

**BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTİOKSİDATİF,
GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet SARIMAHMUT



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTIOKSİDATİF, GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK
ve APOPTOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet SARIMAHMUT

Doç. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2016

TEZ ONAYI

Mehmet Sarımahmut tarafından hazırlanan “Bazı Bitki Türlerinin Antioksidatif, Genotoksik, Sitotoksik ve Apoptotik Özelliklerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları

Başkan:	Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof. Dr. Engin Ulukaya Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Prof. Dr. Gürcan Güleriyüz Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Doç. Dr. Azmi Yerlikaya Dumlupınar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	İmza
Üye:	Doç. Dr. Elif İlkay Armutak İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
.../.../2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- 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.

.. /.. /2016

İmza

Mehmet Sarımahmut

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN ANTIOKSİDATİF, GENOTOKSİK, SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehmet SARIMAHMUT

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serap Çelikler KASIMOĞULLARI

Ülkemizde ve dünyada başlıca halk sağlığı sorunlarından biri olan meme kanseri, kadınlarda görölme sıklığı en yüksek olan kanser tipidir. Günümüzde, meme kanseri tedavisinde ancak kısmî bir başarı yakalandığı söylenebilir. Kanser ilaç tedavilerinde bitki kökenli moleküllerin payı yüksektir. Bu nedenle, yeni ve etkili moleküllerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada Uludağ Milli Parkı'ndan toplanan ve bazıları endemik olan 12 bitki türünden 13 ekstrakt hazırlanmıştır. Bu ekstraktların kanser hücre soylarında hücre büyümesini baskılayıcı etkileri araştırılmış ve görece etkili olan bitki ekstraktlarının genotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, bütün ekstraktların antioksidan kapasiteleri de çalışılmıştır.

Deneylerde insan MCF-7, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve MCF-10A malignan olmayan meme hücre soyları kullanılmıştır. Ekstraktların hücre canlılığı üzerine olan etkileri 48 saatlik uygulama sonrası sulforodamin B hücre canlılık testiyle belirlenmiştir. En yüksek aktivite gösteren *Achillea multifida* ve *Astragalus sibthorpius* ekstraktlarının etkileri sonraki aşamada ATP testiyle doğrulanmıştır. *A. multifida* ekstraktının IC₅₀ değeri MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde sırasıyla 69,34, 62,18 ve 61,30 µg/ml olarak belirlenmiştir. *A. sibthorpius* ekstraktının IC₅₀ değeri MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde sırasıyla 30,41, 44,75 ve 158,94 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ekstraktların apoptotik etkilerini tespit etmek için Hoechst 33342 ve propidyum iyodür boyama yöntemi kullanılmıştır. Her iki ekstraktta da MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 50 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda sekonder nekrotik hücreler ağırlıkta olmak üzere piknotik nükleus görünümüyle karakterize apoptotik hücreler gözlemlenmiştir. *A. multifida* ekstraktının IC₅₀ dozunda zamana bağımlı olarak MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde DNA hasarını artırdığı ve MCF-10A hücrelerinin *A. sibthorpius* ekstraktıyla indüklenen DNA hasarını kısmen tamir ettiği ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, aynı konsantrasyonda *A. sibthorpius* ekstraktı MCF-10A hücrelerinde mikronükleus oluşumuna neden olmuştur. Muhtemel nükleus anomalilerini saptamak için *A. multifida* uygulaması yapılmış hücrelerde hematoksilen boyama gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde, hücre ölümünü indükleyen dozların altında, özellikle 12,5 µg/ml konsantrasyonda hücrelerin yaklaşık %20'sinde multinükleasyon görülmüştür. Son olarak, 13 ekstraktın antioksidan kapasiteleri DPPH ve CUPRAC testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. *A. sibthorpius* ekstraktının kayda değer bir antioksidan kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, *Tripleurospermum pichleri* ve *Papaver pilosum* ekstraktları kısıtlı antioksidan aktivite göstermişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında *A. sibthorpius* ekstraktının meme kanser hücrelerine seçici sitotoksik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. MCF-10A hücrelerinin *A. sibthorpius* ekstrakt uygulaması sonrasında DNA tamiri gerçekleştirilebilmesi, *A. sibthorpius* ekstraktının sahip olduğu yüksek antioksidan kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. *A. multifida* ekstraktı ise görece düşük dozlarda multinükleasyona, yüksek dozlarda ise apoptoze yol açarak doza bağımlı bir etki profili göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sitotoksisite, genotoksisite, antikanser, tarama çalışması, *Achillea multifida*, *Astragalus sibthorpius*

2016, xii + 138 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION of ANTIOXIDATIVE, GENOTOXIC, CYTOTOXIC and APOPTOTIC PROPERTIES of SOME PLANT SPECIES

Mehmet SARIMAHMUT

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serap Çelikler KASIMOĞULLARI

Breast cancer, which has been an important public health problem in our country and over the world, is the most frequently seen cancer type among women. Today only a partial success was reached in the breast cancer therapy. The ratio of molecules with plant origin is high in cancer chemotherapy. Therefore, discovery of novel and effective molecules is needed. To this end, 13 extracts were prepared from 12 plants collected from Uludag National Park. Growth inhibitory effects of these extracts were investigated on cancer cell lines and genotoxic and apoptotic effects of relatively effective extracts were determined. Furthermore, antioxidant capacity of all extracts were studied.

MCF-7, MDA-MB-231 human breast cancer cells and non-malignant MCF-10A cells with breast origin were used in this study. The effect of the extracts on cell viability was determined by using sulforhodamine B cell viability assay following 48 hour treatment. Activities of the most effective *Achillea multifida* and *Astragalus sibthorpius* extracts were confirmed by the ATP assay. The IC₅₀ value of *A. multifida* extract against MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells were determined as 69,34, 62,18 and 61,30 µg/ml respectively. The IC₅₀ value of *A. sibthorpius* extract against MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A cells were determined as 30,41, 44,75 and 158,94 µg/ml respectively. The cells were stained with Hoechst 33342 and propidium iodide to determine the apoptotic effects of the extracts. Mostly secondary necrotic and in part early apoptotic cells characterized with pyknotic nuclei were observed at 50 µg/ml and higher concentrations in MCF-7 and MDA-MB-231 with both extracts. It was revealed that *A. multifida* extract increased DNA damage in MCF-7 and MCF-10A cells in a time-dependent manner and MCF-10A cells partially repaired the DNA damage induced by *A. sibthorpius* extract. However, *A. sibthorpius* extract caused micronucleus formation at the same concentration in MCF-10A cells. *A. multifida* extract treated cells were stained with haematoxylin to detect possible nuclear abnormalities. Multinucleated cells were observed in approximately 20% MDA-MB-231 and MCF-10A cells at sublethal doses and especially at 12,5 µg/ml concentration. Lastly, the antioxidant capacity of the 13 extracts were evaluated by implementing DPPH and CUPRAC assays. *A. sibthorpius* was determined to have a considerable antioxidant activity. In addition, *Tripleurospermum pichleri* ve *Papaver pilosum* extracts also showed a limited antioxidant activity.

In conclusion, *A. sibthorpius* extract demonstrated selective cytotoxicity against breast cancer cell lines. The occurrence of DNA repair in MCF-10A cell line after *A. sibthorpius* extract treatment was linked with high antioxidant capacity of this extract. *A. multifida* extract exhibited a dose-dependent cytotoxicity profile by causing multinucleation at relatively lower doses and inducing apoptosis at higher doses.

Keywords: Cytotoxicity, genotoxicity, anticancer, screening study, *Achillea multifida*, *Astragalus sibthorpius*

2016, xii + 138 pages

TEŞEKKÜR

Bu meşakkatli tez çalışmasını gerçekleştirirken bana destek olan ve doktora öğrenciliğim sürecinde üzerimde büyük emekleri olan danışmanım Doç. Dr. Serap Çelikler Kasımoğulları'na ve Prof. Dr. Engin Ulukaya'ya ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, böyle bir tezin gerçekleşmesinde temel rolü olan Prof. Dr. Gürcan Güleryüz'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında laboratuvar malzemelerinin temini, geri dönüşümü ve diğer birçok temel laboratuvar ihtiyaçlarıyla ilgilenerek çalışmalarına destek olan arkadaşlarım, özellikle de Sezin Bozdemir'e ve birlikte çalışmalar yürüttüğümüz hocalarım Doç. Dr. Ferda Arı ve Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe Oral'a teşekkür ederim. Son olarak sürekli destekleri ve gösterdikleri sabır için aileme ve nişanlım İrem Yıldız'er'e müteşekkirim.

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi (HDP(F) – 2013/28) ve Bursa Büyükşehir Belediyesi arasında yapılan ikili işbirliği protokolü kapsamında Bursa Büyükşehir Belediyesi tarafından desteklenmiştir (16.12.2013 tarihli ve 38506184-020-192599 sayılı karar).

Mehmet Sarımahmut
.. /.. /2016

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
5-FU	5-florourasil
Abs	Absorbans
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptozis indükleyici faktör
AMP	Adenozin monofosfat
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenozin trifosfat
Boiss.	Pierre Edmond Boissier (1810–1885)
Bornm.	Joseph Friedrich Nicolaus Bornmüller (1862–1948)
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2	Breast cancer type 2 susceptibility protein
CD95	Cluster of Differentiation 95
CDDP	Sisplatin
cFLIP	FLICE-like inhibitory protein
cIAPs	Apoptozis inhibitör proteinler
CUPRAC	Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity
dATP	Deoksiriboadenozin trifosfat
DC	Augustin Pyramus de Candolle (1778–1841)
DD	Death Domain
DMEM	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DR4	TRAIL reseptör 1
DR5	TRAIL reseptör 2
EC ₅₀	% 50 etkili konsantrasyon
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrojen reseptörü
ET	Neoadjuvan epirubisin/dosetaksel kemoterapisi
FADD	Fas Associated Death Domain
FBS	Fetal Bovine Serum
GHİ	Genetik Hasar İndeksi
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HHY	Hasarlı Hücre Yüzdesi
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	% 50 inhibe edici konsantrasyon
IL	İnterlökin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
M.Ö.	Milattan Önce
MN	Mikronükleus
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NCI	National Cancer Institute
NDI	Nükleus Bölünme İndeksi
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ÖBA	Önemli Bitki Alanı
PARP1	Poli-ADP Riboz Polimeraz 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Propidyum iyodür
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz
PPi	İnorganik fosfat
PR	Progesteron reseptörü
RIP1	Reseptör-ilışkili protein kinaz 1
RLU	Relative Light Unit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI	Roswell Park Medical Institute
Sibth.	John Sibthorp (1758–1796)
Sm.	James Edward Smith (1759–1828)
SRB	Sulforodamin B
subsp.	subspecies
TCA	Trikloro asetik asit
TNFR1	TNF α reseptör 1
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İçsel ve dışsal yolağın moleküler mekanizmaları (Hengartner 2000)	11
Şekil 2.2. Otofajide otofagozom ve otolizozom oluşumu (Fleming ve ark. 2011).....	13
Şekil 2.3. Nekroptosis yolağı ve apoptotik yolak ile ilişkisi (Radogna ve ark. 2015)....	14
Şekil 2.4. Anormal mitoz bölünmeyle oluşan mitotik felaket ve muhtemel sonuçları (Galluzzi ve ark. 2012).....	15
Şekil 3.1. Komet testiyle mikroskopik inceleme sonucu karşılaşılan hasar tipleri: (A) Tip 0, (B) Tip 1, (C) Tip 2, (D) Tip 3, (E) Tip 4. Hasarsız hücreler Tip 0 olarak tanımlanır. İsimlendirme DNA hasarının artmasıyla birlikte Tip 1'den Tip 4'e devam eder.....	44
Şekil 3.2. MN yapılarının farklı şematik görünüşleri (Fenech 2000).....	46
Şekil 3.3. Sitokalazin B ile bloklanmış hücre bölünmesi. Mo: mononükleer, Bi: binükleer, Tr: trinükleer, Te: tetranükleer hücre (400×)	47
Şekil 4.1. <i>H. humile</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	53
Şekil 4.2. <i>O. caespitosum</i> toprak altı kısımları ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	54
Şekil 4.3. <i>O. caespitosum</i> toprak üstü kısımları ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	54
Şekil 4.4. <i>A. multifida</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi.....	55
Şekil 4.5. <i>C. drabifolia</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	55
Şekil 4.6. <i>D. bithynicum</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	56
Şekil 4.7. <i>S. olympicus</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	56
Şekil 4.8. <i>T. pichleri</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.9. <i>G. olympica</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	57
Şekil 4.10. <i>E. campylopoda</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi.....	58
Şekil 4.11. <i>A. sibthorpius</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	58
Şekil 4.12. <i>P. pilosum</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	59
Şekil 4.13. <i>D. oleoides</i> ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi	60
Şekil 4.14. Paklitakselin SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.15. <i>A. multifida</i> ekstraktının ATP testi ile % canlılık üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.16. <i>A. sibthorpius</i> ekstraktının ATP testi ile % canlılık üzerine etkisi	62
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerinde <i>A. multifida</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	65

Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerinde <i>A. sibthorpianus</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	67
Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücrelerinde <i>A. multifida</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	69
Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücrelerinde <i>A. sibthorpianus</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	71
Şekil 4.21. MCF-10A hücrelerinde <i>A. multifida</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	73
Şekil 4.22. MCF-10A hücrelerinde <i>A. sibthorpianus</i> ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)	75
Şekil 4.23. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozuyla MCF-7 hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, **; p<0,005, ***; p<0,0001	78
Şekil 4.24. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozuyla MDA-MB-231 hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, ***; p<0,0001	80
Şekil 4.25. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozuyla MCF-10A hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, ***; p<0,0001	82
Şekil 4.26. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte komet uzunluğu üzerine etkileri	84
Şekil 4.27. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kuyruk uzunluğu üzerine etkileri.....	84
Şekil 4.28. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kuyruk % DNA üzerine etkileri	85
Şekil 4.29. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kafa % DNA üzerine etkileri	85
Şekil 4.30. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte Olive kuyruk momenti üzerine etkileri	86
Şekil 4.31. <i>A. sibthorpianus</i> ekstrakt uygulaması sonucunda oluşan MN ve Nbud. Beyaz →: MN, turuncu →: nükleus tomurcuğu (400×)	90
Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinde <i>A. multifida</i> uygulaması sonrası hematoksilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×)	93
Şekil 4.33. MDA-MB-231 hücrelerinde <i>A. multifida</i> uygulaması sonrası hematoksilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ►: nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×)	96

