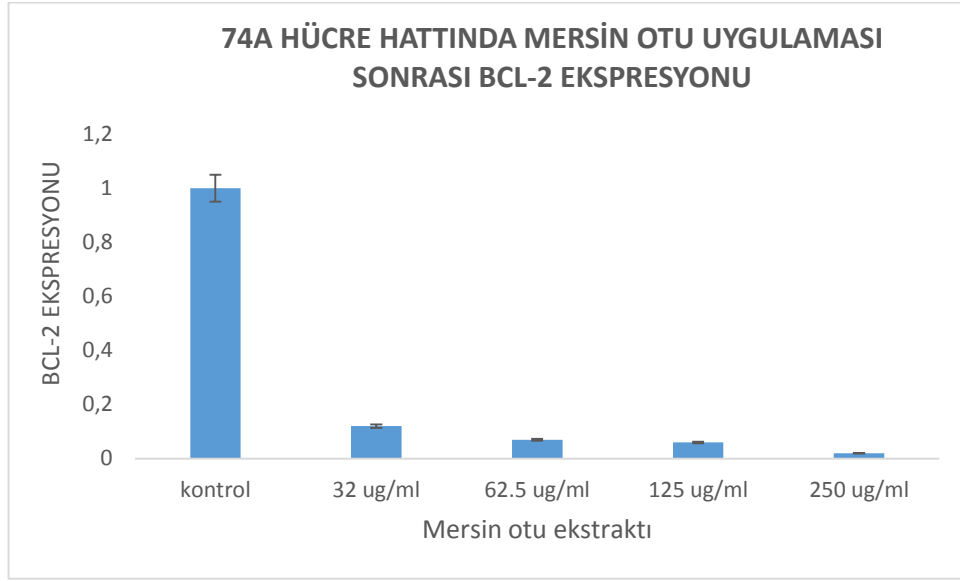
Şekil 34.UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BCL-2 gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması.(Kontrole göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri:32 $\mu\text{g/ml}$ =0,0005, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ =0,0002, 125 $\mu\text{g/ml}$ =0,002, 250 $\mu\text{g/ml}$ =0,0001'dir)

UT-SCC-74A baş-boyun kanseri hücre hatlarında BAX geninin kontrol grubuna göre 62,5 µg/ml dozundaki mersin otu ekstraktından itibaren arttığı gözlemlenmiştir. BCL-2 geninde de kontrol grubuna göre azalma olduğu tespit edilmiştir.

4.4.3 UT-SCC-74B hücre hattında BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerine bakılması



Şekil 35. UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BAX gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması. (Kontrole göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri: 32 µg/ml=0,0005, 62.5 µg/ml=0,0002, 125 µg/ml=0,0002, 250 µg/ml=0,0001'dir)



Şekil 36.UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı uygulaması sonrasında RT-PCR sonucu. Kontrol grubu ile 4 farklı doz uygulanmasında BCL-2 gen ekspresyonundaki değişikliğin saptanması.(Kontrolle göre sırasıyla her doz için hesaplanan p değeri:32 µg/ml=0,0005, 62.5 µg/ml=0,0008, 125 µg/ml=0,004, 250 µg/ml=0,0001'dir)

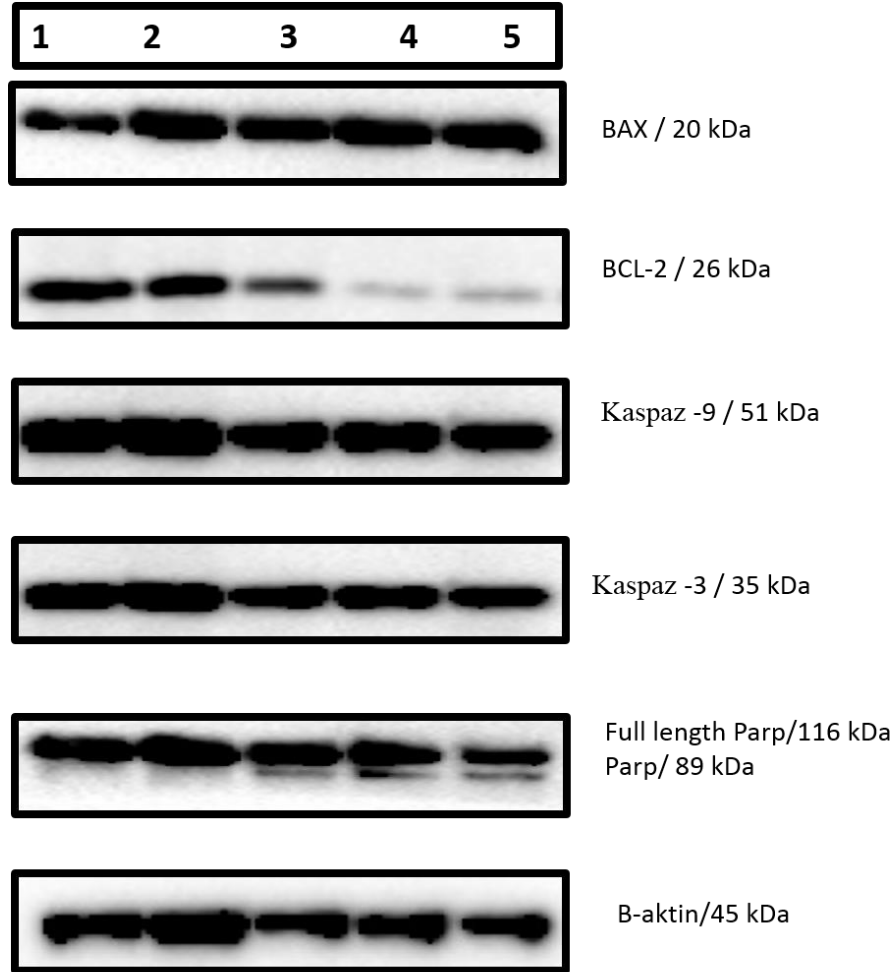
UT-SCC-74A baş-boyun kanseri hücre hatlarında da BAX geninin kontrol grubuna göre 62,5 µg/ml dozundaki mersin otu ekstraktından itibaren arttığı gözlemlenmiştir. BCL-2 geninde de kontrol grubuna göre azalma olduğu tespit edilmiştir.

Üç hücre hattında da pro-apoptotik gen olan BAX'ın artışı, anti-apoptotik gen olan BCL-2'nin azalışı hücrelerin apoptotik yolağı kullandığına bir işarettir.

Bundan sonraki aşamada da kanser hücre hatları western blot ile protein seviyesinde incelenmiştir. Anti-apoptotik ve pro- apoptotik genlerin bazıları kullanılmıştır.