Şekil 4.34. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoksilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ◆ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ►: nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), > : nükleer fragmentasyon (beyaz), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×).....98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre soyları arasındaki farklar....	9
Çizelge 2.2. Tez konusu oluşturan bitki türleri ve endemizm durumları.....	21
Çizelge 3.1. Toplanan bitkilerin türleri, toplandıkları bölge, toplanan kısımları ve elde edilen kuru ağırlıklar	34
Çizelge 3.2. Bitkilerden ekstrakt eldesinde işlem sıralarına göre kullanılan çözügenler ve ekstraksiyon süreleri.....	35
Çizelge 4.1. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> 'un SRB testine göre hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	61
Çizelge 4.2. <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> 'un ATP testine göre hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	63
Çizelge 4.3. MCF-7 hücrelerinde <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma)	87
Çizelge 4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma).....	87
Çizelge 4.5. MCF-10A hücrelerinde <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma) .	88
Çizelge 4.6. Hücre soylarında <i>A. multifida</i> , <i>A. sibthorpianus</i> ekstraktlarının IC ₅₀ dozunda komet parametreleri üzerine etkileri (ortalama ± standart hata)..	89
Çizelge 4.7. IC ₅₀ dozunda <i>A. sibthorpianus</i> ekstrakt uygulaması sonrası MN testi (ortalama ± standart sapma)	91
Çizelge 4.8. <i>A. multifida</i> uygulaması sonrası hematoksilen boyamayla mitotik figür yüzdeleri ve nükleus anomalileri.....	100
Çizelge 4.9. Ekstrakt ve referans maddelerin DPPH testiyle belirlenmiş antioksidan kapasiteleri	101
Çizelge 4.10. Ekstrakt ve referans maddelerin CUPRAC testiyle belirlenmiş antioksidan kapasiteleri	102

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1 Meme Kanseri.....	6
2.2. Meme Kanserinde Tedavi	7
2.3 Hücre Ölüm Yolakları	9
2.3.1 Apoptozis.....	9
2.3.2 Otofaji	11
2.3.3. Nekrozis ve Nekroptozis (Programlı nekrozis).....	13
2.3.4 Mitotik Felaket (“Catastrophe”)	15
2.4 Hücre Ölümü, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Sistemler	16
2.5. Tez Konusu Oluşturan Bitkilere Ait Genel Bilgi	17
2.5.1 <i>Heracleum humile</i> Sm. (Apiaceae)	17
2.5.2 <i>Olymposciadium caespitosum</i> (Sm.) Wolff (Apiaceae).....	17
2.5.3 <i>Achillea multifida</i> (DC) Boiss. (Asteraceae)	18
2.5.4 <i>Centaurea drabifolia</i> Sm. subsp. <i>drabifolia</i> (Asteraceae)	18
2.5.5 <i>Doronicum bithynicum</i> J.R. Edmondson subsp. <i>bithynicum</i> (Asteraceae)	18
2.5.6 <i>Senecio olympicus</i> Boiss. (Asteraceae)	19
2.5.7 <i>Tripleurospermum pichleri</i> (Boiss.) Bornm. (Asteraceae)	19
2.5.8 <i>Gypsophylla olympica</i> Boiss. (Caryophyllaceae)	19
2.5.9 <i>Ephedra campylopoda</i> C. A. Meyer (Ephedraceae)	19
2.5.10 <i>Astragalus sibthorpianus</i> Boiss. (Fabaceae).....	20
2.5.11 <i>Papaver pilosum</i> Sibth & Sm (Papaveraceae).....	20
2.5.12 <i>Daphne oleoides</i> Schreber (Thymelaeaceae).....	20
2.6 Uludağ Milli Parkı'nda Bulunan Bazı Bitki Familyalarını İçeren Sitotoksik, Genotoksik/Antigenotoksik ve Antioksidatif Çalışmalar	21
2.6.1 Apiaceae (Umbelliferae)	21
2.6.2 Asteraceae	22

2.6.3 Caryophyllaceae	25
2.6.4 Ephedraceae	26
2.6.5 Fabaceae (Leguminosae)	27
2.6.6 Papaveraceae	31
2.6.7 Thymelaeaceae.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1. Bitkilerin Toplanması ve Liyofilizasyonu	33
3.1.1 Arazi çalışmaları	33
3.1.2 Bitkilerin Ekstraksiyonu ve Liyofilizasyonu	34
3.2 Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması ve Kansere Hücrelerinin Üretilmesi.....	36
3.2.1 Besiyeri Değişimi ve Hücre Soylarının Pasajlanması	36
3.2.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi.....	37
3.2.3 Hücre Sayımı	37
3.2.4 Ekstrakt Çözeltilerinin Hazırlanması ve Saklanması.....	38
3.3 Hücre Canlılık Testleri	38
3.3.1 Sulforodamin B Testi	38
3.3.2 ATP Hücre Canlılık Testi.....	39
3.4 İkili Boyamayla Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi.....	41
3.5 Genetik Toksikoloji Test Sistemleri	42
3.5.1 Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	42
3.5.2 Mikronükleus (MN) Testi.....	45
3.6 Hematoksilen Boyama	48
3.7 Antioksidan Kapasiteyi Belirlemeye Yönelik Testler	49
3.7.1 DPPH Testi	49
3.7.2 CUPRAC Testi	51
3.8. İstatistikî Analiz	52
4. BULGULAR.....	53
4.1 Sulforodamin B Testiyle Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Taranması.....	53
4.2 ATP Testiyle <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpius</i> Ekstraktlarının Sitotoksik Aktivitelerinin Doğrulanması	61
4.3 İkili Boyama Yöntemiyle <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpius</i> Ekstraktlarının Apoptotik Etkilerinin Araştırılması	63
4.4 <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpius</i> Ekstraktlarının DNA Hasarı İndükleyici Etkileri.....	77
4.5 <i>A. multifida</i> ve <i>A. sibthorpius</i> Ekstraktlarının Kromozom Hasarı, Multinükleasyonu İndüklemeye ve Hücre Bölünme İndeksi Üzerine Etkileri	90
4.6 Ekstraktların Antioksidan Kapasitelerinin Tayini.....	101

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	103
KAYNAKLAR	112
EKLER.....	134
ÖZGEÇMİŞ.....	137

1. GİRİŞ

Kanser ülkemizde ve dünyada en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Sebebi bilinen ölüm nedenleri sıralandığında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanser, tüm ölümlerin %13'ünden sorumludur (Anonim 2013). Dünya Sağlık Örgütü'nün (Anonim 2013) verilerine göre 2012 yılında tüm Dünyada 14,1 milyon insana kanser tanısı konmuş ve aynı yıl 8,2 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Kanserinin gelişiminde, endojen kaynaklı (Oksidatif metabolizma, DNA'nın kendiliğinden değişimi vs.), eksojen kaynaklı (iyonize veya ultraviyole radyasyon, 4000 kadar kimyasal madde karışımını içeren tütün veya tütün ürünleri, insan yapımı kimyasallar, kemoterapötik ilaçlar, trafik, çevre kirliliği ajanları vs.) ajanların oluşturdukları mutasyonlar ve bu mutasyonların onarılamaması önemli rol oynar.

Kanser, hem tedavisinin son derece masraflı olması hem de ölümcül seyreden bir hastalık olması nedeniyle, gerek ülke bütçeleri gerekse toplum sağlığı üzerinde büyük öneme sahiptir. Sebebi bilinen ölümler sıralamasında kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada bulunan kanser, tedavi sürecinin uzun ve maliyetinin yüksek olması nedeni ile ülke ekonomileri üzerinde dramatik şekilde artan bir yüke neden olmaktadır. Ayrıca, birçok hastalıkta ve kanserde geleneksel tedavilerdeki başarıyı arttırmak, özellikle kemoterapide istenmeyen sonuçları ortadan kaldırmak amacıyla bazı ilaçlar geliştirilmekte veya tedaviye destek amacıyla birçok bitkisel preparat halk arasında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kanser hastalarının çoğunda destekleyici ve geleneksel tıptan köken alan bitkilerin ve bitki kökenli bileşiklerin kanser hastalarında kemoterapi ve radyoterapiye cevabı arttırmak ve vücut direncini yükseltmek amacıyla araştırılması ve denenmesi dünyada giderek artan bir önem kazanmaktadır. Bitkisel destek alımının sebepleri arasında; yeterli düzeyde bir kimya endüstrisine sahip olmayan gelişmekte olan ülkelerin bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı elde etmek istemeleri, tedavi alanına sokulan yeni sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler ve bitkisel ilaçların sentetik bileşiklere göre birkaç etkiye birden sahip olmaları sayılabilir.

Günümüzde pek çok farklı rahatsızlığa karşı kullanılan ilaçların içerdiği etken maddeler, doğal kökenlidir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (The United States National Cancer Institute)'nün 50 yılı aşkın bir zamandır desteklediği çalışmalarda doğal veya sentetik 500 000'den fazla kimyasal, antitümör aktivitesi

açısından test edilmiştir (Anonim 2015). Yapılan bir araştırmada, 1940-2010 tarihleri arasında çıkan antikanser ilaçlar analiz edilmiş; 175 küçük molekülün % 74,8'inin sentetik olmadığı, hatta % 48'lik bir dilimin doğal molekülün kendisi veya doğrudan türevi olduğu belirlenmiştir (Newman ve Cragg 2012).

Gotti'ye (2011) göre, son yıllarda biyoaktif fitokimyasallara artan ilgi, belli başlı bazı sebeplere dayanmaktadır: Öncelikle bitkiler neredeyse sonsuz sayıda molekülle çalışma imkanı sunmaktadır. Bunun yanında, böylesine sınırsız kimyasal içerik, çalışmanın toplam maliyetinin de kimyasal sentezle elde edilen maddelere göre daha düşük olmasını sağlamaktadır. Tek bir bitki türünde bile oldukça yüksek çeşitlilikte fitokimyasal bileşik bulunması ve genel olarak bu moleküllerin ancak düşük bir oranının biyomedikal uygulamalar için çalışılmış olması, bitkiler üzerinde bu tip çalışmalar yapmayı çekici kılan özelliklerden biridir.

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı, yazılı kaynaklarda M.Ö. 2600 yıllarına, Mezopotamya'ya ve Mısır'a kadar gitmektedir (Cragg ve Newman, 2005). Cragg ve Newman'a (2005) göre, yeni ilaç "lead" moleküllerinin geliştirilmesinde biyoçeşitlilik kilit bir roledir. Bitki biyoçeşitliliği, diyabetten kardiyovasküler hastalıklara, merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarından mikrobiyal hastalıklara ve AIDS'ten kansere kadar pek çok alanda geliştirilen tedavilerde önemli bir pay sahibidir (Gurib-Fakim, 2006). Türkiye bitki çeşitliliği açısından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir ve alternatif tedavide kullanılabilecek bitkiler açısından büyük bir potansiyele sahiptir (Ekim ve ark. 2000). Avrupa'da toplam 12 500 açık ve kapalı tohumlu bitki türüne karşılık, Türkiye'de yaklaşık 9 200 tanımlanmış tür bulunmakta, tür ve türaltı takson sayısı ise 11 000'e ulaşmaktadır. Bu değerler karşılaştırıldığında Türkiye'nin bitki çeşitliliği açısından bir kıta özelliği gösterdiği görülebilir. Bunun yanında Türkiye'deki endemizm oranı % 34'tür (Anonim 2008). Uludağ, çok sayıda endemik tür barındıran florası ile çok iyi farklılaşmış vejetasyon tipleri içermesi ve çeşitli jeolojik koşullarından dolayı Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanından (ÖBA) biridir (Güleryüz ve ark. 2005). Bu zenginliğimizden yararlanmak için bitkilerin yarar ve işlevleriyle ilgili çalışmalara gereksinim vardır. Örneğin, yüksek antioksidatif aktivite gösteren tıbbi bitkilerin dünyada dağılımı değerlendirildiğinde; yapılan bir sıralamaya göre Türkiye'nin, Hindistan ve Çin'in ardından antioksidan kapasitesi yüksek bitkileri bulundurması açısından üçüncü sırada olduğu gözlenmiştir (Krishnaiah 2011).

Biyoaktif fitokimyasalların taranması konusunda bazı özellikler öne çıkmaktadır. Örneğin, antikanser ajanların keşfine yönelik araştırmalarda tropikal yağmur ormanları iki özelliğinden dolayı önde gelmektedirler. Bunlardan birincisi, yağmur ormanlarının yüksek biyoçeşitliliğe sahip olması ve bunlardan bazılarında 0,5 km²'lik alanda Kuzey Amerika'nın tamamından fazla farklı türü barındırmasıdır. Diğerisi ise bu bölgelerde bazı türlerin neslinin yakın zamanda tükenme tehlikesi ve doğal ilaç keşfi konusunda araştırılacak tür sayısının azalması yönündeki haklı endişelerdir (Gurib-Fakim 2006).

Günümüzde, doğal ürünleri yeniden keşfetme yönünde artan bir ilgi vardır. “En çok satan ilaç moleküllerinden statin grubu, bütün anjiyotensin antagonistleri ve anjiyotensin-dönüştürücü-enzim inhibitörleri, immün baskılayıcıların tümü ve birçok antikanser ve antibakteriyel ilaçlar bitki kökenlidir” denmektedir (Cragg ve Newman 2005). Ancak, ilaçların ticari olarak üretiminde bitkilerin, özellikle de köklerin ve ağaç kabuğu gibi kısımların bilinçsiz ve kötü kullanımı 4 000 - 10 000 türün neslinin tükenmesi tehlikesiyle karşı karşıya bırakmıştır (Ramawat ve ark. 2010). Paul Alan Cox (2000), yakın bir gelecekte bitki türlerinin % 12,5'inin soyunun tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olduğunu ve bunların içerisinde henüz keşfedilmemiş ve çalışılmamış birçok tür olduğunu söylemektedir. Bu yüzden birçok tür, insanlığa katkısı anlamında barındırdığı değer henüz anlaşılmadan nesli tükenmektedir.

Son dönemlerde farklı materyaller kullanılarak yapılan antigenotoksisite ve sitotoksisite çalışmaları oldukça popüler hale gelmiştir. Buna yönelik olarak literatürde birçok değişik bitkisel/hayvansal ekstraktların kullanılması dikkat çekicidir. Sitotoksik veya genotoksik/antigenotoksik etkiye sahip olduğu belirlenen bitkisel kaynaklarda bu biyolojik aktiviteden sorumlu etken maddenin/maddelerin karakterizasyonu ve izolasyonu önemlidir.