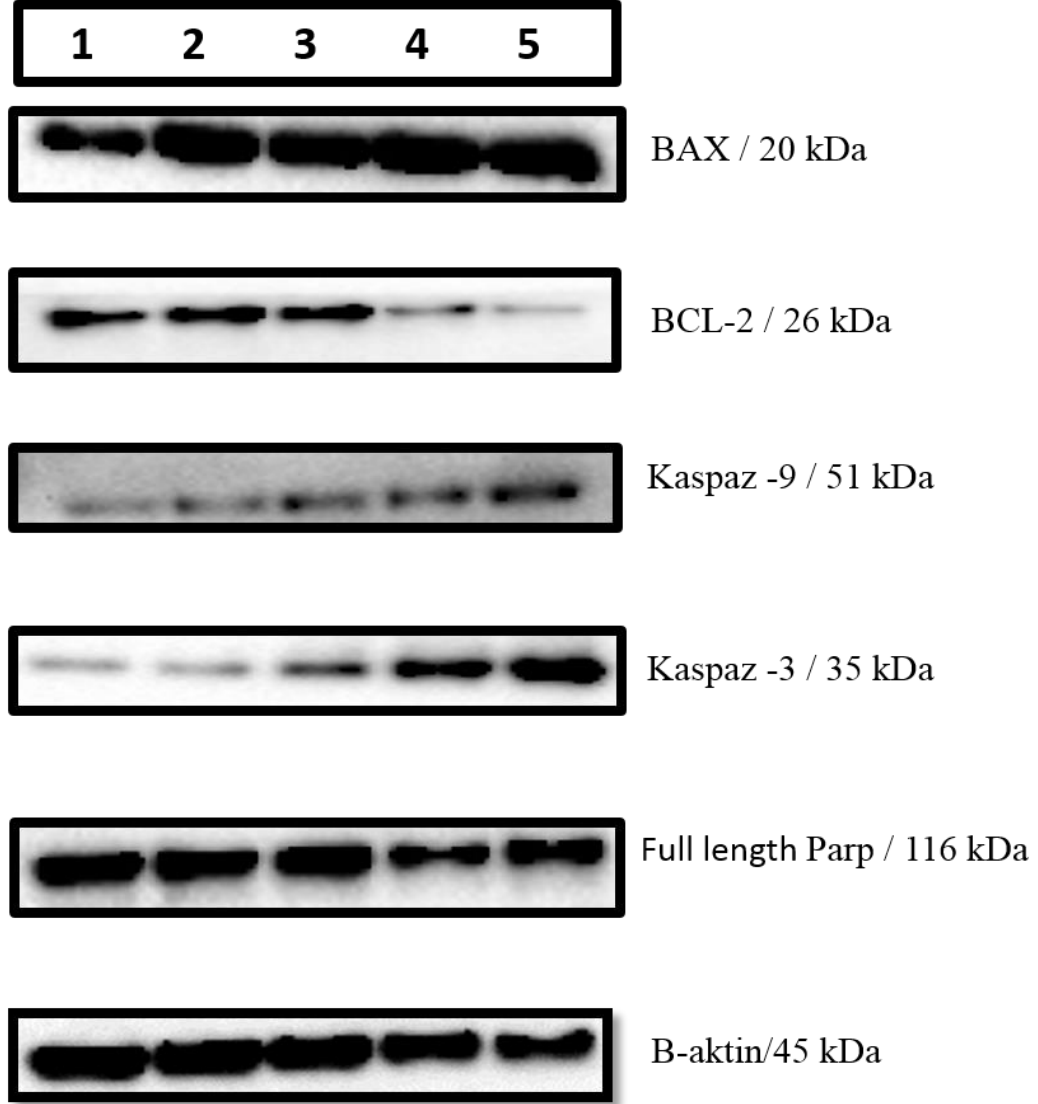
4.5 MERSİN OTU EKSTRAKTININ MCF-7, UT-SCC-74A VE UT-SCC-74B HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE PROTEİN DÜZEYLERİNE BAKILMASI

4.5.1 MCF-7 hücre hattında western blot sonuçları



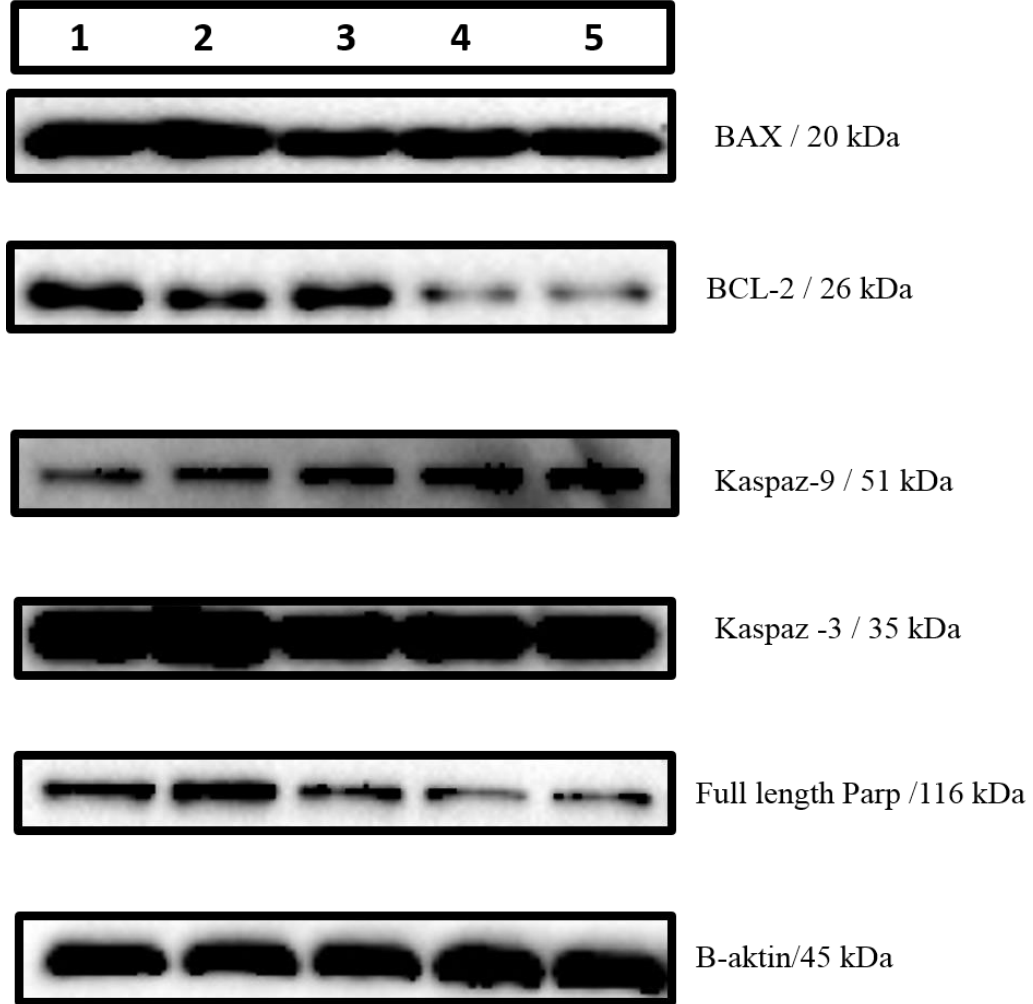
Şekil 37. MCF-7 hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β -aktin tayini. 1.Kontrol, 2. 32 μ g/ml, 3. 62 μ g/ml, 4. 125 μ g/ml, 5. 250 μ g/ml

4.5.2 UT-SCC-74A hücre hattında western blot sonuçları



Şekil 38 UT-SCC-74A hücre hattında 24 saatlik mersin otu ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β -aktin tayini. 1.Kontrol, 2. 32 μ g/ml, 3. 62 μ g/ml, 4. 125 μ g/ml, 5. 250 μ g/ml

4.5.3 UT-SCC-74B hücre hattında western blot sonuçları



Şekil 39. UT-SCC-74B hücre hattında 24 saatlik mersin 10 ekstraktı sonrası western blot yöntemiyle BAX, BCL-2, Kaspaz-9, Kaspaz-3 PARP ve β -aktin tayini. 1.Kontrol, 2. 32 μ g/ml, 3. 62 μ g/ml, 4. 125 μ g/ml, 5. 250 μ g/ml