Sekonder metabolitler, bitkilerin metabolizması sonucu oluşan organik moleküllerdir. Küçük molekül yapılı sekonder metabolitler; alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler içerisinde yer almaktadır. Şu ana kadar 150'den fazla bitki familyasında 12 000'den fazla alkaloid tespit edilmiştir (Ramawat ve ark. 2010). Önemli miktarlarda alkaloid içeren bitki familyaları Fabaceae, Papaveraceae, Apocynaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae familyalarıdır (Ramawat ve ark. 2010). Alkaloidlerin günlük olarak tüketilen kafein, analjezik olan morfin ve kodein, kas gevşetici tübokürarin, antikanser ajanı vinblastin ve gut tedavisinde kullanılan kolşisin gibi

üyeleri vardır (Ramawat ve ark. 2010). Fenolik bileşikler, içerisinde flavonoid ve izoflavonoid gibi grupları barındırır. Flavonoidler genel olarak bütün bitki türlerinde bulunmakla beraber, “chalcone”, flavon, flavonol, flavanon, antosiyanin ve izoflavon gibi sınıflara ayrılmıştır. İzoflavonoidlerin dağılımı ise daha çok Fabaceae familyasıyla sınırlıdır ve bu gruptaki biyolojik olarak aktif bileşikler fitoöstrojen, antimikrobiyal veya insektisit etki gösterebilirler. İzoflavon bileşikler fitoöstrojen, antianjiyogenik, antioksidan ve antikanser özellik gösterebilirler (Ramawat ve ark. 2010). Antioksidatif etki gösteren, resveratrol ise kemo-koruyucu etkisi olduğu bilinen fenolik bileşiklere bir örnektir (Scott ve ark. 2012). Bitkiler arasında en yüksek çeşitlilik terpen gruplarındadır. Şu ana kadar belirlenen 30 000'den fazla terpen bileşiği, monoterpen, seskiterpen, diterpen, triterpen ve tetraterpen grupları altında bulunmaktadır. Ayrıca; bitkisel steroidler, saponinler ve kalp glikozitleri triterpen gruplarından üretilirler. Taksan grubu bileşiklerin (diterpen) de dahil olduğu terpen bileşiklerinin bütün gruplarında antitümör etki gösteren pek çok bileşik tespit edilmiştir (Salminen ve ark. 2008, Ramawat ve ark. 2010).

Kanser tedavisinde kullanılan bitki kaynaklı moleküllerin bir çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir. Madagaskar menekşesi (Madagascar periwinkle), *Catharanthus roseus*, vinblastin ve vinkristin gibi çocukluk çağı lösemisi, Hodgkin lenfoma ve meme kanseri tedavisinde kullanılan iki alkaloid antikanser ajanının elde edildiği bitkidir. Ek olarak, *Podophyllum* cinsine ait türlerde bulunan podofilotoksin izomeri olan epipodofilotoksin türevlerinden, etoposide küçük hücreli akciğer kanseri, testis kanseri ve lenfomalarda; teniposide ise akut lenfositik lösemi tedavisinde kullanılan antikanser ajanlarına örnektir. Pasifik porsuk ağacı, *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen paklitaksel, terpen temelli bir moleküldür ve akciğer, over ve meme kanserinde, onun semisentetik analogu dosetaksel ise meme, over, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde yer alan ajanlardır. Çin süs ağaçlarından (“Chinese ornamental tree”), *Camptotheca acuminata*'dan elde edilen kamptotesin molekülünün semisentetik türevleri olan topotekan (“hycamptamine”) ve irinotekan da klinik uygulamaları bulunan alkaloid yapıdaki antikanser ajanlardandır (Cragg ve Newman, 2005, Gurib-Fakim, 2006).

Bu tezin amacı, Apiaceae (*Heracleum humile*, *Olymposciadium caespitosum*), Asteraceae (*Tripleurospermum pichleri*, *Achillea multifida*, *Doronicum bithynicum*,

Senecio olympicus, *Centaurea drabifolia*), Caryophyllaceae (*Gypsophila olympica*), Ephedraceae (*Ephedra campylopoda*), Fabaceae (*Astragalus sibthorpianus*), Papaveraceae (*Papaver pilosum*) ve Thymelaeaceae (*Daphne oleoides*) familyalarına ait 12 türün antioksidatif özelliklerinin belirlenmesi ve olası sitotoksik/sitostatik, genotoksik/antigenotoksik ve apoptotik/nekrotik etkiler yönünden incelenmesidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri, dünyada ikinci en yaygın görülen kanserdir ve kadınlarda görülen kanser tipleri içinde görülme sıklığı açısından % 25 ile ilk sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark. 2015). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının (IARC) 2012 yılı verilerine göre, dünya genelinde 1,67 milyon yeni meme kanser vakası tahmin edilmiştir (Ferlay ve ark. 2015). Kanser vaka sayısı düşük bir farkla da olsa gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. İnsidans oranları, Orta Afrika'da 100 000'de 27'den, Batı Avrupa'da 100 000'de 96'ya kadar yaklaşık 4 kat kadar değişim göstermektedir (Ferlay ve ark. 2015). Meme kanseri 2012 yılında 522 000 ölümle tüm kanserlerde beşinci, kadın kanserleri içinde birinci sıradadır (Ferlay ve ark. 2015). Gelişmekte olan dünyada meme kanseri mortalite oranları, gelişmiş ülkelerdeki mortalite oranlarından daha düşüktür. Kanserde ölüm oranlarının gerilemekte olduğu söylenmektedir, ancak meme kanseri kanseri tedavisindeki kısmi başarılar da göz önüne alındığında dahi bu gerileme tatmin edici değildir. A.B.D.'de 1991-2011 yılları arasında kanser ölüm oranı görece % 22 azalmayla 100 000'de 215,1'den 168,7'ye düşmüştür (Siegel ve ark. 2015). Bu durum, hem kanserin daha iyi anlaşılmasına hem de yeni tedavilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Ülkemizde kanser insidansı dünyadaki diğer ülkeler ile karşılaştırıldığında, insidans oranının hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük olduğu görülmektedir. Ülkemizde de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (% 25). Meme kanseri yaş dağılımı incelendiğinde vakaların % 42,5'inin 15-49 yaşları arasında olduğu görülmektedir. İnsidans oranları 35-39 yaş aralığında 100 000'de 50,8, 40-44 yaş aralığında 100 000'de 81,1 ve 45-49 yaş aralığında ise 100 000'de 109,1 olarak tespit edilmiştir (Gültekin ve Boztaş 2014).

İnsan epidermal büyüme faktörü, östrojen ve progesteron hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozisi düzenler. Endokrin hassasiyeti östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonlarıyla ölçülür ve önemli bir prognostik ve prediktif bir faktördür. Bu reseptörlerin yanında, tümör hücrelerinde, insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2)'nin yüksek ekspresyonu kötü klinik seyirle ilişkilendirilmiştir. ER

ve PR pozitifliği endokrin tedavi yanıtının tahmin edilmesinde, HER2 pozitifliği ise anti-HER2 tedavilerinin yanıtını tahmininde kullanılır (Brown ve ark. 2008). Klinik, patolojik ve moleküler özellikleriyle birlikte meme kanseri heterojen bir hastalıktır. Genetik profillemeye meme kanseri için en az 4 kategori üretmiştir: Luminal A (ER-pozitif ve/veya PR-pozitif, HER2-negatif), Luminal B (ER-pozitif ve/veya PR-pozitif, HER2-pozitif), Triple negatif (ER, PR ve HER2-negatif) ve HER2 aşırı ifadesi (ER ve PR-negatif, HER2-pozitif) (Sorlie ve ark. 2001). Triple negatif kanser tipi genellikle genç kadınlarda görülmekle birlikte klinik seyri kötü olan bir kategoridir (Brown ve ark. 2008).

Meme kanseri, genetik ve çevresel faktörler arasında güçlü bir etkileşimin olduğu karmaşık ve multifaktöriyel bir hastalıktır. Meme kanseri için çok sayıda risk faktörü belirtilmiştir. Bunlar içinde coğrafya ve yaş önemli bir faktör olup 50-64 yaş aralığında meme kanseri insidansının yükseldiği gözlenmiştir (McPherson ve ark. 2000). Bunun yanında, ailede meme kanseri öyküsü olması, erken menstruasyon yaşı, geç menopoza başlangıcı, hiç gebe olmamak veya ilk doğumu 30 yaşın üzerinde gerçekleştirmek ve mutasyonlu meme kanser genine (BRCA1 veya BRCA2) sahip olmak meme kanser riskiyle ilişkilendirilen faktörlerdir (Campbell 2002).

2.2. Meme Kanseri Tedavi

Meme kanserinin erken evrelerinde cerrahi rezeksiyonla kür sağlanır. En sık kullanılan yöntem modifiye radikal mastektomidir. Günümüzde meme koruyucu cerrahi de gittikçe önem kazanmaktadır. Meme koruyucu cerrahinin, modifiye radikal mastektomi kadar iyi sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır (Jacobson ve ark. 1995). Uzak organ metastazı yapmış meme kanserlerinde ise kür elde etme şansı düşüktür. Soliter organ metastazlarında ise tedavi seçeneği olarak metastazektomi yönünde bir eğilim mevcuttur (Hortobagyi 1998).

Lokal ileri meme kanseri olgularında sadece cerrahi yetersiz kaldığından yanına radyoterapi eklenmesi gündeme gelmiş ve böylece lokal tümör kontrolünün arttığı saptanmıştır. Adjuvan tedavi, meme kanseri hastasının, ameliyattan sonra kemoterapi almasıdır. Adjuvan radyoterapi ve kemoterapi uygulanan hastalar, sadece radyoterapi uygulanan hastalara göre % 20-30 oranında düşük mortalite riski gösterirler

(Dombernowsky ve ark. 1988). Mastektomili hastalarda kemoterapinin tamamlanmasının ardından radyoterapi uygulaması önerilmektedir. Neoadjuvan kemoterapi (cerrahi öncesi kemoterapi, sonrasında mastektomi) sonrasında radyoterapi uygulaması da yapılabilmektedir (Dombernowsky ve ark. 1988).

Endokrin tedavisi, hormon reseptörleri pozitif olan hastalarda kullanılan yöntemdir. Adjuvan, neoadjuvan ve palyatif tedavide kullanılır. Tamoksifen, lüteinizan hormon salgılatıcı hormon analogları, aromataz inhibitörleri en sık kullanılan ajanlardır (Hortobagyi 1998, Maughan ve ark. 2010).

Meme kanseri; taksanlar (dosetaksel, paklitaksel), antimetabolitler (5-florourasil), antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin) ve alkilleyici ajanlar (siklofosfamid) gibi çeşitli kemoterapötiklere cevap vermektedir. Tedavide etkili olan kemoterapi ajanları çeşitli kombinasyonlar halinde kullanılırlar. Örneğin, FEC (5-florourasil, epirubisin, siklofosfamid), ET (epirubisin, dosetaksel) ve benzeri çok çeşitli kemoterapi protokolleri kullanılmaktadır (Maughan ve ark. 2010).

HER2 ifadesi yüksek olan hastaların tedavisinde trastuzumab kullanılır. Trastuzumab, “insanlaştırılmış” bir monoklonal antikordur ve HER2’nin ekstraselüler kısmına yüksek affiniteyle bağlanır (Goldenberg, 1999). Trastuzumab, hedefe yönelik tedavilerde öne çıkan örneklerden biridir ve meme kanseri tedavisinde önemli bir ilerleme olarak kabul görmektedir (Morrow, 2009). Klinik olarak, HER2-pozitif metastatik meme kanserlerinde tek başına kullanılmaktadır (Vogel, 2002). Ayrıca, yine HER2-pozitif hastalarda uygulanan ve trastuzumab ve geleneksel kemoterapötiklerin kombine edilerek (siklofosfamid ve doksorubisin tedavisi sonrası paklitaksel kombinasyonu) kullanımına dayanan tedaviler önceki tedavilere göre daha başarılıdır (Romond, 2005).

Meme kanseri üzerinde *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda tümör modeli olarak meme kanseri hastalarından geliştirilen hücre soyları kullanılmaktadır. Her kanser hücre soyuna ait belli özellikler, bu hücre soylarını çalışmalarda tercih sebebi yapmaktadır. Meme kanser hücre soylarının *in vivo* ortamı ne derece karşılık geldiği bir tartışma konusu olsa da yapılan genetik testler kanser hücrelerinin *in vivo* koşullarını büyük ölçüde temsil ettiğini söylemektedir (Lacroix ve Leqlercq 2004, Neve ve ark. 2006). En sık çalışılan insan meme kanser hücre soylarından MCF-7 ve MDA-MB-231 karşılaştırılırsa Çizelge 2.1’de belirtilen özellikler sıralanabilir.

Çizelge 2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre soyları arasındaki farklar

Özellik	MCF-7	MDA-MB-231	Referans
ER	Pozitif	Negatif	Lacroix ve Leqlercq 2004
PR	Pozitif	Negatif	Lacroix ve Leqlercq 2004
HER2	Negatif	Negatif	Neve ve ark. 2006
p53	Yabani tip	Mutant	Lacroix ve ark. 2006
Fenotip	Luminal tip	Bazal tip	Lacroix ve ark. 2006
İnvazyon	Non-invazif	İnvazif karakter	Thompson ve ark. 1992
Diğer	-	NF-κB sürekli aktivasyonu	Lacroix ve ark. 2006

Tümörijenik olmayan bir hücre soyu olan MCF-10A (insan fibrosistik meme dokusundan elde edilmiştir) ise ER ve PR-negatiftir (Soule ve ark. 1990, Neve ve ark. 2006). Qu ve ark. (2015), MCF-10A hücrelerini farklı kültür koşullarında luminal ve bazal özellikleri karakterize eden belirteçleri çalışmışlardır. İlginç olarak, tek katlı (monolayer) büyütülen MCF-10A hücrelerinin hem luminal tip (sitokeratin 8 ve E-kaderin) hem de bazal tip (vimentin ve N-kaderin) özelliklere işaret eden belirteçleri ifade ettiği tespit edilmiştir (Qu ve ark. 2015).