Hücre ölümlerinin apoptoz yolağını kullanarak mı gerçekleştiği sorusuna yanıt bulmak amacıyla yapılan western blot incelemesi şekil 37, 38 ve 39’da gösterilmiştir. Mersin otu ekstraktının 24 saat sonrasında uygulanması ardından MCF-7, UT-SCC-74A ve UT-SCC-74B hücrelerinde apoptotik ve pro-apoptotik genlerden bazıları ile PARP değişimi değerlendirilmiştir. MCF-7’de PARP kırılması gözlenirken, diğer hücre hatlarında bu görülmemiştir. Ama üç hücre hattında da kontrol grubu ile doz verilen gruplar kıyaslandığında PARP geninde azalma görülmüştür. Apoptoz esnasında PARP’ın parçalanarak hücreyi ölüme götürdüğü bilindiğinden bu hücrelerin apoptoz ile hücre ölümlerini gerçekleştirdiği söylenebilir. Bununla birlikte yine üç hücre hattında BAX geninin kontrol grubuna göre artan doza bağlı olarak arttığı görülmüştür. Bu da pro-apoptotik olan bu gen ile hücrenin apoptoza gittiğine işaret etmiştir. Anti-apoptotik gen olan BCL-2’nin doza bağlı olarak üç hücre hattında da azalışı apoptoz ile ölümün diğer işaretçisi olmuştur. Aynı zamanda apoptoza anahtar rol alan kaspaz 3 ve kaspaz 9 genleri de kontrol grubuna göre mersin otu ekstraktı uygulanan grup arasında karşılaştırılmıştır. MCF-7 hücre hattında kaspaz-3’ün varlığı tespit edilmiştir. Bazı araştırmalarda kaspaz-3’ün MCF-7 hücre hattında eksik olduğu bildirilmişken [135], birçok çalışma da varlığını tespit etmiştir [136]. Yalnız çalışmamızda doza bağlı bir değişim görülmemiştir. UT-SCC-74A hücre hattında kaspaz-3’ünde kaspaz-9’unda doza bağlı artışı görülmüştür. UT-SCC-74B hücre hattında ise kaspaz-3’de değişim görülmezken kaspaz 9’un doza bağlı arttığı görülmüştür.

5.TARTIŞMA

Araştırmalarda kanserin sağlık alanında karşılaşılan en büyük problem olduğu tespit edilmiştir. Çok uzun zamandır ölüm nedenleri içerisinde hızla artış görüldüğü belirtilmiştir. Bu hastalığın milyonlarca insanın ölümüne yol açtığı ifade edilmiştir. Kanser Hipokrat (460-370 M.Ö.) tarafından karsinoma ve karsinoz olarak ifade edildiği zamandan bu yana üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Tüm bu çalışmalara rağmen hala bazı kanserlerin tedavilerinin çok kısıtlı olduğu ya da mümkün olmadığı, bazılarında ise tedavinin mümkün olabileceği belirtilmiştir. Kanser etiyojine bağlı tiplerinin de farklılaştığı bilinmektedir[125]. Bazı kanser türlerinin diğerlerine göre daha yüksek oranda ölüme yol açtığı tespit edilmiştir. Bunların başında akciğer kanserinin geldiği belirtilmiştir[137].

Kanser üzerine yapılan birçok çalışmaya rağmen ölüm oranlarının geçen zamanla daha da arttığı 2050 yılında 17 milyon kişiye kanser teşhisi konulacağı öngörülmektedir[72]. Tüm bunlardan dolayı kanser üzerine yapılan çalışmaların moleküler seviyede daha da artırılması ve genomik düzeydeki araştırmaların çoğalması oldukça önemlidir.

Bu araştırmada kullanılan meme kanseri de meme dokusundaki hücrelerden gelişen bir kanser türüdür. Kadınlarda sık görülen, yüksek mortaliteye sahip olan bu kanser kadınlarda görülen kanserlerin %23'ünü teşkil etmektedir[6]. Meme kanseri tedavisi sırasında tedaviye yanıt alınamamasına ve tedavinin ardından kanserin tekrarlamasına çok fazla rastlanmaktadır. Aynı zamanda tedavi sırasında ilaca direnç kazanan bir kanser türü olduğu da belirtilmiştir[138]. Bu sebeplerden dolayı çalışmalar yeni terapötik yolların aranmasına doğru yönelmiştir.

Araştırmadaki diğer kanser türü olan baş ve boyun kanserleri, erken teşhiste tedavi edilebilen kanser türlerindedir. Erişkin yaşta daha sık görülen bu kanser baş ve boyundaki yassı hücrelerden mukozal yüzeylerden köken alırlar[77]. Aynı zamanda tükürük bezindeki farklı tür hücrelerden de köken alarak oluşurlar. Köken aldıkları baş-boyun bölgesine göre de sınıflandırılırlar[72]. Bazı durumlarda da baş boyun üzerinde herhangi bir kanserleşme görülmezse lenf düğümlerinde bu kanserin metastaz yapabileceği belirtilmiştir[139].

Daha çok radyoterapi ile tedavi edilen bu kanser tipinde cerrahi yöntemler, ilaçla tedavi de kullanılmaktadır. Bazı durumlarda bu yöntemler beraber kullanılarak tedavi gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Ama bazı durumlarda bu tedaviler yetersiz geldiğinden yeni tedavi yöntemleri de aranmaktadır.

Yapılan farklı çalışmalarda kanser tedavisinde sitotoksitesisi düşük maddelerin kanser üzerindeki etkileri ve hedefe yönelik tedaviler araştırılmaya başlanmıştır. Hedefe yönelik tedaviler içinde hücre ölümünde rol oynayan genler incelenmiş, bunlar üzerine çalışmalar yapılmıştır. Örneğin hücre ölüm türü olan apoptoz yolağında görevli Bcl-XL, Bcl-2 gibi anti-apoptotik genleri hedef alan inhibe edici küçük moleküllerin klinik öncesi deneme aşamasında olduğu belirtilmiştir[140]. Eğer bu genlerin ekspresyonu kanser hücrelerinde engellenirse hücreler apoptoza gidebilecek ve hedefe ulaşılacaktır. Günümüzde bu şekilde araştırması sürdürülen molekül olduğu gibi tedavide kullanılan moleküller de mevcuttur. Anti-apoptotik olan Bcl-2 üzerine fosforilasyonla etki edip, meme kanseri hücrelerini apoptoza götüren Doksitaksel de buna örnek gösterilebilir [141]. Bu ilaçların kemoterapik ilaçlarla kullanımının tedaviyi etkin hale getirdiği çalışmalarda belirtilmiştir[142]. Bu tarz birçok çalışma olmakla birlikte bu çalışmaların tamamen çare olmadığı, sağlıklı hücelere zarar vermeyen sitotoksik etkisi az olan ilaçlar olmadığı belirtilmiştir. Farklı yollar esas alınarak yapılan çalışmalar da dahil olmak üzere bu çalışmaların yetersiz olduğu sitotoksitesisi düşük maddelerin tedavide arandığı bildirilmiştir[143]. Yapılan çalışmalarda bitkisel tedavinin sağlıklı hücelere zarar vermediği tespit edilmiştir. Halk arasında birçok bitki hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerin yaprakları, kökleri, gövdeleri, meyveleri, bitkilerden elde edilen yağları hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ünce yapılan çalışmada dünyadaki nüfusun %80'inin sağlığı için geleneksel tedaviye güvendiği tespit edilmiştir[144]. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımlarının insanlık tarihiyle birlikte başladığı, binlerce yıl öncesinden bitkilerin tedavi ediciliğinden faydalanmaya başladığı kaynaklarda belirtilmiştir. Halk arasında kullanılan bitkilerin Anadolu'da da yaygın olduğu ve bunun günümüze kadar geldiği bildirilmiştir.