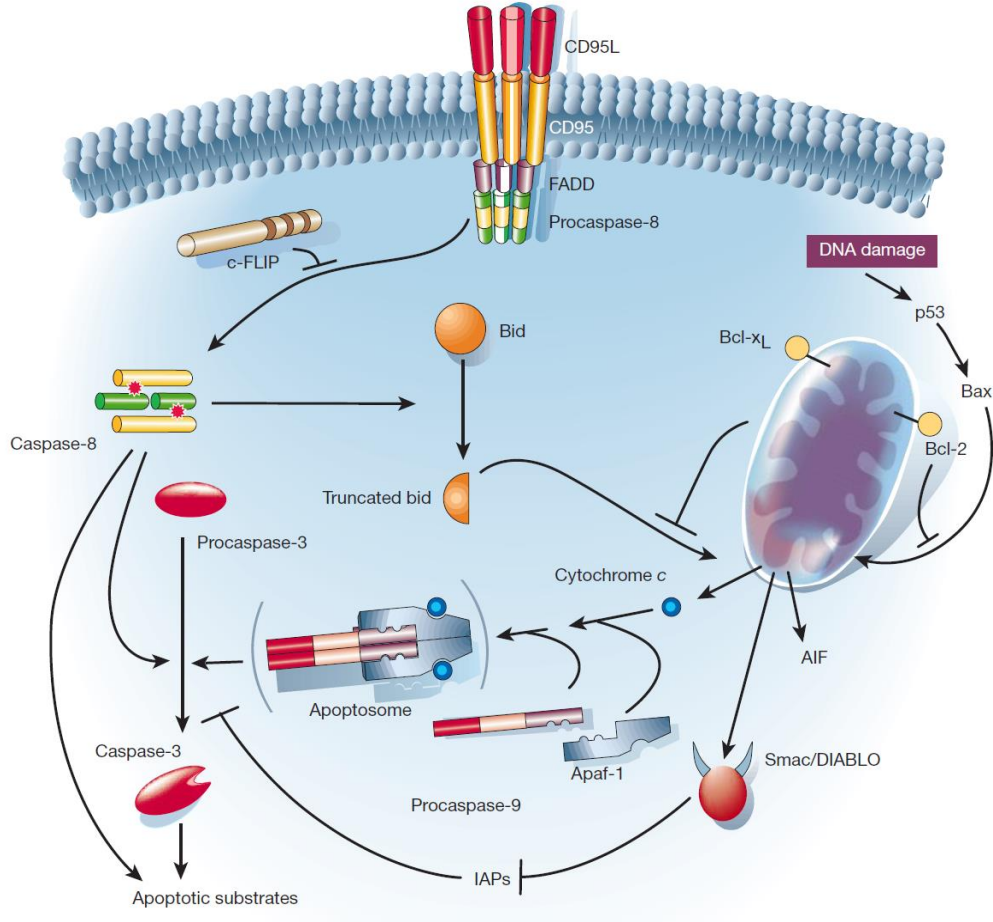
2.3 Hücre Ölüm Yolakları

2.3.1 Apoptozis

İlk olarak Kerr ve ark. (1972) tarafından ortaya atılan apoptozis tabiri, fizyolojik koşullarda gerçekleşen ve mitoz karşıtı bir süreç olarak işleyen programlı bir hücre ölüm şeklini tarif etmek için kullanılmıştır (Kerr. ve ark. 1972). Sonraki yıllarda, apoptotik hücre ölümünü saptamak, yorumlamak üzere çok sayıda yöntem geliştirilmiş ve moleküler mekanizmalarını aydınlatmak üzere sayısız çalışma yapılmıştır. Apoptozis, hücrenin yuvarlaklaşması, hücre hacminin azalması, kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, membran blebilenmesi (membran üzerinde suyun kaynarken fokurdamasına benzer yapıların görünmesi) ve geç evreye kadar

bozulmamış bir hücre membranının eşlik ettiği bir programlı hücre ölüm şeklidir (Kroemer ve ark. 2009). Apoptozis mekanizması, anahatlarıyla içsel ve dışsal yolak şeklinde ikiye ayrılmaktadır. Dışsal yolak apoptozisi tetikleyen hücre dışı stres uyaranlarının spesifik transmembran reseptörler aracılığıyla hücre içine iletilmesiyle başlar. Bu reseptörlerin başlıcaları ölüm ligandlarıyla birlikte; Fas/CD95 reseptörü ile Fas/CD95 ölüm ligandı, TNF α reseptör 1 (TNFR1) ile tümör nekrozis faktör α (TNF α), TRAIL reseptör 1 ve 2 (DR4 ve DR5) ile TRAIL (TNF ilişkili apoptozis-indükleyen ligand)'dır (Wajant 2002, Schutze ve ark. 2008, Mehlen ve Bredesen 2011). Örnek olarak, Fas ölüm reseptörü aracılı bir apoptozis sürecinde, hücre membranında trimer yapıda bulunan Fas molekülleri, Fas ölüm ligandının bu yapıyı stabilize etmesiyle birlikte konformasyonel bir değişim geçirir (Şekil 2.1). Bu konformasyonel değişimle birlikte reseptörün sitozolik yüzünde bütün ölüm reseptörlerince paylaşılan 80 aminoasitlik bir dizi açığa çıkarak dinamik bir multiprotein kompleksinin oluşmasına izin verir (ölüm "domain"i, DD) (Boldin ve ark. 1995, Schulze-Osthoff ve ark. 1998). Fas'ın ölüm "domain"de toplanan proteinler reseptör-ilişkili protein kinaz 1 (RIPK1 veya RIP1), ölüm "domain"e sahip Fas-ilişkili protein (FADD), c-FLIP, apoptozis inhibitör proteinler (cIAPs), apoptozisi kaspaz aktivitesi üzerinde baskılayabilen E3 ubiquitin ligazlar ve prokaspaz-8 veya -10 enzimidir (Boldin ve ark. 1996, Deveraux ve ark. 1998, Budd ve ark. 2006) Aktive olan kaspaz-8 veya -10, Bcl-2 ailesinde proapoptotik bir protein olan Bid'i kırarak mitokondriyel membran geçirgenliğinin artmasına neden olur. Mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom c; APAF1, dATP ve prokaspaz-9 ile bir multiprotein kompleks oluşturarak efektör kaspazlar olan kaspaz-3,-6 veya -7'nin aktivasyonu sonucu kaspaz kaskadını başlatır (Hengartner 2000). İçsel yolak ise kaspazlara bağımlı veya kaspaz bağımsız olarak ilerleyebilir. DNA hasarı, oksidatif stres ve sitoplazmada yüksek Ca²⁺ konsantrasyonları, endoplazmik retikulum içinde katlanmamış proteinlerin birikimi gibi farklı etmenler içsel yolağı tetikleyebilir. Ancak içsel yolağın başladığı organel olan mitokondride proapoptotik sinyal kaskadı ve antiapoptotik mekanizmalar arasındaki dengenin proapoptotik moleküller lehine kayması gerekmektedir (Kroemer ve ark. 2007). Bu dengede söz konusu olan proteinler bcl-2 ailesi proteinleridir. Bcl-2 ailesi proteinlerinden proapoptotik bax ve bak proteinlerine karşılık antiapoptotik bcl-2 protein miktarı önem arz eder. Mitokondriyel membran geçirgenliğinin artmasıyla birlikte mitokondriyel ATP sentezi azalır, reaktif

oksijen türleri (ROS) artar ve sitokrom c ile birlikte apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G sitoplazmaya salınarak sırasıyla apoptozom oluşumuna ve DNA'nın belirli noktalardan kesilmesine neden olurlar (Galluzzi ve ark. 2012).



Şekil 2.1. İçsel ve dışsal yolağın moleküler mekanizmaları (Hengartner 2000)

2.3.2 Otofaji

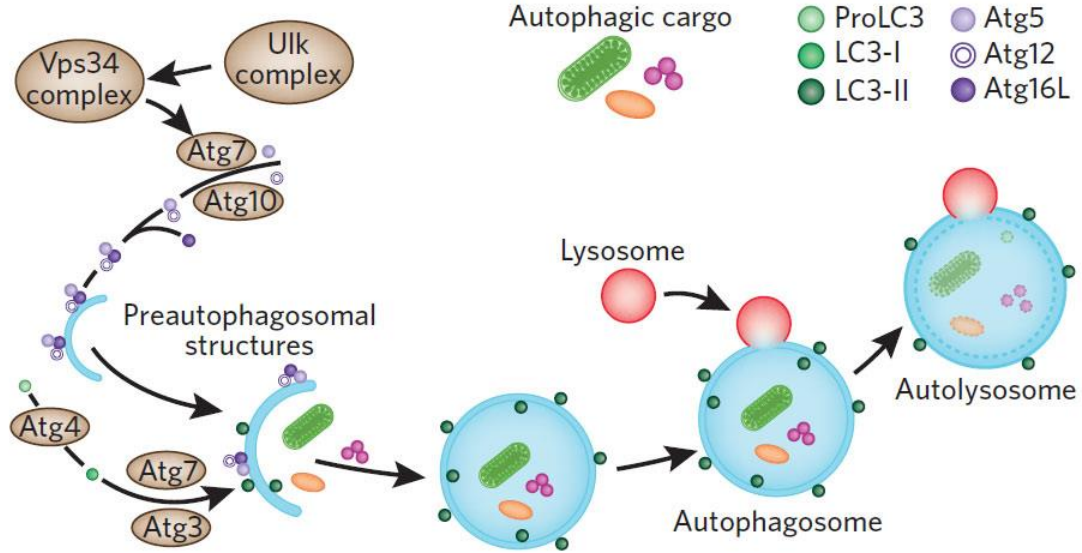
Otofaji uzun ömürlü proteinlerin, organellerin ve sitoplazmik parçacıkların parçalanmasından sorumlu fizyolojik bir fenomendir. Otofaji, lizozomal parçalanmadan sonra hücresel geri dönüşümü sağlar ve hücrenin açlık, büyüme faktörü yokluğu ve oksidatif stres gibi çeşitli koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olur. (Kondo ve ark. 2005, Shintani ve Klionsky 2004). Otofajinin önemli tanımlayıcı özelliklerinden biri, sitoplazma organellerini içeren otofagozom adı verilen çift membranlı veziküllerin oluşumu ve bu veziküllerin lizozomlarla birleşmesidir (Kondo ve ark. 2005, Shintani ve

Klionsky 2004). Genel olarak otofaji 4 formda açıklanabilir; çift membranla sınırlı organellerin sitoplazma içinde parçalanması olan makrotofaji, membran invajinasyonu ile sitoplazmanın lizozom içine taşınması olan mikrotofaji, spesifik moleküllerin lizozom içine alınması olan şaperon bağımlı otofaji ve kanonik olmayan-alternatif (Atg5/7 bağımsız) makrotofaji (Klionsky ve Lane 2010).

Otofajinin açlık durumunda hücresel yapı taşlarının yıkılarak geri dönüşümü ve hücrenin enerji depolarını yenileyerek apoptotik hücre ölümünü engellediği ya da zıt olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmesine ek olarak apoptozisle karmaşık bir etkileşim içinde olduğu pek çok yayında ifade edilmektedir (Wirawan ve ark. 2012, Nikolettou ve ark. 2013). Otofajinin hiperaktivasyonu sürecin katabolik doğası nedeniyle hücre içeriğinin sindirilerek hücreyi ölüme götürebilir. Dolayısıyla, bu programlı hücre ölümüne otofajik hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Gozuacik ve Kimchi 2007). Otofaji özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda aktive olarak, apoptozisle ölmesi mümkün olmayan hücrelerin ölümüne yol açabilir. Bu özelliği ile, bazı durumlarda apoptozis yanında alternatif bir hücre ölüm modu olarak düşünülebilir. Bunun yanında, otofaji ve apoptozis arasında en az üç farklı bağlantı gözlenmiştir. Otofaji; apoptozise paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozisi baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptozis için bir ön koşul olabilir (Eisenberg-Lerner ve ark. 2009).

Otofajinin moleküler mekanizmaları insanlardan önce mayalarda tanımlanmıştır. Mayalardaki ilgili genlerle homoloji çalışmaları yapıldığında insanlarda otofaji-ilişkili Atg proteinleri keşfedilmiştir (Şekil 2.2). Bu proteinler, otofajinin başlangıç aşamasında Ulk ve Vps34 protein kompleksleriyle birleşerek çift-katlı preotofagozomal yapıları oluştururlar (Fleming ve ark. 2011). Otofagozomal yapının tamamlanması için ise iki farklı otofagozom birleşme sistemi rol almaktadır. Atg12 ve Atg8/LC3, Atg7 tarafından aktive olup sırasıyla Atg5 veya fosfatidiletanolamin ile birleşmektedirler (Mizushima ve ark. 1998, Klionsky ve Emr 2000). Bu iki sistem, vezikül membranlarına Atg8/LC3'ün yönlendirilmesinde Atg12-Atg5 kompleksi gerekli olduğu için birbirleriyle ilişkilidir (Mizushima ve ark. 1998, Klionsky ve Emr 2000). Otofajinin başlangıcında ise mTOR inhibisyonunun etkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve Klionsky 2003). Diğer bir kilit olay ise PI3K aktivasyonudur ve bu da antiapoptotic Bcl-2

proteinleri tarafından inhibe edilen beclin-1 proteininin Atg6 ile kompleks oluşturmasına bağlıdır (Wang ve Klionsky 2003, Pattingre ve ark. 2005).

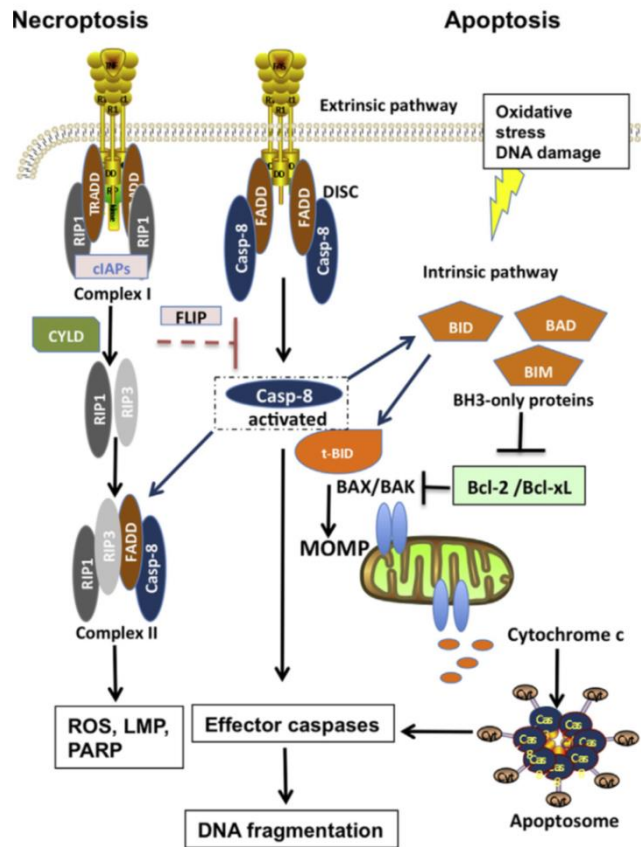


şekil 2.2. Otofajide otofagozom ve otolizozom oluşumu (Fleming ve ark. 2011)

2.3.3. Nekrozis ve Nekroptozis (Programlı nekrozis)

Uzun bir süre boyunca nekrozis kazara gerçekleşen ve morfolojik olarak apoptozis ve otofajik hücre ölümünün gözlenmediği durumlarda tanımlanan bir hücre ölüm modu olarak kalmıştır (Kroemer ve ark. 2009). Geleneksel olarak nekrotik hücre ölümü, sitoplazmanın vakuolizasyonu, hücrenin şişerek (onkozis) membran bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin mikroçevreye yayılıp inflamatuvar yanıt oluşturabilmesiyle karakterizedir (Bruin ve Medema 2008). Nekrotik lm, genellikle enfeksiyon ve iskemi gibi patolojik travmaların bir sonucu olarak görülmesine rağmen, bu ölüm modunun TNF α ve Fas ligand moleküllerinin kendi ölüm reseptörleri aracılığıyla da indkленebildięi görülmüştür (Vercammen ve ark. 1998a, Vercammen ve ark. 1998b). Dolayısıyla, günümüzde nekrozisin programlı olabileceği ve fizyolojik ya da patolojik süreçlerde rol alabileceği görülmüştür (Vandenabeele ve ark. 2010). Örneğin lm reseptörü-ilişkili nekrozis, RIP1 kinaz (RIP1 olarak da isimlendirilir) aracılığıyla indkленebilir; RIP1 ekspresyonu baskılanan veya düşük olan hücre soylarının Fas aracılı lme karşı dirençli oldukları görülmüştür (Vercammen ve ark.