Halen kullanılan ilaçlar arasında da birçok ilacın bitki kökenli olduğu ifade edilmiştir. Ülkemizde üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunmasından dolayı birçok farklı çeşit bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20.000 olduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir. İlk çağlardan kalan arkeolojik bulgular insanların besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalandığını gösteriyor. İnsanın var olduğu zamandan beri de bitkilerin insanların hizmetinde olduğu bilinmektedir[145]. Yüzyıllar öncesinden halk arasında kullanılmaya başlanan bitkilerden biri olan Myrtaceae familyasından olan mersin (*Myrtus communis* L.) bitkisi de tedavi edici birçok özelliğe sahiptir. Bu bitkinin birçok kullanım alanı olduğu gibi antikanserojen etkisinin de mevcut olduğuna dair çalışmalar yapılmıştır. Bu bitkinin farklı kanser tipleri üzerindeki etkisi araştırılmış ve mersin otunun farklı kanser türlerinde kanserli hücreleri apoptoza götürdüğü bildirilmiştir. Buna örnek 2008'de Tretiakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mersin otunun farklı kanser hücrelerini mitokondriyal yoldan apoptoza götürdüğü belirtilmiştir [5]. Ayrıca Mothana ve arkadaşlarının 2011'de bitkilerle yaptıkları çalışmada mersin bitkisinin anti-kanser özelliği üzerinde durulmuştur[110]. Bu bitki Akdeniz çevresinde yayıldığından ülkemizde de çok fazla bulunmaktadır. Bununla birlikte sitotoksitesi düşük olduğu için bu çalışmada kullanılmıştır. Aynı zamanda mersin otu halk arasında yaygın kullanılmasına rağmen bilimsel çalışmaları çok yaygın değildir. Bundan dolayı hedef seçilen bu bitki üzerinde birçok çalışma yapılabilecek bir bitkidir. Yapılan çalışmalarda mersin otunun kanser hücre hatlarında hücreleri apoptotik yolağı kullanarak ölüme götürdüğü bildirildiğinden bu çalışmada da bu yolak hedef alınmış, çalışmalar buna göre sürdürülmüştür.

Hasara uğramış hücrelerin veya organizmada görevini tamamlamış hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan, genetik olarak kontrol edilen programlanmış bir hücre ölümü olan apoptoz yolağı ile kanser hücrelerini ölüme götürdüğü belirtilen mersin otu ekstraktının anti-kanser özelliği üzerine olan çalışmaların az olduğu görülmüştür. Yine mersin otunun toksisitesi üzerine olan çalışmaların da kısıtlı olduğu J e l e n a ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ifade edilmiştir[146].

Tretiakova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da mersin otunun yapraklarındaki Myrtucommulone (MC)'nin farklı kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü ifade edilmiştir. Kullandıkları hücre hatları; lösemi, prostat kanseri, kolon kanseri olarak bildirilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan fibroblast hücrelerinde bu bitkinin sitotoksik etkisinin çok az olduğu bildirilmiştir. Mitokondriyal yoldan hücreleri apoptoza götürdüğü tespit edilen çalışmada intrinsik yoldaki PARP, kaspaz-3, -8 ve -9 değişimine bakılmıştır. Çalışmadan elde ettikleri anlamlı sonuçlar ışığında (MC)'nin sitotoksitesi düşük anti-kanser ilaç için potansiyel olabileceğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada mersin otu ekstraktı üzerine bilinen az bilimsel araştırmanın olduğu, farmakolojik çalışmanın da sınırlı olduğu ifade edilmiştir. Bundan dolayı bu bitkinin apoptotik hücre yolağındaki etkisinin tespiti farmakolojik çalışmalar için büyük önem taşıyabileceği belirtilmiştir[5]. Bu tez çalışmasında da apoptotik yoldaki değişimin izlenmesi hedeflenerek çalışma sürdürülmüştür.

Tedaviye yönelik moleküler düzeyde yapılan kanser çalışmalarının günümüzde büyük önem taşıdığı bilindiğinde bu şekilde sürdürülen çalışmalarda belirlenen kanser türleri de ülkemizde sık görülmesi ve yeni tedavi yolları aranması sebebiyle seçilmiştir. Öncelikle çalışmada sitotoksite ölçülmüş, mersin otu ekstraktının meme kanseri ve baş-boyun kanseri hücre hatlarındaki etkisi belirlenmiştir. Bunların yanında kontrol grubu olarak kullanılan fibroblast hücrelerinde de mersin otu ekstraktının etkisi incelenmiştir. 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml mersin otu ekstraktı fibroblast hücrelerini ölüme götürdüğü xCELLigence cihazı ile yapılan sitotoksite deneyinde görülmüştür. Bu dozların altındaki diğer dozlarda da hücre ölümünün olduğu ama bu hücre ölümünün çok az miktarda olduğu belirlenmiştir. Böylece daha önceden yapılan çalışmalardaki gibi sitotoksitesi düşük bir bitki olduğu sonucuna varılmıştır. Ardından meme kanseri ve baş-boyun kanserinin tümör ve metastazlı hücre hatlarına mersin otu ekstraktı uygulanmış ve IC₅₀ (Hücre büyümesinin % 50'sini inhibe eden konsantrasyon) değerleri belirlenmiştir. Bu değerler; MCF-7 meme kanseri için 113 µg/ml, UT-SCC-74A baş-boyun kanseri hücre hattı için 185 µg/ml, UT-SCC-74B baş-boyun kanseri hücre hattı için de 143 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Mersin otu ekstraktının kanser hücrelerini ölüme götürdüğü tespit edildikten, sitotoksik etkisi belirlendikten sonra hücre ölümünün önceki çalışmalarda bildirildiği gibi apoptoz yolağından mı olduğu sorusuna cevap arandı. Bunun için apoptoz yolağındaki genlerin değişimi kanser hücre hatlarında incelendi. Hem RNA hem protein seviyesindeki değişiklikler incelendi.

RT-PCR ile apoptoz yolağında, hücrenin yaşamını ya da ölümünü belirleyen önemli bir kapı olan mitokondrinin dış membranının açılıp kapanmasında görevli anti-apoptotik BCL-2 ve pro-apoptotik olan BAX geninin değişimi incelenmiştir. BCL-2 dış mitokondriyal membran kanallarını kapalı tutmaya çalışırken tersine BAX proteini ölüm sinyalleri ile bu kanalları açmaya çalışır. Bu genlerin çalışmadaki kanser hatlarındaki değişimi incelenmiştir. Doza bağlı olarak meme kanseri hücre hattında da baş boyun kanseri hücre hattında da BAX geninin arttığı, BCL-2 geninin azaldığı tespit edilmiştir. anlamlı bir artışın olduğu değer belirlenen IC₅₀ değerine de yakın bir değer olduğu görülmüştür. Demek ki bu kanser türlerinde mersin otu ekstraktı uygulaması ardından hücre ölümü apoptoz yolağı ile gerçekleşmektedir sonucu çıkarılabilir. Yapılacak diğer çalışmalarda apoptoz yolağındaki diğer genlerin değişimi de incelenip bu bilgi teyit edilebilir.

Apoptoz hücre ölümündeki anahtar bileşenlerin Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteini olduğu bilinmektedir. Bu grupların biyokimyasal aktivasyonu; çekirdek zarının parçalanması, apoptoz sırasında gözlenen mitokondriyal hasar, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik yapının farklılaşmasına sebep olmaktadır [147].

Bu aşamadan sonra western blot analizi ile kanser hücrelerinde protein seviyesinde inceleme yapılmıştır. Bunun için yine öncelikle anti-apoptotik BCL-2 ve pro-apoptotik olan Bax geni incelenmiştir. Apoptotik yolda sinyal alındıktan sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Bu geçirgenliğin azalması sebebiyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçtiği ifade edilmiştir [123].