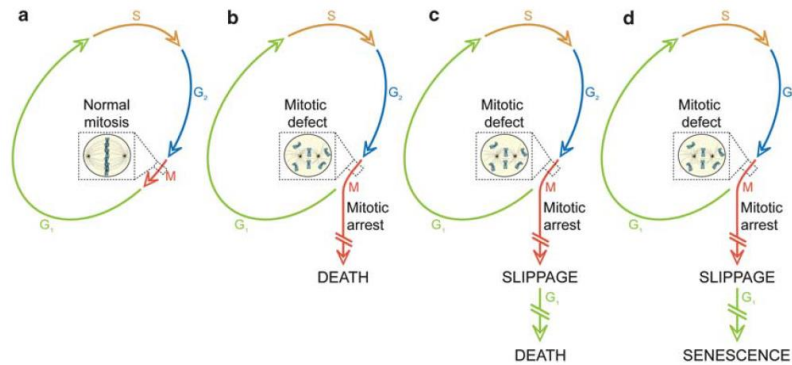
1998b). RIP1'in ise ölüm reseptörü-ilişkili nekrozisin indüklenebilmesi için sonraki aşamada homologu olan RIP3 proteinini de içeren bir kompleks oluşturması gerekmektedir (He ve ark. 2009) (Şekil 2.3). Ancak, apoptotik ölüm mekanizmalarının işleyeceği koşullarda bu kompleksin bileşenleri olan RIP1 ve RIP3, kaspaz-8 tarafından kırılarak nekroptozis yolağı engelleneceğinden, programlı nekrozisin gerçekleşebilmesi için kaspaz-8 ekspresyonunun düşmesi veya cFLIP gibi apoptotik inhibitörlerce inhibe edilmesi gerekmektedir (Bruin ve Medema 2008, Radogna ve ark. 2015). Böylece, RIP1 ve RIP3'ün degrade olmadığı durumlarda nekroptozis yolağının sonraki basamaklarında mitokondrinin hedeflendiği ve ROS'un arttığı, lizozomal membran permeabilizasyonunun gerçekleştiği ve bir DNA tamir enzimi olan PARP1'in aşırı aktivasyonu neticesinde hücrel NAD⁺ ve ATP seviyelerinin düştüğü bir hücre ölümü tablosu gözlenir (Bruin ve Medema 2008, Radogna ve ark. 2015).



Şekil 2.3. Nekroptozis yolağı ve apoptotik yolak ile ilişkisi (Radogna ve ark. 2015)

2.3.4 Mitotik Felaket (“Catastrophe”)

Mitotik felaket, hürenin mikrotübül veya DNA hasarı yapan ajanlara maruz kalmasının ardından sorunlu bir mitoz bölünmeyle ortaya çıkan ve bu bölünme sırasında veya bölünme sonraki interfazda hücre ölümüyle tamamlanabilen bir süreçtir (Vakifahmetoglu ve ark. 2008) (Şekil 2.4). Mitotik felaketin aslında tam olarak bir hücre ölüm modu olmadığı, hücreyi tümör gelişimini baskılayacak şekilde hücre ölümüne veya senesense (yaşlanma) götüren bir yol izleyen bir fenomen olduğu tahmin edilmiştir (Vitale ve ark. 2011). Bu süreçte bir hücrenin izleyebileceği pek çok yol vardır: örneğin bazı durumlarda mitoz bölünme durmaz ve mitotik kayma (“slippage”) ile bir sonraki interfaza girebilir veya bir anormal mitoz bölünme daha geçirir. Ancak sıklıkla bu bölünme tamamlanamaz ve bölünmenin sitokinez evresinde yarım kalmasından dolayı tetraploid hücreler gelişir. Bunların birçoğu ölür veya senesense girer. Anormal mitoz bölünmenin üretken olması durumunda ise tümörjenik potansiyeli olan anöplöid hücreler oluşur, fakat bunların da birçoğu kromozomal anomalilerin fazlalığından dolayı hücre ölümüne giderler veya bir sonraki mitozu giremezler. Anöplöid hücrelerin bir kısmı mitoz bölünmeye girse bile yeni bir mitotik felaket programına çok daha duyarlıdır ve genellikle mitoz bölünmenin M fazında çok kutuplu, suprafizyolojik sayıda sentrozomun eşlik ettiği bir bölünme gerçekleşir. Bu durum da daha önceki bölünmeye benzer şekilde hücre ölümüyle sonuçlanır. Her bir bölünmenin yavru hücrede ploidiyi arttırdığını da belirtmek gerekir (Vitale ve ark. 2011).



Şekil 2.4. Anormal mitoz bölünmeyle oluşan mitotik felaket ve muhtemel sonuçları (Galluzzi ve ark. 2012)

2.4 Hücre Ölümü, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Antioksidan Sistemler

Fizyolojik koşullarda insan vücudundaki oksidatif sistemler ve antioksidan sistemler bir denge halindedir. ROS, hücre büyümesi, farklılaşması ve hücre ölümü gibi çok geniş ve birbirinden farklı süreçlerde rol alır. Dolayısıyla, ROS oluşumu bu dengenin bir sonucu olarak, düşük konsantrasyonlarda hücre içi sinyal iletimi ve mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarında yer aldığı için önemli, hatta vazgeçilmezdir. Buna karşın, ROS dengesinin yüksek ROS konsantrasyonu üretecek biçimde bozulması ise yaşlanmanın yanında alerjik hastalıklar, kanser, kalp ve damar hastalıkları, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve göz hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (Mates ve ark. 1999).

ROS ve apoptotik hücre ölümü arasında sıkı bir ilişki mevcuttur. ROS artışı apoptozisi hem dışsal hem içsel yollar üzerinden uyarabilir. Yüksek ROS, dışsal yolda ASK1 ve JNK aktivasyonu ile apoptozisi indükler; içsel yolda ise mitokondriyel membran permeabilizasyonu ile apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınması söz konusudur (Circu ve Aw 2010). Oksidatif stress ve apoptozis arasındaki ilişkiye yer verirken yüksek ROS konsantrasyonunun kaspazların aktif bölgelerindeki –SH grubunun oksidasyonuna rol açabildiğini belirtmek gerekir. Böyle bir durumda nekrotik hücre ölümü gözlenir. Ayrıca, mitokondriyel ATP üretiminin azalmasına neden olan oksidatif stres apoptotik mekanizmayı bu yolla da engelleyerek nekrozis-benzeri hücre ölümünü indükleyebilir (Chandra ve ark. 2000). Yüksek oksidatif stres aynı zamanda hücre genelinde DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna yol açar (Circu ve Aw 2010). Oksidatif stres ve DNA ilişkisi incelendiğinde, farklı ROS moleküllerinin DNA ile etkileşimlerinin derecesi ve oluşan hasar tipinin değiştiği görülür. Örneğin, H_2O_2 DNA ile etkileşime girmezken, $HO^{\bullet}$ radikali bütün DNA bazlarında farklı hasar ürünleri oluşturarak kendine has bir parmakizi bırakır (Cuzzocrea ve ark. 2001). $O_2^{\bullet-}$ radikali ise spesifik olarak guanin bazına saldırır ve 8-hidroksiguanin üretir (Cuzzocrea ve ark. 2001).

Bitkilerde antioksidan mekanizmalar oldukça gelişmiştir. Enzimatik antioksidan sistemlerin yanında, enzimatik olmayan ve glutatyon, α -tokoferoller, karotenoid ve flavonoidlerin aktivitelerine dayanan mekanizmalar mevcuttur (Gill ve Tuteja 2010). Flavonoidler en aktif bitki ikincil metabolitleridir ve pek çoğu askorbik asit ve α -

tokoferolden daha yüksek antioksidan aktivite gösterir (Hernandez ve ark. 2009). Bitki flavonoid seviyelerinin oksidatif stresin artmasına yol açan yaralanma, kuraklık, metal toksisitesi ve besinsel kısıtlamalar karşısında dramatik derecede arttığı belirtilmiştir (Winkel-Shirley 2002). Bitkilerin sahip olduğu fenolik içerik sağlık, besin endüstrisi ve diğer sektörlerde önem verilen bir noktadır. Tıbbi bitkilerin birçok hastalığa karşı tedavi edici etkileri, fenolik ve antioksidan içeriklerine dayandırılmaktadır (Çoruh ve ark. 2007). Ancak, kanserle mücadelede antioksidan kullanımını öne çıkaran yaklaşımlardan ziyade, temel olarak oksidatif stres yaratacak biçimde ortaya çıkan veya planlanan tedavilerin etkili olabileceği Watson (2013) tarafından tartışılmıştır.

2.5. Tez Konusu Oluşturan Bitkilere Ait Genel Bilgi

Tez konusu oluşturan bitki türleri hakkındaki genel bilgiler türlerin ait oldukları familyaların ve sonrasında cinslerin alfabetik sıralamasına göre verilmiştir. Türlerin endemizm durumları Çizelge 2.2’de yer almaktadır.

2.5.1 *Heracleum humile* Sm. (Apiaceae)

Tür çok yıllık ve gövdeleri toprak altındadır. Alt yaprakları tüysü ve dikdörtgenimsidir. Gövde yaprakları geniş olarak yumurtamsı-dikdörtgen kınlı ve yaprak uçları yuvarlaklaşmış ya da çıkıntılıdır. Çiçekleri beyazdır. Meyveleri ise eliptik-ters yumurtamsıdır. Uludağ’da, üst kuşağın kayalık yamaç, çayırılık alanlarda ve oynar kayalar üzerinde gelişir. Çiçeklenme zamanı Temmuz ve Eylül aylarıdır (Davis 1972).

2.5.2 *Olymposciadium caespitosum* (Sm.) Wolff (Apiaceae)

Tüysüz veya çok küçük ince tüylü çim gibi sık yapılı çok yıllık bitkilerdir. Gövdesi yuvarlak ve dallanmıştır. Yaprakları çoğunlukla tabanda, dikdörtgen şeklindedir. Tür, Uludağ’ın 1 900 m’nin üzerindeki (1 900- 2 450 m) üst rakımların tipik sert yastık yapılı toplulukları olan *Festuca pectoria* ve *Acantholimon ulicinum* toplulukları arasında geniş yayılım gösterir. Üst kuşağın yamaç ve uçurumlarındaki kireçtaşı yarıkları arasında gelişir. *Olymposciadium caespitosum*, bulunduğu habitatta *Veronica caespitosa*

Boiss. var. *caespitosa*, *Paronychia amani* Chaudhri, *Astragalus sibthorpianus* Boiss., *Festuca punctoria* Sm., *Gypsophila olympica* Boiss. ve diğ er endemik türler ile beraber bulunmaktadır. Ç içeklenme zamanı Temmuz ve Ağ ustos aylarıdır (Davis 1972).

2.5.3 *Achillea multifida* (DC) Boiss. (Asteraceae)

Ebülmölük ve civanperçemi isimleriyle anılan bitki, yeş il yapraklı, her tarafta seyrek örtü tüylü, tabanı 2-3'lü teleksi-bölük ila teleksi-kesik parçalıdır. Baş ç ık 4-20 çiçeklidir. Beyaz dils i çiçekleri 6-9 tanedir ve disk çiçekleri de yaklaşık 40-50 tanedir. Türü çiçekli olarak dağ ın yüksek rakımlarında ve oteller çevresinde, Temmuz ve Ağ ustos aylarında görmek mümkündür. Tür, 1 700 ile 2 450 m arasındaki rakımlarda bulunan *Verbascum olympicum*, *Abies bornmuelleriana*, *Juniperus communis*, *Nardus stricta*, *Festuca cyllenica* ve diğ er subalpin ve alpin topluluklarda yayılış gösterir (Davis 1975).

2.5.4 *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *drabifolia* (Asteraceae)

Peygamber çiçeğ i adıyla anılan odunsu köklü, verimsiz rozets i ve az çok basit ayrık gövdeli, küçük kümeler oluşturan çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları beyazımsı keçe gibi tüylü ve üzeri pürtüklü; mızraks ı ila ş erits i mızraks ı şekildedir. Ç içekleri sarıdır. Meyve papuslu kapç ık şeklindedir. Bu tür, 1 200 ila 2 400 m arasındaki rakımlarda kayalık yerlerde yayılış gösterir. Ç içekli örnekleri, Haziran ve Ağ ustos aylarında, örneğ in Kuş aklıkaya ve Ş ahinkaya tepelerinde görülebilir (Davis 1975).

2.5.5 *Doronicum bithynicum* J.R. Edmondson subsp. *bithynicum* (Asteraceae)

Bitki, kısa yatay toprakaltı gövdeli ve 45-75 cm boyundadır. Gövdenin yarısının altındaki yapraklar salg ı tüylüdür. Taban yaprakları eliptik ila yumurtams ı şekildedir. Gövde yaprakları birkaç tanedir, alttakiler taban yapraklarına benzer, üstteki yapraklar ise eliptik ila saps ız ve yumurtams ı şekildedir. Ç içekler sarıdır. Tür, 1 500 ila 2 200 m arasındaki rakımlardaki *Juniperus communis* bodur ç alı ile *Abies bornmuelleriana* orman toplulukları arasında ve taş lık yamaçlarda yayılış gösterir. Ç içeklenme zamanı Mayıs ve Temmuz aylarıdır (Davis 1975).