AIF direk parçalanmış çekirdeğe ve yoğunlaşmış kromatine yönelmektedir. Sitokrom c'nin görevi de apoptozun en son basamağındadır, sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive edip 'apoptozom' adındaki kompleksi oluşturur. Prokaspaz-9'un aktifleşmesi de bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apoptozomun oluşması inaktif prokaspaz-9'ı aktif kaspaz 9'a dönüştürür. Aktifleşen kaspaz 9'da efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder [9]. Kaspaz 3'de deoksiribonükleazın serbestleşmesinde görev alır, ardından kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Tedavide kaspaz ailesi üyelerinin ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonlarının önemli yer tuttuğu belirtilmiştir [126]. Yeni tedavilerin arasında olan Bcl-2 antisense'in ilk klinik çalışmaları non-Hodjkin's lenfoma da yapılmış ve olumlu sonuç alınmıştır [9]. Bu çalışmada da BAX ve BCL-2'deki anlamlı değişiklik tedavi de kullanılabileceğine işaret etmektedir. Çünkü MCF-7 meme kanseri hücrelerinde mersin otu ekstraktı uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre BAX geninde artan doza bağlı artış olması, BCL-2 geninde de artan doza bağlı azalış olması bu hücre hattının apoptoz yolağı ile ölüme gittiğini göstermektedir. Özellikle 125 µg/ml ve 250 µg/ml mersin otu ekstraktı uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı değişim tespit edilmiştir. UT-SCC-74A baş-boyun kanser hattında da BAX geni doza bağlı olarak artmışken, BCL-2 geninde de anlamlı azalış görülmüştür. UT-SCC-74B hücre hattında ise BAX geninde değişiklik görülmezken, BCL-2'de doza bağlı azalma görülmüştür. UT-SCC-74A hücreleri primer tümör dokuları, UT-SCC-74B ise metastaz dokulardır. Bu iki hücre hattı da apoptotik yolağı kullanarak mersin otu uygulaması ardından hücre ölümünü gerçekleştirmiştir.

Apoptozda anahtar bileşenlerden olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 çalışmada incelenmiştir. Çalışmada MCF-7 hücre hattında kaspaz-3'ün varlığı tespit edilmiştir. Bazı araştırmalarda kaspaz-3'ün MCF-7 hücre hattında eksik olduğu bildirilmişken [135], [118] birçok çalışma da varlığını tespit etmiştir [136]. Yalnız MCF-7 hücre hattında çalışmamızda doza bağlı bir değişim görülmemiştir. UT-SCC-74A hücre hattında kaspaz-3'ünde kaspaz-9'unda doza bağlı artışı görülmüştür. UT-SCC-74B hücre hattında ise kaspaz-3'de değişim görülmezken kaspaz 9'un artan doza bağlı artış görülmüştür.

Apoptoz yolağının son basamağında görev alan PARP geni de son olarak incelenmiş. Bu gendeki değişime göre diğer genlerdeki değişimle apoptozun başladığı düşüncesi doğrulanmıştır. Eğer bu gende de anlamlı değişiklikler mevcutsa hücrelerin mersin otu ekstraktı uygulanması sonrasında apoptotik hücre ölümüne uğradığı doğrulanacaktı. Üç hücre hattında da artan mersin otu ekstraktı dozuna bağlı PARP'da azalış tespit edilmiştir. PARP apoptoz yolağında kaspazlara bağlı değişim göstermektedir. Çünkü mitokondriden AIF salınmasını sağlayan PAR'ın üretilmesiyle programlanmış hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir. Ayrıca PARP'ın parçalanmasında kaspazların görev aldığı bilinmektedir [148]. Mersin otu ekstraktının meme kanseri ve baş-boyun kanseri hücrelerine uygulanması ardından PARP'da azalmanın olması da hücre ölümünü apoptotik yolakla gerçekleştirdiklerini göstermiştir. Meme kanseri hücre hattında PARP'ın kırılmış şekli de bantlarda gözlemlenmiş, apoptoza bu hücre hattında gittiğini göstermiştir.

Tüm bu çalışmalar ışığında üç hücre hattının da apoptoz hücre yolağı ile hücre ölümüne gittiği tespit edilmiştir. Yapılacak daha geniş çalışmalar ile apoptotik yolaktaki diğer genler de incelenerek bu çalışma ilerletilebilir.

6. SONUÇ

Mersin otu ve kanser üzerine yapılan çalışmaların kısıtlı olması sebebiyle başlatılan bu çalışmadan elde edilen anlamlı sonuçlar bu bitki ekstraktı üzerine yapılacak çalışmaların genişletilebileceğini göstermiştir. Meme kanserinin ülkemizde sık görülmesi, baş ve boyun kanserinin de tedavi sürecinde yeni yolların aranması sebebiyle bu kanser türleri üzerinde durulan çalışmada mersin otu ekstraktının fibroblast hücrelerinde sitotoksitesinin az olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan kanser hücrelerinde de mersin otu ekstraktının belli dozlarının hücreleri ölüme götürdüğü belirlenmiştir. Ardından yapılan çalışmalar ile meme kanseri ve baş-boyun kanseri hücrelerinin mersin otu uygulaması ardından apoptoz yolu ile hücre ölümüne gittiği tespit edilmiştir.

Nihayetinde bu çalışmada sitotoksitesi düşük olan mersin otu ekstraktının baş-boyun kanseri ve meme kanseri tedavilerinde daha etkili tedavilerin bulunabileceğine işaret olabileceği gösterilmiştir. Mersin otu ekstraktının ilerleyen çalışmalarda da kemoterapik ilaçlarla birlikte kullanılabilmesi, yan etkilerinin azaltılabileceği öngörülmektedir. Yapılan bu çalışma ülkemizin de ilerlemesine sebep olacaktır. Çünkü Akdeniz bitkisi olan mersin otunun ülkemizde çok kolay yetiştirildiği bilinmektedir.

In vitro'da başlayan bu çalışma *in vivo* aşamaya da geçirilerek ilerletilebilir, sonrasında tedavi amacıyla kullanılabilir. Bu çalışmada ileriki çalışmalar için basamak oluşturmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Debatin, K. (2000). Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol Lett*, 112-113: 41-48
2. Marek, L. (2013). [The role of the apoptosome in the activation of procaspase-9]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 67: 54-64
3. GÜLEŞ, Ö. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*: 73-78
4. DeVita, V. T., Jr. ve Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68: 8643-8653
5. Tretiakova, I., Blaesius, D., Maxia, L., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., Cinatl, J., Jr., Michaelis, M. ve Werz, O. (2008). Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis*, 13: 119-131
6. Aapro, M. (2008). Editorial. Optimizing breast cancer patient care today and tomorrow: implications for clinicians. *Breast Cancer Res Treat*, 112 Suppl 1: 1-3
7. Aapro, M. (2008). Controversies in endocrine treatment: effective utilization of steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors: now and in the future. Forward. *Anticancer Drugs*, 19 Suppl 2: S1
8. Rossi, A., Di Paola, R., Mazzon, E., Genovese, T., Caminiti, R., Bramanti, P., Pergola, C., Koeberle, A., Werz, O., Sautebin, L. ve Cuzzocrea, S. (2009). Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 329: 76-86
9. TOMATIR, A. G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*, : 499-508
10. Porter, A. G. ve Janicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6: 99-104
11. MacManus, J. P. ve Linnik, M. D. (1997). Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 815-832

12. Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. ve Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014: 150845
13. www.genecards.org . 15.12.2011.
14. Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M. ve Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem*, 272: 19641-19644
15. Luo, X. ve Kraus, W. L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev*, 26: 417-432
16. Lyons AS, P. R. (1978). *Medicine: An Illustrated History*. New York: Harry N. Abrams Publishers:
17. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. . Atlanta: American Cancer Society2014.
18. 2012 Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention and Screening, www.cancer.net/patient. 2009, 2012.
19. Cope, D. (2001). Exploring the Relationship Between Cognitive Function and Chemotherapy. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 5: 1
20. Survival Models with Gene Groups as Covariates. 2012.
21. 2005 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. ketem.org/istatistik. 2010.
22. Ozmen, V., Ozcinar, B., Karanlık, H., Cabioglu, N., Tukenmez, M., Disci, R., Ozmen, T., Igcı, A., Muslumanoglu, M., Kecer, M. ve Soran, A. (2009). Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. *World J Surg Oncol*, 7: 37
23. Filazoglu, G. ve Griva, K. (2008). Coping and social support and health related quality of life in women with breast cancer in Turkey. *Psychol Health Med*, 13: 559-573
24. Eisen, A., Lubinski, J., Klijn, J., Moller, P., Lynch, H. T., Offit, K., Weber, B., Rebbeck, T., Neuhausen, S. L., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Gershoni-Baruch, R., Friedman, E., Rennert, G., Wagner, T., Isaacs, C., Kim-Sing, C., Ainsworth, P., Sun, P. ve Narod, S. A. (2005). Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol*, 23: 7491-7496