2.5.6 *Senecio olympicus* Boiss. (Asteraceae)

Sırt şeklini almış dik, tüysüz gövdeli çok yıllık bitkilerdir. Yaprakları seyrek olarak ağsı ile tüysüz, altta dikdörtgensi spatula şeklinde, üstte yumurtamsı ile mızraksı ve sapsızdır. Çiçekler sarıdır. Meyveleri kapçık tip olup beyazımsı papusludur. *Senecio olympicus*'un çiçekli örnekleri Temmuz ve Ağustos aylarında 1 800 ila 2 200 m arasındaki rakımlarda görülebilir (Davis 1975).

2.5.7 *Tripleurospermum pichleri* (Boiss.) Bornm. (Asteraceae)

Tür çok yıllıktır. Gövdeler rizomdan (yeraltı gövdesi) tek olarak çıkan dik durumlu ve tüysüzdür. Yaprakları tüysü, seyrek ve 1-2 derin parçalıdır. Daha dıştaki pulsu yapraklar ucu sivri üç köşeli, içtekiler ise ters mızraksı, tüm pulsu yaprakların zar şeklindeki kenarları koyu kahve renklidir. Tür, oteller çevresindeki bozulmuş alanlar üzerinde gelişmektedir. Çiçekli üyeleri Haziran ve Ağustos aylarında 1 600 ile 1 800 m rakımlarda görülebilir (Davis 1975).

2.5.8 *Gypsophylla olympica* Boiss. (Caryophyllaceae)

Çime benzer sık yapılı çok yıllık, odunsu yeraltı gövdelidir. Gövdeler çok sayıda ve dallanmamıştır. Yaprakları şeritsidir. Çiçekleri ise tek (nadiren ikili) salkımlarda ve uçtadır. Çiçekleri beyaz ile pembe renktedir. Çiçeklenme zamanı Temmuz ve Ağustos aylarıdır. Kalkerli kayalar üzerinde gelişir. Çiçekli üyeleri Kuşaklıkaya ila Zirve tepeleri arasındaki kayalık alanlarda görülebilir. Rakım aralığı 2 000 ila 2 500 m arasında değişmektedir (Davis 1967).

2.5.9 *Ephedra campylopoda* C. A. Meyer (Ephedraceae)

Gövdeleri prostrate (yere yapışık), sürünücü, kırılğan ve yivli olup, dallar gevşek ve kavislidir. Yaprak kınları iki eşit parçalı kısa fincan şeklindedir. Loblar gençken keskindir ve zamanla pürüzlü hale gelir. Erkek çiçekler her bir demette 10 taneye kadar bulunmakta, her bir noddada 2 ila 4 demet halinde bulunmaktadır. Dişi çiçekler ise çiftler

halindedir. Türkiye’de İstanbul, Bursa, Bilecik, Sakarya, İzmir, Konya, İçel ve Maraş’ta kaydı bulunmaktadır (Davis 1965).

2.5.10 *Astragalus sibthorpianus* Boiss. (Fabaceae)

Yerel adı geven veya keven olarak bilinen *Astragalus sibthorpianus* Boiss. Uludağ endemiği olan bir türdür. Bu türe ait ilk örnekler Boissier tarafından toplanmış olup, 1843 yılında bilim dünyasına tanıtılmıştır. Uludağ’ın orman sınırının üzerindeki alpin kuşakta sert yastıkçık formundaki bitki türlerinin arasında yayılış gösterir. Türün en tipik özelliği, aynı birey üzerinde aynı anda sarı ve kiremit kırmızısı renkli çiçeklerin olmasıdır. Çok yıllık, bodur ve sürünücü bir yapı gösterir. Bodur, yere yatık ve çalimsı yapıdadır. 10 cm kadar boylanabilir. Haziran ayında çiçeklenir. Çiçekleri 1,5-2 cm olup yaklaşık 20 kadar çiçek bulundurur (Davis 1970, Güteryüz ve Arslan 1998).

2.5.11 *Papaver pilosum* Sibth & Sm (Papaveraceae)

Çok yıllık bir bitkidir. Gövdeler dik, dallanmış, yoğun ince uzun sert tüylüdür. Alt yaprakları dar ters yumurtamsı dikdörtgen, üst yapraklar yumurtamsı şekilde ve tüm yaprakları kadife tüylüdür. Çiçekleri portakal kırmızısı ile koyu portakal rengindedir. Tür, 1 800 ila 2 150 m arasındaki kayalık yerlerde yayılış göstermektedir. Çiçekli bireyleri, Tutuyeli ve Şahinkaya tepelerinin güney yamaçlarında *Juniperus communis*-bodur çalı topluluğu arasında Haziran ve Temmuz aylarında görülebilir (Davis 1965).

2.5.12 *Daphne oleoides* Schreber (Thymelaeaceae)

Dik, oldukça fazla dallanan çalılardır. Genç sürgünler kırmızımsı kahverengi renktedir. Yaprakları ters yumurta ile eliptik şekillidir. Çiçekleri beyaz veya krem beyazı renktedir. Meyvesi yumurtamsı şekilde ve portakal kırmızısı renktedir. Alpin bölgedeki yastık oluşturan türlerin hakim olduğu *Acantholimon ulcinum* topluluğu arasında yayılış gösterir. Tür, 2 000 m’nin üzerindeki rakımlarda kireç taşı yamaçlar ve taş yığınları üzerinde gelişir. Çiçeklenme zamanı Haziran ve Temmuz aylarıdır (Davis 1982).

Çizelge 2.2. Tez konusu oluşturan bitki türleri ve endemizm durumları

Tür	Familya	Dağılım	Referans
<i>H. humile</i>	Apiaceae (Umbelliferae)	Endemik değil	Davis 1972
<i>O. caespitosum</i>	Apiaceae (Umbelliferae)	TE*	Davis 1972
<i>A. multifida</i>	Asteraceae (Compositae)	Endemik değil	Davis 1975
<i>C. drabifolia</i>	Asteraceae (Compositae)	TE	Davis 1975
<i>D. bithynicum</i>	Asteraceae (Compositae)	TE	Davis 1975
<i>S. olympicus</i>	Asteraceae (Compositae)	UE**	Davis 1975
<i>T. pichleri</i>	Asteraceae (Compositae)	UE	Davis 1975
<i>G. olympica</i>	Caryophyllaceae	UE	Davis 1967
<i>E. campylopoda</i>	Ephedraceae	Endemik değil	Davis 1965
<i>A. sibthorpianus</i>	Fabaceae	UE	Davis 1970
<i>P. pilosum</i>	Papaveraceae	TE	Davis 1965
<i>D. oleoides</i>	Thymelaeaceae	Endemik değil	Davis 1982

* : Türkiye endemiği

** : Uludağ endemiği

2.6 Uludağ Milli Parkı'nda Bulunan Bazı Bitki Familyelerini İçeren Sitotoksik, Genotoksik/Antigenotoksik ve Antioksidatif Çalışmalar

2.6.1 Apiaceae (Umbelliferae)

Anadolu'da baldırgan otu veya tavşancık otu adıyla bilinen *Heracleum* cinsine ait türlerde genellikle kumarin türevleri bulunmaktadır (Dincel ve ark. 2013). *Heracleum humile* türünün büyüme baskılayıcı, genotoksik/antigenotoksik ve antioksidan özelliklerine ait bir çalışma bulunmamakla beraber aynı cinse ait farklı türlerle yapılmış çalışmalar mevcuttur. Firuzi ve ark. (2010) 4 *Heracleum* türünün toprak üstü kısımlarından elde ettikleri esansiyel yağları üç kanser hücre soyu üzerinde denenmiş ve bulunan en düşük IC₅₀ değeri 0,362 mg/ml olmuştur. Farklı bir çalışmada, *Heracleum*

persicum Desf. esansiyel yağları kanser hücreleri üzerinde denenmiş, IC₅₀ değeri 2,24 mg/ml olarak belirlenmiştir (Noudeh 2010). *Heracleum* türlerinden elde edilen saf maddelerin de sitotoksik özellikleri araştırılmıştır. Örneğin, *Heracleum dissectum* bitkisinden elde edilen saf bileşiklerde en düşük IC₅₀ değeri 5,8 µM olarak tespit edilmiştir (Gao ve ark. 2014). *Heracleum platytaenium* ve *Heracleum persicum* türlerinin metanol ve petrol eteri ekstraktlarının zayıf bir antioksidan aktiviteye sahip oldukları DPPH yöntemiyle gösterilmiştir (Çoruh ve ark. 2007, Dincel ve ark 2013). *Heracleum* cinsine ait türlerin genotoksik etkileriyle ilişkili bir yayın literatürde bulunmamaktadır. Ayrıca, çalışılan diğer bir tür olan *Olymposciadium caespitosum* ile ilgili olarak da cins seviyesinde büyüme baskılayıcı, genotoksik/antigenotoksik ve antioksidatif aktivite konularına ilişkin yayın bulunmamaktadır.

2.6.2 Asteraceae

Asteraceae familyasında yaygın olarak bulunan biyoaktif moleküllere örnek olarak seskiterpen laktonlar verilebilir. Cichorieae (Lactuceae) alt familyası ve Cichorieae tribus (oymak)'undaki bitkilerden 2007 yılına kadar toplam 360 seskiterpen lakton bildirilmiştir (Zidorn 2008). Bitkilerde bir savunma mekanizması olarak bulunan seskiterpen laktonlardan bazılarının antikanser etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Zidorn 2008). Ayrıca, Asteraceae familyasında botanik temsilleri açısından öne çıkan 9 türün antioksidatif özelliklerinin incelendiği bir derlemede besin endüstrisi, dermokozmetik ve tıp alanlarında bu familya bitkilerinin yüksek potansiyeli bulunduğu öne sürülmüştür (Bessada ve ark. 2015).

Achillea multifida türünün büyüme baskılayıcı, genotoksik/antigenotoksik ve antioksidan özelliklerine ait bir yayına rastlanmamıştır. Ancak, *Achillea millefolium* L. türüyle ilgili yüksek sayıda çalışma vardır. *Achillea millefolium* ekstraktının karaciğer, meme, akciğer ve kolon kanser hücre soyları üzerinde sitotoksik etkisi bulunduğu gösterilmiştir (Lin ve ark. 2002, Ghavami ve ark. 2010). Aynı bitki türünün n-hekzan, kloroform, su-metanol ve sulu ekstraktları 3 kanser hücre soyu üzerinde denenmiş ve kloroform ekstraktının bunların en etkilisi olduğu görülmüştür (Csupor-Löffler ve ark. 2009a). Ardından, kloroform ekstraktından elde edilen saf moleküllerin de kimyasal yapıları tayin edilip aynı 3 kanser hücre soyu üzerinde denenmiştir. En etkili molekülün,

bir flavonoid olan centaureidin olduğu belirlenmiştir (IC₅₀ 0,082-0,350 µM) (Csupor-Löffler ve ark. 2009a). *Achillea falcata* türünden elde edilen ve bazı yeni bileşikler de içeren saf maddeler HCT-116 kolon kanser hücre soyunda denenmiş ve en etkili olan guaianolid türevi maddenin IC₅₀ değeri 15,2 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Tohme ve ark. 2013). *Achillea falcata* ve *Centaurea ainetensis* türlerinden izole edilen salograviolide A ve iso-seco-tanapartholide molekülleri kombine olarak sırasıyla 3 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarında kullanıldıklarında sinerjistik etki göstererek kolon kanser hücrelerinde % canlılığı yaklaşık 20'ye düşürmüşlerdir (Salla ve ark. 2013). *Achillea millefolium* sulu ekstraktı marul kök ucu meristemlerinde 20 mg/ml konsantrasyonunda kromozom aberasyonlarına yol açtığı görülmüştür (Sousa ve Viccini 2011). Benzer şekilde, Akyıl ve ark. (2012), *Achillea teretifolia* ekstraktının ancak yüksek dozlarda genotoksik etkisi olduğunu bulmuşlardır. Sekiz farklı *Achillea* türünün esansiyel yağ ve flavanoid içerikleri belirlenmiş, DPPH yöntemiyle antioksidan aktiviteleri tayin edilmiştir (Gharibi ve ark. 2015). DPPH radikali süpürücü etkileri açısından, zayıf ve yüksek etkili türler arasında yaklaşık 10 katlık bir fark bulunduğu belirtilmiştir (Gharibi ve ark. 2015). *Achillea millefolium* türüyle yapılan antioksidan etki belirleme çalışmasında DPPH radikali için IC₅₀ değeri 45,6 µg/ml olarak belirlenmiştir (Candan ve ark. 2003).

Centaurea türlerinde bileşenlerin önemli bir oranının seskiterpen laktonları ve flavonoidler olduğu bildirilmiştir (Karamenderes ve ark. 2007). Güneydoğu Anadolu endemiği olan *Centaurea gigantea* bitkisinin metanol ekstraktı ve bu bitkiden elde edilen klorojenik asit ve 5 flavonoidin sitotoksik aktivitesi MTT testiyle belirlenmiş, fakat flavonoidlerin sitotoksik etkisi bulunmadığı anlaşılmıştır (Shoeb ve ark. 2007). Bunun yanı sıra, bir tetrasiklik seskiterpen olan siklosativen isimli bileşik de malignan ve malignan olmayan nöron hücre soylarında zayıf sitotoksik ve genotoksik aktivite göstermiştir (Toğar ve ark. 2014). *Centaurea ainetensis* türünden biyoaktivite yönlendirmeli olarak izole edilen bir seskiterpen lakton olan Salograviolide A, bazı malignan mürin hücre soylarında yaklaşık 4 µg/ml konsantrasyonda % 50 büyüme baskılayıcı etki göstermiştir (Ghantous ve ark. 2008). Farklı türlerle yapılan çalışmalar olmakla birlikte, Zengin ve ark. (2012) *Centaurea drabifolia* türünde antioksidan kapasiteyi DPPH ve CUPRAC yöntemleriyle belirlemişlerdir.

Literatürde *Doronicum* türleriyle ilgili sınırlı sayıda yayın vardır. *Doronicum bithynicum* türünün esansiyel yağ içeriği belirlenmiş ve (E)- β -farnesene molekülünün yaklaşık % 50 oranında olduğu rapor edilmiştir (Akpınar ve ark. 2009). *Doronicum bithynicum* türüyle ilgili antikanser aktivite veya potansiyel genotoksik etkileri üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, *Doronicum orientale* ve *Doronicum hookeri* türlerinin antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır (Gupta ve ark. 2011, Karadeniz ve ark 2015).