25. Olson, J. E., Sellers, T. A., Iturria, S. J. ve Hartmann, L. C. (2004). Bilateral oophorectomy and breast cancer risk reduction among women with a family history. *Cancer Detect Prev*, 28: 357-360
26. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*, 360: 187-195
27. Newcomb, P. A., Storer, B. E., Longnecker, M. P., Mittendorf, R., Greenberg, E. R., Clapp, R. W., Burke, K. P., Willett, W. C. ve MacMahon, B. (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, 330: 81-87
28. Lambe, M., Hsieh, C., Trichopoulos, D., Ekbom, A., Pavia, M. ve Adami, H. O. (1994). Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. *N Engl J Med*, 331: 5-9
29. Kelsey, J. L., Gammon, M. D. ve John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*, 15: 36-47
30. McTiernan, A. (2000). Physical activity and the prevention of breast cancer. *Medscape Womens Health*, 5: E1
31. McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams-Campbell, L. L., Woods, N. ve Ockene, J. (2003). Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Jama*, 290: 1331-1336
32. Biglia, N., Defabiani, E., Ponzzone, R., Mariani, L., Marengo, D. ve Sismondi, P. (2004). Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer*, 11: 69-83
33. Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., 3rd ve Visscher, D. W. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 353: 229-237

34. Michels, K. B., Holmberg, L., Bergkvist, L. ve Wolk, A. (2002). Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *Ann Epidemiol*, 12: 21-26
35. Peeters, P. H., Keinan-Boker, L., van der Schouw, Y. T. ve Grobbee, D. E. (2003). Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat*, 77: 171-183
36. Kaye, J. A. ve Jick, H. (2005). Antibiotics and the risk of breast cancer. *Epidemiology*, 16: 688-690
37. Terry, M. B., Gammon, M. D., Zhang, F. F., Tawfik, H., Teitelbaum, S. L., Britton, J. A., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. ve Neugut, A. I. (2004). Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk. *Jama*, 291: 2433-2440
38. Beral, V., Bull, D., Doll, R., Peto, R. ve Reeves, G. (2004). Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83?000 women with breast cancer from 16 countries. *Lancet*, 363: 1007-1016
39. Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E. E., Heath, C. W., Jr., Coates, R. J., Liff, J. M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Morabia, A., Schuman, L., Stewart, W., Szklo, M., Bain, C., Schofield, F., Siskind, V., Band, P., Coldman, A. J., Gallagher, R. P., Hislop, T. G., Yang, P., Kolonel, L. M., Nomura, A. M., Hu, J., Johnson, K. C., Mao, Y., De Sanjose, S., Lee, N., Marchbanks, P., Ory, H. W., Peterson, H. B., Wilson, H. G., Wingo, P. A., Ebeling, K., Kunde, D., Nishan, P., Hopper, J. L., Colditz, G., Gajalanski, V., Martin, N., Pardthaisong, T., Silpisornkosol, S., Theetranont, C., Boosiri, B., Chutivongse, S., Jimakorn, P., Virutamasen, P., Wongsrichanalai, C., Ewertz, M., Adami, H. O., Bergkvist, L., Magnusson, C., Persson, I., Chang-Claude, J., Paul, C., Skegg, D. C., Spears, G. F., Boyle, P., Evstifeeva, T., Daling, J. R., Hutchinson, W. B., Malone, K., Noonan, E. A., Stanford, J. L., Thomas, D. B., Weiss, N. S., White, E., Andrieu, N., Bremond, A., Clavel, F., Gairard, B., Lansac, J., Piana, L., Renaud, R., Izquierdo, A., Viladiu, P., Cuevas, H. R., Ontiveros, P., Palet, A., Salazar, S. B., Aristizabel, N., Cuadros, A., Tryggvadottir, L., Tulinius, H., Bachelot, A., Le, M. G., Peto,

- J., Franceschi, S., Lubin, F., Modan, B., Ron, E., Wax, Y., Friedman, G. D., Hiatt, R. A., Levi, F., Bishop, T., Kosmelj, K., Primic-Zakelj, M., Ravnihar, B., Stare, J., Beeson, W. L., Fraser, G., Bullbrook, R. D., Cuzick, J., Duffy, S. W., Fentiman, I. S., Hayward, J. L., Wang, D. Y., McMichael, A. J., McPherson, K., Hanson, R. L., Leske, M. C., Mahoney, M. C., Nasca, P. C., Varma, A. O., Weinstein, A. L., Moller, T. R., Olsson, H., Ranstam, J., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., Apelo, R. A., Baens, J., de la Cruz, J. R., Javier, B., Lacaya, L. B., Ngelangel, C. A., La Vecchia, C., Negri, E., Marubini, E., Ferraroni, M., Gerber, M., Richardson, S., Segala, C., Gatei, D., Kenya, P., Kungu, A., Mati, J. G., Brinton, L. A., Hoover, R., Schairer, C., Spirtas, R., Lee, H. P., Rookus, M. A., van Leeuwen, F. E., Schoenberg, J. A., McCredie, M., Gammon, M. D., Clarke, E. A., Jones, L., Neil, A., Vessey, M., Yeates, D., Appleby, P., Banks, E., Beral, V., Bull, D., Crossley, B., Goodill, A., Green, J., Hermon, C., Key, T., Langston, N., Lewis, C., Reeves, G., Collins, R., Doll, R., Peto, R., Mabuchi, K., Preston, D., Hannaford, P., Kay, C., Rosero-Bixby, L., Gao, Y. T., Jin, F., Yuan, J. M., Wei, H. Y., Yun, T., Zhiheng, C., Berry, G., Cooper Booth, J., Jelihovsky, T., MacLennan, R., Shearman, R., Wang, Q. S., Baines, C. J., Miller, A. B., Wall, C., Lund, E., Stalsberg, H., Shu, X. O., Zheng, W., Katsouyanni, K., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Dabancens, A., Martinez, L., Molina, R., Salas, O., Alexander, F. E., Anderson, K., Folsom, A. R., Hulka, B. S., Bernstein, L., Enger, S., Haile, R. W., Paganini-Hill, A., Pike, M. C., Ross, R. K., Ursin, G., Yu, M. C., Longnecker, M. P., Newcomb, P., Bergkvist, L., Kalache, A., Farley, T. M., Holck, S. ve Meirik, O. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*, 87: 1234-1245
40. MacMahon, B., Trichopoulos, D., Brown, J., Andersen, A. P., Aoki, K., Cole, P., deWaard, F., Kauraniemi, T., Morgan, R. W., Purde, M., Ravnihar, B., Stromby, N., Westlund, K. ve Woo, N. C. (1982). Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer*, 29: 13-16

41. Hoover, R., Gray, L. A., Sr., Cole, P. ve MacMahon, B. (1976). Menopausal estrogens and breast cancer. *N Engl J Med*, 295: 401-405
42. MacMahon, B., Cole, P., Lin, T. M., Lowe, C. R., Mirra, A. P., Ravnihar, B., Salber, E. J., Valaoras, V. G. ve Yuasa, S. (1970). Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ*, 43: 209-221
43. (1998) Meme Kanseri. Genel Cerrahi.
44. Özışık Y, B. E. Meme kanseri.
45. Thomas, D. B. (1984). Do hormones cause breast cancer? *Cancer*, 53: 595-604
46. Reeves, G. K., Beral, V., Green, J., Gathani, T. ve Bull, D. (2006). Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 7: 910-918
47. Stalsberg, H., Thomas, D. B. ve Noonan, E. A. (1989). Histologic types of breast carcinoma in relation to international variation and breast cancer risk factors. WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Int J Cancer*, 44: 399-409
48. Rohan, T. E., Howe, G. R., Friedenreich, C. M., Jain, M. ve Miller, A. B. (1993). Dietary fiber, vitamins A, C, and E, and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control*, 4: 29-37
49. (2004) Klinik Onkoloji El Kitabı. 1. Baskı. Ankara: PalmeYayıncılık.
50. Baquet, C. R. ve Commiskey, P. (2000). Socioeconomic factors and breast carcinoma in multicultural women. *Cancer*, 88: 1256-1264
51. Manjer, J., Berglund, G., Bondesson, L., Garne, J. P., Janzon, L. ve Malina, J. (2000). Breast cancer incidence in relation to smoking cessation. *Breast Cancer Res Treat*, 61: 121-129
52. Abeloff MD, e. a. (2008) Cancer of the breast. In: Abeloff MD, et al. Abeloff's Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, Pa.: Churchill Livingstone Elsevier.
53. Ganz, P. A. (2010). Quality-of-life issues in patients with ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2010: 218-222
54. Brunaud, L., Roeher, H.-D. ve Simon, D. (2005)Chapter 86 - Neuroendocrine Tumors. In: Kebebew O. H. C.-Y. D., ed. Textbook of Endocrine Surgery (Second Edition). Philadelphia: W.B. Saunders:780-788.

55. Lopez Deogracias, M., Flores Jaime, L., Arias-Camison, I., Zamacola, I., Murillo Guibert, J., Suescun Garcia, R., Querejeta Usabiaga, J. ve Martinez Garcia, F. (2010). Rectal metastasis from lobular breast carcinoma 15 years after primary diagnosis. *Clin Transl Oncol*, 12: 150-153
56. Hanby, A. M. ve Hughes, T. A. (2008). In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. *Histopathology*, 52: 58-66
57. Fisher, B., Land, S., Mamounas, E., Dignam, J., Fisher, E. R. ve Wolmark, N. (2001). Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Semin Oncol*, 28: 400-418
58. Woodward, W. A. ve Cristofanilli, M. (2009). Inflammatory breast cancer. *Semin Radiat Oncol*, 19: 256-265
59. Shikama, N., Sekiguchi, K. ve Nakamura, N. (2011). Management of locoregional recurrence of breast cancer. *Breast Cancer*, 18: 252-258
60. Gonzalez-Angulo, A. M., Morales-Vasquez, F. ve Hortobagyi, G. N. (2007). Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*, 608: 1-22
61. Clayton, F. ve Hopkins, C. L. (1993). Pathologic correlates of prognosis in lymph node-positive breast carcinomas. *Cancer*, 71: 1780-1790
62. Polyak, K. (2002). Breast cancer gene discovery. *Expert Rev Mol Med*, 4: 1-18
63. Albain, K. S., Allred, D. C. ve Clark, G. M. (1994). Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr*: 35-42
64. Spiegel, D. (1997). Psychosocial aspects of breast cancer treatment. *Semin Oncol*, 24: S1-36-s31-47
65. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. ve Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61: 69-90
66. Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*:
67. DeSantis, C., Naishadham, D. ve Jemal, A. (2013). Cancer statistics for African Americans, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63: 151-166

68. (1990). A phase III randomised trial of cisplatin, methotrexate, cisplatin + methotrexate and cisplatin + 5-FU in end stage squamous carcinoma of the head and neck. Liverpool Head and Neck Oncology Group. *Br J Cancer*, 61: 311-315
69. FÇ, Ş. (2006) Baş-Boyun Kanseri. İçinde: Tıbbi Onkoloji. Eds: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara,.
70. Kerstin M Stenson, M. (2014). Epidemiology and risk factors for head and neck cancer
71. Edge, S. B. ve Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17: 1471-1474
72. Inzucchi, S. E. ve Kinder, B. K. (2005)Chapter 87 - Endocrine Emergencies: Hypoglycemic and Hyperglycemic Crises. In: Kebebew O. H. C.-Y. D., ed. Textbook of Endocrine Surgery (Second Edition). Philadelphia: W.B. Saunders:789-799.
73. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. ve Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60: 277-300
74. Cooper, J. S., Porter, K., Mallin, K., Hoffman, H. T., Weber, R. S., Ang, K. K., Gay, E. G. ve Langer, C. J. (2009). National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*, 31: 748-758
75. Lin, C. J., Grandis, J. R., Carey, T. E., Gollin, S. M., Whiteside, T. L., Koch, W. M., Ferris, R. L. ve Lai, S. Y. (2007). Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29: 163-188
76. Posner, M. R., Haddad, R. I., Wirth, L., Norris, C. M., Goguen, L. A., Mahadevan, A., Sullivan, C. ve Tishler, R. B. (2004). Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach. *Semin Oncol*, 31: 778-785
77. Brachman, D. G. (1994). Molecular biology of head and neck cancer. *Semin Oncol*, 21: 320-329
78. Rocco, J. W., Li, D., Liggett, W. H., Jr., Duan, L., Saunders, J. K., Jr., Sidransky, D. ve O'Malley, B. W., Jr. (1998). p16INK4A adenovirus-mediated

- gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 4: 1697-1704
79. Gunduz, M., Ouchida, M., Fukushima, K., Ito, S., Jitsumori, Y., Nakashima, T., Nagai, N., Nishizaki, K. ve Shimizu, K. (2002). Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers. *Oncogene*, 21: 4462-4470
80. Rasanen, K., Virtanen, I., Salmenpera, P., Grenman, R. ve Vaheri, A. (2009). Differences in the nemosis response of normal and cancer-associated fibroblasts from patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 4: e6879
81. Onk), P. D. L. E. K. v. P. D. K. E. R. (2003) Baş-Boyun Kanserleri Editörler
82. İZER, M. (1988). Baharatın izleri, İstanbul, .
83. EROGLU, A. (1980). Şifali Bitkiler ve Tıbb-ı Nebevi, İstanbul,.
84. ÖZÇELİK, H. (1987). Akseki Yöresinde Doğal Olarak Yetişen Bazı Faydalı Bitkilerin Yerel Adları ve Kullanılışları, DOĞA TUBotanik D. . 316-321
85. KARAMANOĞLU, K. (1972). Farmasötik Botanik, A. Ü. Ecz.Fak. Yayınları,.
86. ÖZTÜRK, M. (1970). İzmir Yöresindeki Myrtus Communis, L.'in Eko-fizyolojisi Hakkında Bir İnceleme, Doktora Tezi, E.Ü. Fen Fakültesi, İzmir.
87. Anonim (2011b). <http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxon2011>.
88. Jamoussi, B., Romdhane, M., Abderraba, A., Hassine, ve B.B., G., A.E. (2005.). Effect of Harvest Time on the Yield and Composition of Tunisian Myrtle oils. *Flavour and Fragrance Journal*.
89. Oğur, R. (1994). Mersin Bitkisi (Myrtus communis L.) Hakkında Bir İnceleme. *Çevre Dergisi*. 10,21-25. .
90. Aydın, C., Özcan, M. M. . (2007). Determination of Nutritional and Physical Properties of Myrtle (Myrtus communis L.) Fruits Growing Wild in Turkey. *Journal of Food Engineering* 453-458.