Senecio olympicus türüne ait büyüme baskılayıcı, genotoksik/antigenotoksik ve antioksidan özelliklerin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yanında, çok sayıda farklı türün ekstraktı veya elde edilen saf moleküller sitotoksik, genotoksik ve antioksidatif aktivite yönünden araştırılmıştır. Hindistan'da yetişen *Senecio* türlerinden *Senecio chrysanthemoides*, içerdiği seneciophylline gibi toksik alkaloidler nedeniyle bölgede bulunan sığır cinsleri tarafından tüketildiğinde ölümcül olabilmektedir. Bu bitkinin etanol ekstraktı kullanılarak makrofajlar üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmış ve IC₅₀ değeri $13,8 \pm 1,1$ µg/ml olarak bulunmuştur. Ekstraktın hücrede reaktif oksijen türleri ve NO miktarını artırarak oksidatif hasara yol açtığı ve hücreyi apoptozise götürdüğü gösterilmiştir (Bandyopadhyay ve ark. 2009). *Senecio leucanthemifolius* Poiret türünün 5 ekstraktının antikanser etkileri 5 kanser hücre soyu üzerinde çalışılmıştır (Loizzo ve ark. 2005). Sitotoksik etkiler, bu bitkide de bulunduğu saptanan jakaranon bileşiğine atfedilse de ekstraktın IC₅₀ dozunda bulunan jakaranon konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle henüz tayin edilmemiş farklı bileşiklerin de sitotoksik etkiye katkıda bulundukları belirtilmiştir (Loizzo ve ark. 2005). *Senecio stabianus* Lacaita türünün metanol, n-hekzan ve etil asetat ekstraktları 4 kanser hücre soyu üzerinde denenmiş ve en etkili ekstraktın n-hekzan ekstraktı olduğu belirlenmiştir. Bu etkiye, birincil olarak n-hekzan ekstraktında yüksek oranda bulunan terpen ve yağ asidi grubundan moleküllerin neden olduğu bildirilmiştir. Bu moleküllerin bazıları tanımlanmış ve kanser hücre soylarında denenmiştir. En etkili olanının α -humulene (IC₅₀: 11,2 µg/ml) olduğu bildirilmiştir (Tundis ve ark. 2009). *Senecio brasiliensis* türünden elde edilen pirolizidin alkaloidlerin genotoksik etkileri fare kemik iliği mikronükleus testi ve insan lenfosit kültüründe mikronükleus testiyle araştırılmıştır (Santos-Mello ve ark. 2002). Bu türden elde edilen pirolizidin alkaloidlerin farelerde akut toksisiteye yol açtığı bilinmekle beraber, fare kemik iliği mikronükleus testinde

mikronükleus frekansının arttığı; ancak muhtemelen bir metabolik aktivasyon mekanizması bulunmadığı için *in vitro* lenfosit kültürü mikronükleus testinde mikronükleus frekansının değişmediği bulunmuştur (Santos-Mello ve ark. 2002). Eroğlu ve ark. (2009) yaptığı çalışmada ise *Senecio trapezuntinus* metanol ekstraktının genotoksik potansiyelini belirlemiş ve ekstraktın insan lenfosit kültürlerinde mikronükleus oluşumunu indüklediği, mitotik ve proliferasyon indekslerini düşürdüğünü saptamıştır. *Senecio gibbosus* türü etil asetat ve metanol fraksiyonlarında DPPH radikali süpürücü etkisinin yüksek olduğu gösterilmiştir (IC₅₀ sırasıyla 10 ve 22 µg/ml) (Conforti ve ark. 2006). Ayrıca, *Senecio graciliflorus* türünün çiçekli kısımlarından elde edilen esansiyel yağların antioksidan aktivitelerinin askorbik asidinkiyle karşılaştırılabilir derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Lone ve ark. 2014). *Tripleurospermum pichleri* ile ilgili sitotoksik, genotoksik ve antioksidan aktivite yönünden bir çalışma bulunmamakla birlikte özellikle İran'da yayılış gösteren *Tripleurospermum disciforme* ile ilgili bazı bilgiler vardır. Behzad ve ark. (2014), *T. disciforme* türünün sitotoksik aktivitesini 4 kanser hücre soyunda (A549, MCF-7, HepG2 ve HT-29) denemiş ve kayda değer bir sitotoksik etki saptamamıştır (IC₅₀ > 100 µg/ml). Ancak benzer bir çalışmada da aynı türün ekstraktının HT-29 hücrelerinde IC₅₀ değeri 9 µg/ml olarak sunulmuştur (Naghbi ve ark. 2014). Bu türün antioksidan aktivitesi de çalışılmış ve izole edilen bileşikler arasında luteolin, kuersetin-7-O-glikozid, kaempferol, kaempferol-7-O-glukozid, apigenin ve apigenin-7-O-glikozid gibi flavonoidlerin olduğu belirtilmiştir (Souri ve ark. 2005, Tofighi ve ark. 2015). *Tripleurospermum insularum* türünün toprak üstü kısımlarının içerik analizinde ise sırasıyla n-alkan, yağ asitleri ve seskiterpenlerin yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Cavar Zeljkovic ve ark. 2015).

2.6.3 Caryophyllaceae

Bitkilerden izole edilen saponinlerin sitotoksik etkileri hakkında pek çok çalışma yapılmıştır. Saponinler, yüksek bitkilerde bulunan, glikozit içeren, sulu çözeltileri çalkalandığında sabun benzeri köpük oluşturan geniş bir molekül grubudur (Sparg ve ark. 2004). *Gypsophila* cinsine ait türlerde yapılmış çalışmalar genellikle bitkide bulunan saponinlerin eldesi ve sitotoksik aktivitelerinin tayini üzerinedir. *Gypsophila*

arabica Barkodah türünün su ekstraktının melanom hücre soylarına karşı etkili olduğu gözlenmiştir (Sathiyamoorthy ve ark. 1999). *Gypsophila paniculata* saponinleri, triterpen yapıdaki saponinlerin bir karışımından oluşmaktadır. *Gypsophila paniculata* saponinleri, N-glikosidaz saporin ve insan epidermal büyüme faktöründen oluşan kimerik bir toksinin (Sap-EGF) sitotoksik etkisini hücre kültürü deneylerinde sinerjistik bir şekilde 100 000 kat arttırmıştır (Bachran ve ark. 2011). Benzer şekilde, *Gypsophila trichotoma* Wender. türünden izole edilen aminoasit saponinler de Sap-EGF toksiniyle kombine edilmiş ve kombinasyonun toksinin etkisini sinerjistik olarak artırdığı gösterilmiştir (Voutquenne-Nazabadioko ve ark. 2013). Ayrıca, aynı türden yeni izole edilmiş olan bir saponinin sitotoksik aktivitesi 7 kanser hücre soyu üzerinde denenerek 32,3 ve 169,0 µg/ml aralığında değişen IC₅₀ değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir (Yotova ve ark. 2012). Türkiye'nin güneybatısında bulunan *Gypsophila pilulifera* Boiss. & Heldr. türünden izole edilen bir saponinin A549 hücre soyunda (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) sitotoksik aktivite gösterdiği (IC₅₀: 16,5 µM) bulunmuştur (Arslan ve ark. 2012).

Gypsophila cinsi türleri üzerinde şu ana kadar yapılmış tek genotoksik aktivite çalışması *Gypsophila arrostii* türünden izole edilen nebuloside-A bileşiğin komet testiyle 5 µg/ml gibi düşük dozlarda gösterdiği genotoksik aktiviteyi içermektedir (Arslan ve ark. 2015). Bununla birlikte, *Gypsophila trichotoma* türünden izole edilen saponarin isimli bileşiğin kokain, parasetamol ve CCl₄ tarafından indüklenen hepatotoksisiteye karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Vitcheva ve ark. 2011, Simeonova ve ark. 2013, Simeonova ve ark. 2014).

Farklı *Gypsophila* türlerinde yapılan antioksidan testlere göre *Gypsophila arrostii*, *G. pilulifera* ve *G. simonii* türlerinin zayıf antioksidan özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır (Arslan ve Çelik 2013).

2.6.4 Ephedraceae

Ephedra campylopoda hakkında herhangi bir sitotoksik veya genotoksik aktivite çalışması bulunmasa da cins bazında yapılmış bazı çalışmalar vardır. *Ephedra aphylla* türünün su ekstraktı melanom hücre soylarına karşı denenmiş, ancak sitotoksik etkisi zayıf bulunmuştur (Sathiyamoorthy ve ark. 1999). Benzer şekilde, Kore'de geleneksel

tıpta kullanılan 80 bitkinin su ekstraktı hepatosellüler karsinom hücre soylarında denenmiş ve *Ephedra sinica* türüne ait ekstraktın düşük sitotoksik aktivite gösterdiği görülmüştür (Park ve ark. 2002). Aynı türe ait metanol ekstraktın su fraksiyonu melanom hücre soylarında yüksek bir sitotoksik aktiviteye sahip değildir; fakat sitotoksik olmayan 30 µg/ml dozunda antiinvaziv ve antianjiogenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Nam ve ark. 2003). *Ephedra* cinsine ait türler hakkında yapılmış bir genotoksisite çalışması bulunmamaktadır. Ancak, bu cinse ait türlerde ortak bir alkaloid olan ve nazal dekonjestan olarak kullanılan efedrinin genotoksik etkileri insan lenfositleri üzerinde komet testi kullanılarak araştırılmıştır ve 300 µM'a kadar yükselen dozlarda DNA hasarına rastlanmadığı için efedrinin genotoksik olmadığı sonucuna varılmıştır (Radaković ve ark. 2011). Farklı *Ephedra* türlerine ait antioksidan aktiviteler de rapor edilmiştir. Geleneksel Çin tıbbında kullanılan 56 bitkinin toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesinin belirlenip karşılaştırıldığı bir çalışmada, *Ephedra sinica* bitkisinin görece yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu söylenmiştir (Song ve ark. 2010). *Ephedra sarcocarpa* metanol ekstraktının DPPH yöntemiyle EC₅₀ değeri 5,3 mg/ml olarak bulunmuştur (Rustaiyan ve ark. 2011).

2.6.5 Fabaceae (Leguminosae)

Astragalus L. cinsi Fabaceae familyasında yaklaşık 2 000- 3 000 türle temsil edilen en büyük gruplardan biridir. Bir veya çok yıllık olabilen bu bitkiler, dünya genelinde ılıman ve kurak sayılabilecek pek çok bölgede bulunmaktadır (Podlech 2008, Banchadi ve ark. 2013). *Astragalus* cinsine ait türler geleneksel Çin tıbbında nefrit, diyabet, hipertansiyon, siroz, lösemi ve rahim kanserlerinde kullanılmaktadır (Choudhary ve ark. 2008). Bunun yanında, hepatoprotektif, immünstimulan ve antiviral özelliklere sahip oldukları da iyi bilinmektedir (Linnek ve ark. 2011). *Astragalus* türlerinde saptanan etken bileşikler özellikle saponinler, flavonoidler ve polisakkaritlerdir (İbrahim ve ark. 2013). Diğer bileşenler ise antrakınonlar, alkaloidler, aminoasitler, β-sitosterol ve bazı metal elementleri olarak sayılabilir (Li ve ark. 2014).

Astragalus sibthorpianus türü üzerinde yapılmış herhangi bir sitotoksik, genotoksik veya antioksidan aktivite çalışması bulunmamaktadır; ancak cins düzeyinde oldukça yüksek sayıda çalışma vardır. Özellikle *Astragalus* ekstraktları ve bu ekstraktlardan

izole edilen saf maddelerin antikanser aktivitelerine ilişkin literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber, izole edilen bileşenlere dair çalışmaların sayıca daha yüksek olduğu görülmektedir. Örnek olarak, *Astragalus membranaceus* türünün ekstraktından elde edilen 5 fraksiyon, 12 hücre soyu üzerinde denenmiş ve ardından aktif fraksiyon fare tümör modellerinde antitümör aktivite ve immünstimulan etki göstermiştir (Cho ve Leung 2007). Ayrıca, *Astragalus gombiformis* Pomel ekstraktı akciğer kanser hücre soylarında (A549) denenmiştir (Teyeb ve ark. 2012). Huang ve ark. (2014), *Astragalus* ekstraktının antitümör etkilerini *in vitro* ve *in vivo* araştırmış ve melanom tümör hücre büyümesini zamana ve doza bağımlı olarak baskıladığını bulmuşlardır. Ticari olarak elde edilen bir *Astragalus* ekstraktının ise antitümör aktivitesi subkutan olarak H22 hepatokarsinom hücreleri enjekte edilmiş farelerde araştırılmış ve tümör büyümesini 4-12 g/kg doz aralığında baskıladığı ve Bax/Bcl-2 oranının artmasıyla birlikte apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir (Li ve ark. 2012).

Bitkisel saponinler farmakolojik ya da biyolojik olarak birçok aktif molekül içeren geniş bir gruptur. *Astragalus* cinsine ait bitki türlerinde çeşitli saponinler bulunmaktadır ve bu moleküller son yıllarda antikanser etkileri açısından incelenmektedirler. Son 10 yılda bu ailede yaklaşık 60 adet yeni “acacic”-tip saponin keşfedilmiş ve bunlardan yaklaşık 50 tanesinin kanserle ilişkili biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir (Lacaille-Dubois ve ark. 2011). En fazla öne çıkan örneklerden biri olarak, *Astragalus membranaceus* saponinleri, HT-29 kolon kanser hücre soyunda hücre proliferasyonunu S fazında durdurarak apoptotik ölümü indüklemiştir (Tin ve ark. 2007). Tin ve ark. (2007), sonrasında *Astragalus* saponinleriyle fare zenograftlarında ortaya çıkan tümör baskılayıcı etkinin 5-FU ile karşılaştırılabilir olduğunu ve 5-FU + okzaliplatin kombinasyon tedavisinde görülen yan etkilerin görülmediğini belirtmişlerdir. *Astragalus* saponinlerinin HT-29 hücre soyunda dışsal apoptotik yolağı aktive ederek hücre ölümünü gerçekleştirdiği ve bu süreçte mTOR ve ERK yollarının, ardından NF-κB baskılanmasının rol aldığı gösterilmiştir (Auyeung ve ark. 2010). Auyeung ve ark. (2014) *Astragalus* saponinlerini farklı bir kolon kanser hücre soyunda (LoVo) vinblastin ile kombine ederek denemişlerdir. Ardından, yaptıkları tümör zenograft çalışmasında kombinasyon tedavisinin tümör büyümesini ve aynı zamanda anjiyogenezi baskıladığını tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışmada, ekstraksiyonu yapılan *Astragalus*

saponinleri, BGC-823 gastrik kanser hücre büyümesini apoptotik mekanizmalarla *in vitro* ve *in vivo* baskılamış ve invazyonu azaltıcı etki göstermiştir (Wang ve ark. 2013). Astragalus saponinlerinin, AGS gastrik kanser hücre soyu kullanılarak oluşturulan mide kanseri modelinde antianjiogenik ve antiinvazyon özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Auyeung ve ark. 2014). Ayrıca, *Astragalus stereocalyx* türünden izole edilen 6 triterpen glikozidin antiproliferatif etkileri farklı hücre soylarında denenmiş ve en etkilisinin HeLa serviks kanseri hücre soyunda 10 μ M IC₅₀ dozuna sahip olduğu bulunmuştur (Yalcin ve ark. 2012). Gulcema ve ark. (2011) *Astragalus aureus* türünden izole ettikleri 18 triterpen glikozidin antiproliferatif etkilerini araştırmışlar ve izole edilen bileşiklerde en yüksek etkiyi MCF-7 meme kanser hücre soyunda 30 μ M (IC₅₀) olarak tespit etmişlerdir.