91. Stuart M. (1994,). The Encyclopedia of Herbs and Herbalism, 3rdEdn pp. 52, 136
92. M, N. K. (1989). Indian Materia Medica, 3rd Edn, PopularPrakashan Pvt. Ltd., Bombay, vol. 1, . p. 838
93. Nadkarni K M. (1989). Indian Materia Medica, 3rd Edn, Popular Prakashan Pvt. Ltd., Bombay, vol. 1. p. 838
94. ZI, B. (1999,). Aljameul Mufradat Al-advia-wa- al-Aghzia, Vol. 1, Translated by CCRUM, New Delhi, . pp. 42-47.,
95. Flaminia G, C. P., Morellia I, Maccionib S and Baldini (2004). Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy), Food Chem. 599-604
96. Hayder N, A. A., Kilania S, Ben Ammar R, Mahmoud A and Ghedirab K. (2004). Anti-genotoxic and freeradical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*, Mutat Res. 89-95
97. Serce, S., Ercisli, S., Sengul, M., Gunduz, K. ve Orhan, E. (2010). Antioxidant activities and fatty acid composition of wild grown myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits. *Pharmacogn Mag*, 6: 9-12
98. Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F. F. ve Franconi, F. (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. *Free Radic Res*, 38: 97-103
99. Feisst, C., Franke, L., Appendino, G. ve Werz, O. (2005). Identification of molecular targets of the oligomeric nonprenylated acylphloroglucinols from *Myrtus communis* and their implication as anti-inflammatory compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 389-396
100. A., D. A. M. a. A. (1987). Phenolic compounds of the seeds of *Myrtus communis* L., Plant Med Phytother. 317-322.
101. AKGÜL, A. v. B., A. (1989). Mersin Bitkisi (*Myrtus Communis* L.) Yapraklarının Uçucu Yağ Verimi ve Yağların Bileşimi, DOĞA TU Tar. ve Ö. . 143-147

102. ERLAÇIN, S. v. E., E. (1984). Myrtus Communis L. Yapraklarının Pentasiklik Triterpen Asitleri, Doğa Bilim Dergisi 31-35
103. ERCİYAS, E. (1984). Myrtus Communis L. Gövdesinin PetrolEteri Ekstreleri Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar, Doğa Bilim Dergisi. 337-339
104. HINOÜ, J. e. a. (1989). Polyphenolic Compounds of Myrtus Communis L., Fitoterapia 94
105. AVCI, A. B. (2008). Mersin Bitkisi (Myrtus communis L.)'nde Farklı Hasat Zamanlarının Uçucu Yağ Oranlarına Etkisi.
106. OGUR, I. D. R. (1994). MERSİN BİTKİSİ (Myrtus Communis L.) HAKKINDA BİR İNCELEME.
107. Sumbul, S. (2010). Myrtus communis Linn.:
108. (2000). Anonymous, PDR for Herbal Medicines, 2nd Edn, Medical Economics Company, Montvale, New Jersey, NA536-541
109. ALVVAN, A. H. e. (1989). Inhibition of the Binding of 3HBenzo (a) pyrene to Rat Liver Microsomal Protein by Plant Extracts, Int. J. Crude Drug Res., ; 27 (1). 33-37
110. Mothana, R. A., Kriegisch, S., Harms, M., Wende, K. ve Lindequist, U. (2011). Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities. *Pharm Biol*, 49: 200-210
111. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257
112. Altunkaynak BZ, Ö. E. (2008). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araş Derg. . 93-104
113. Samali, A., Gorman, A. M. ve Cotter, T. G. (1996). Apoptosis -- the story so far. *Experientia*, 52: 933-941
114. Barr, P. J. ve Tomei, L. D. (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*, 12: 487-493

115. Searle, J., Collins, D. J., Harmon, B. ve Kerr, J. F. (1973). The spontaneous occurrence of apoptosis in squamous carcinomas of the uterine cervix. *Pathology*, 5: 163-169
116. Odaka, C. ve Ucker, D. S. (1996). Apoptotic morphology reflects mitotic-like aspects of physiological cell death and is independent of genome digestion. *Microsc Res Tech*, 34: 267-271
117. Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C. ve Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13: 18-54
118. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. ve Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 14: 44-55
119. Khosravi-Far, R. ve Esposti, M. D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*, 3: 1051-1057
120. Schultz, D. R. ve Harrington, W. J., Jr. (2003). Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*, 32: 345-369
121. Lorenzo, P. I., Arnoldussen, Y. J. ve Saatcioglu, F. (2007). Molecular mechanisms of apoptosis in prostate cancer. *Crit Rev Oncog*, 13: 1-38
122. Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365
123. Kaneda, K., Kashii, S., Kurosawa, T., Kaneko, S., Akaike, A., Honda, Y., Minami, M. ve Satoh, M. (1999). Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Res*, 815: 11-20
124. A.G., T. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri*: 499-508
125. A., R. Weinberg The Biology of Cancer Second Edition, . 369
126. F, Ö. (2002). Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2). 143-148
127. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. ve Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75: 641-652
128. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. ve et al.

- (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376: 37-43
129. Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449
130. Zhivotovsky, B., Burgess, D. H. ve Orrenius, S. (1996). Proteases in apoptosis. *Experientia*, 52: 968-978
131. Mountz, J. D., Zhou, T., Su, X., Wu, J. ve Cheng, J. (1996). The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol*, 80: S2-14
132. Tanaka, Y., Yoshihara, K., Itaya, A., Kamiya, T. ve Koide, S. S. (1984). Mechanism of the inhibition of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J Biol Chem*, 259: 6579-6585
133. (2005)Index. In: Kebebew O. H. C.-Y. D., ed. Textbook of Endocrine Surgery (Second Edition). Philadelphia: W.B. Saunders:807-828.
134. (2005)Copyright. In: Kebebew O. H. C.-Y. D., ed. Textbook of Endocrine Surgery (Second Edition). Philadelphia: W.B. Saunders:iii.
135. Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. ve Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273: 9357-9360
136. Wang, R., Wang, X., Li, B., Lin, F., Dong, K., Gao, P. ve Zhang, H. Z. (2009). Tumor-specific adenovirus-mediated PUMA gene transfer using the survivin promoter enhances radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat*, 117: 45-54
137. Meert, A. P., Berghmans, T. ve Sculier, J. P. (2014). [The patient with lung cancer in intensive care.]. *Rev Mal Respir*, 31: 961-974
138. V, Ö. (2008) Dünya’da ve Türkiye’de meme kanseri. Meme Sağlığı Dergisi
139. Mendenhall, W. M., Mancuso, A. A., Amdur, R. J., Stringer, S. P., Villaret, D. B. ve Cassisi, N. J. (2001). Squamous cell carcinoma metastatic to the neck from an unknown head and neck primary site. *Am J Otolaryngol*, 22: 261-267
140. Reed, J. C. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*, 3: 17-22

141. Lyseng-Williamson, K. A. ve Fenton, C. (2005). Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs*, 65: 2513-2531
142. Gianni, L., Pienkowski, T., Im, Y. H., Roman, L., Tseng, L. M., Liu, M. C., Lluch, A., Staroslawska, E., de la Haba-Rodriguez, J., Im, S. A., Pedrini, J. L., Poirier, B., Morandi, P., Semiglazov, V., Srimuninnimit, V., Bianchi, G., Szado, T., Ratnayake, J., Ross, G. ve Valagussa, P. (2012). Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 13: 25-32
143. Li, F., Zhao, C. ve Wang, L. (2014). Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: developments and potentials. *Int J Cancer*, 134: 1257-1269
144. Parasuraman, S., Thing, G. S. ve Dhanaraj, S. A. (2014). Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. *Pharmacogn Rev*, 8: 73-80
145. Faydaoğlu, E. v. S., M.S. . (2011).
146. J e l e n a D. H r u b i k , S. o. n. j. a. N. K. a. i. š. a. r. e. v. i. ć. ve ć, a. n. d. R. a. d. m. i. l. a. Z. K. o. v. a. č. e. v. i. (2012). Myrtus communis and Eucalyptus camaldulensiscytotoxicity on breast cancer cells.
147. Staley, K., Blaschke, A. J. ve Chun, J. (1997). Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semi-quantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death Differ*, 4: 66-75