Saponinler dışında farklı moleköl grupları da literatürde araştırma konusu olmuştur. *Astragalus mongholicus* köklerinden elde edilen bir lektinin çeşitli hücre soylarındaki antiproliferatif etkisi araştırılmış ve HeLa ve K562 lösemi hücre soylarında IC₅₀ değerleri <10 μ g/ml olduğu bulunmuştur (Yan ve ark. 2009). Ek olarak, *Astragalus membranaceus* türünden izole edilen bir lektinin, K562 hücrelerinde kaspaz-bağımlı apoptoza neden olduğu ve 15 μ g/ml gibi görece düşük bir IC₅₀ değerine sahip olduğu gösterilmiştir (Huang ve ark. 2012). Krasteva ve ark. (2010), *Astragalus corniculatus* türünün uçucu yağlarının fraksiyonlarının sitotoksik aktivitelerini 6 hücre soyunda çalışmışlardır ve en yüksek sitotoksik aktivite 24 μ g/ml IC₅₀ değeriyle SKW-3 (T-hücreli lösemi) hücre soyunda görülmüştür. Astragalus total flavonoidleri ve izoflavonoidlerden kalikosin bileşiğinin lösemi hücre soyu K562'nin büyümesini baskıladığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2012). *Astragalus complanatus* türünden elde edilen flavonoidlerin, SMMC-7721 hepatokarsinom hücrelerinin bölünmesini G0/G1 ve S evrelerinde baskıladığı ve kaspaz-bağımlı yolla apoptotik hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Hu ve ark. 2009). Bunun yanında, *Astragalus verrucosus* Moris türünden izole edilen 6 flavonoidin insan kolon ve meme kanser hücre soylarında sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmış, bunlardan 2 tanesinin apoptozisi indüklediği belirlenmiştir (Buhagiar ve ark. 2008).

Astragalus bitkisinin bazı etken maddelerinin kemoterapötik ajanlarla çeşitli kombinasyonları da araştırılmıştır. Bunlardan biri olan Astragalozid II'nin, kemoterapi ilaç direncinde önemli rol oynayan P-glikoprotein ifadesini düşürdüğü ve dolayısıyla

hepatokarsinomların tedavisinde çoklu ilaç direnç profilini tersine çevirmek için kullanılabileceği belirtilmiştir (Huang ve ark. 2012). Bunun yanında, "Astragalus polisakkaritleri" ile de son yıllarda kemosenzitiviteyi arttırmalarından ve kemoterapinin yan etkilerini azaltmalarından dolayı yoğun olarak çalışılmaktadır (Tian ve ark. 2012). Örneğin, Cao ve ark. (2014) kardiyotoksik olan doksorubisinle Astragalus polisakkaritlerini kombine ederek bu kombinasyonun kardiyomiyositler üzerindeki sitotoksik etkiyi Akt aktivasyonu ve p38MAPK inhibisyonu aracılığıyla azalttığını göstermişlerdir. Bunun yanında, Astragalus polisakkaritlerinin H22 hepatokarsinom hücreleri taşıyan farelerde antitümör aktivitenin yanı sıra, IL-2, IL-12 ve TNF- α artışıyla immünstimulan özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Yang ve ark. 2013). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarında yapılmış bir klinik çalışmaya göre, vinorelbin + sisplatin tedavisine eklenen Astragalus polisakkaritleri, sağkalım süresinde anlamlı bir artışa yol açmasa da genel yaşam kalitesi parametrelerinde anlamlı yükselme sağlamıştır (Guo ve ark. 2012). Genel olarak, çok sayıda klinik araştırmanın incelendiği bir derlemede Astragalus bitkisinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanser vakalarında platin bazlı tedavilerin etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (McCulloch ve ark. 2006).

Astragalus cinsine ait türlerde yapılmış az sayıdaki genotoksisite çalışmaları *Astragalus membranaceus* türü üzerine odaklanmaktadır. Çin geven otu kökünün (*A. membranaceus* türünün kurutulmuş kökü) S9 fraksiyonu içeren Çin hamsteri akciğer hücrelerinde, 1,25 mg/ml dozunda kromozom aberasyonlarını kısmen arttırdığı (%16) gözlenmiştir (Tadaki ve ark. 1995). Buna karşın, *in vivo* MN testiyle 2 000 mg/kg konsantrasyonun test edildiği *A. membranaceus* bitkisinin toprak üstü kısımlarında genotoksik aktivite saptanmamıştır (Park ve ark. 2014). Ayrıca, Astragalus köklerinde bulunan sikloastragenol molekülünün de 2000 mg/kg dozunda *in vivo* MN testiyle herhangi bir genotoksik etkisi olmadığı görülmüştür (Szabo 2014).

Astragalus türlerinin hem kaba ekstraktı hem de saf maddelerinin antioksidatif potansiyelleri araştırılmıştır. *Astragalus mongholicus* Bunge ekstraktının antioksidan aktivitesi DPPH testiyle $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve dolayısıyla antioksidan aktivite zayıf bulunmuştur (Yu ve ark. 2005a). *A. membranaceus* bitkisinden saflaştırılan polisakkaritlerde ise farklı testlerle antioksidan aktivite araştırılmış ve özellikle elde edilen görece düşük molekül ağırlıklı polisakkaritlerin askorbik asitle karşılaştırılabilir seviyede antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Chen ve ark. 2015).

2.6.6 Papaveraceae

Papaver pilosum türünün sitotoksik, genotoksik/antigenotoksik etkilerini araştıran veya antioksidan aktivite tayinini amaçlayan bir yayın bulunmamaktadır. Bunun yanında, *Papaver rhoeas* (gelincik) türünün sitotoksik ve genotoksik etkileri bir lenfoblastoid hücre soyunda araştırılmış ve 0,25 ve 0,5 mg/ml dozlarında herhangi bir sitotoksik veya genotoksik etki göstermediği, fakat bu etkilerin daha yüksek dozlarda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Hasplova ve ark. 2011). *P. rhoeas* bitkisinden elde edilen ve öksürük giderici olarak kullanılan noskapin bileşiğinin yeni türevleri sentezlenerek 3 kanser hücre soyu üzerinde denenmiş ve birden fazla molekülün düşük μM seviyelerinde üç hücre soyunda da etkili olduğu görülmüştür (DeBono ve ark. 2014). Bununla birlikte, aynı bitkinin yaprak ekstraktının 50 $\mu\text{g/ml}$ gibi daha düşük dozlarda insan lenfositleri üzerinde genotoksik etki ortaya koyabileceği belirtilmiştir (Gateva ve ark. 2014). *P. rhoeas* metanol ekstraktının düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (EC_{50} : 63,01 $\mu\text{g/ml}$) (El ve ark. 2004). Ayrıca, *P. rhoeas* bitkisinin farklı ekstraktlarının fenolik içerikleri ve antioksidan kapasiteleri ayrıntılı olarak incelenmiştir (Kostic ve ark. 2010, Isbilir ve ark. 2012).

2.6.7 Thymelaeaceae

Daphne cinsine ait türlerde nörotropik, antifertilite, pestisit, antihiperglisemik ve sitotoksik özellikler bulunduğu belirlenmiştir (Huang ve ark. 2012). *Daphne oleoides* ise halk arasında romatizmal ağrı ve bel ağrılarının tedavisinde kullanılmaktadır (Yeşilada ve ark. 2001). *D. oleoides* türünün içerik analizinde önceden bilinen triterpen, flavonoid, lignan ve kumarin bileşiklerin yanında 2 yeni seskiterpen ve diterpen bileşiğin tespit edildiği bildirilmiştir (Taninaka ve ark. 1999, Ullah ve ark. 1999). *Daphne oleoides* hakkında herhangi bir sitotoksik veya genotoksik aktivite çalışması bulunmamaktadır. Bununla beraber, *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* ve *Daphne oleoides* Schreber ssp. *oleoides* türlerinde hangi bileşenlerin yara iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiş ve çeşitli fraksiyonlarının antioksidan özellikleri araştırılmıştır (Süntar ve ark. 2012, Süntar ve ark. 2014). *Daphne* cinsine ait farklı türlerde ise temelinde yapılmış, çoğunlukla sitotoksik aktivite odaklı bazı çalışmalar vardır. Örneğin,

Daphne genkwa türünün tomurcuk kısmının % 95'lik etanol ekstraktından izole edilen 16 diterpen bileşiğinin (12 yeni bileşik) sitotoksik aktiviteleri araştırılmış, bunlardan en güçlü aktiviteye sahip olan bileşiğin akciğer kanser hücre soyu A549'da IC₅₀ değeri 4,2 µM olarak belirlenmiştir (Zhan ve ark. 2005). *Daphne odora* Thunb. var. *marginata* türünün gövde kabuğundan hazırlanan %75'lik etanol ekstraktından izole edilen 2 yeni fenolik bileşikten birinin 5 kanser hücre soyunda sitotoksik aktivite (IC₅₀: 3,1- 29,4 µg/ml) gösterdiği belirlenmiştir (Zhang ve ark. 2006). *Daphne giraldii* Nitsche türünün gövde kabuğundan hazırlanan % 95'lik etanol ekstraktından elde edilen 2 yeni glikozitin 4 farklı kanser hücre soyunda denenmiş ve herhangi sitotoksik etkiye (IC₅₀ > 30 µg/ml) sahip olmadıkları saptanmıştır (Su ve ark. 2008). *Daphne genkwa* türünün çiçekli kısmından elde edilen kloroform/aseton/metanol (1:1:1) ekstraktından izole edilen 2'si yeni olmak üzere 5 diterpen esterinin IC₅₀ değerleri A549 hücre soyunda 12- 53 nM aralığındayken normal akciğer hücre soyunda (MRC-5) bu değerlerin 11,1- >20 µM olduğu bulunmuştur (Hong ve ark. 2010). *Daphne feddei* türünün yaprak ve gövdesinden hazırlanan aseton ekstraktından izole edilen sekolignan, neolignan ve fenilpropanoid yapıdaki toplam 6 molekülün 4 farklı kanser tipine ait hücre soyu üzerinde 1,18 ve 11,6 µM aralığında değişen IC₅₀ değerlerine sahip oldukları gösterilmiştir (Hu ve ark. 2011, Lu ve ark. 2012). *Daphne acutiloba* Rehd. türünün etil asetat ekstraktından izole edilen 7 yeni diterpen esterinin 5 farklı kanser tipine ait hücre soyu üzerinde 4- 20 µM aralığında değişen IC₅₀ değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir (Huang ve ark. 2012).

Daphne gnidium türünün yapraklarından ardışık olarak elde edilen total oligomer flavonoid, petrol eteri, kloroform, etil asetat ve metanol ekstraktlarının SOS kromotest (*Escherichia coli* PQ37 suşu) yöntemiyle genotoksik aktiviteleri test edilmiş ve total oligomer flavonoid ekstraktı (düşük genotoksisite) dışında genotoksik etkiye rastlanmamıştır. Ayrıca, aynı yöntemle genotoksik ajanların varlığında total oligomer flavonoid, metanol, etil asetat ve kloroform ekstraktlarının antijenotoksik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (Chaabane ve ark. 2012).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitkilerin Toplanması ve Liyofilizasyonu

3.1.1 Arazi çalışmaları

Bitkilerin gelişimi dikkate alınarak 26 Temmuz ve 9 Ağustos tarihlerinde Uludağ Milli Parkı'nda, yaklaşık ~2 200 m yükseklikte iki arazi çalışması gerçekleştirildi. Bitkiler, Prof. Dr. Gürçan Güler yüz gözetiminde tanımlandı ve toplandı. Toplanan bitkiler kapalı, kuru ve doğrudan güneş ışığı görmeyen bir alanda kurutuldu. Kurutulan bitkiler doğrayıcı yardımıyla toz haline getirildi ve tartılıp kese kağıtları içinde saklandı. Toplanan bitkilerin türleri, toplandıkları bölge, toplanan kısımları ve elde edilen kuru ağırlık Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Toplanan bitkilerin türleri, toplandıkları bölge, toplanan kısımları ve elde edilen kuru ağırlıklar

Tür	Toplandığı Bölge	Toplanan Kısım	Ağırlık (g)
<i>H. humile</i>	Kuşaklıkaya – Zirve arası	Toprak üstü + toprak altı (+ çiçek + meyve)	125,5
<i>O. caespitosum</i>	Kuşaklıkaya – Zirve arası	Toprak üstü (+ çiçek + meyve)	30,4
		Toprak altı	49,0
<i>A. multifida</i>	Oteller bölgesi	Toprak üstü*	101,4
<i>C. drabifolia</i>	Kuşaklıkaya – Zirve arası	Toprak üstü + Toprak altı (+ çiçek + meyve)	51,5
<i>D. bithynicum</i>	Beden Terbiyesi telesiyej yakınları ve Kırkpınarlar mevkii	Toprak üstü (+ meyve)	204,8
<i>S. olympicus</i>	Beden Terbiyesi telesiyej yakınları	Toprak üstü	115,8
<i>T. pichleri</i>	Mandıra telesiyej yakınları	Toprak üstü + toprak altı	86,3
<i>G. olympica</i>	Kuşaklıkaya – Zirve arası	Toprak üstü (+çiçek + meyve)	103,3
<i>E. campylopoda</i>	Kırkpınarlar mevkii	Toprak üstü	67,4
<i>A. sibthorpianus</i>	Kırkpınarlar mevkii	Toprak üstü	197,3
<i>P. pilosum</i>	Beden Terbiyesi telesiyej yakınları	Toprak üstü	84,7
		Meyve	20,9
		Çiçek	13,8
<i>D. oleoides</i>	Kırkpınarlar mevkii	Toprak üstü	106,1

* : gövde + yaprak

3.1.2 Bitkilerin Ekstraksiyonu ve Liyofilizasyonu

Ekstrakt hazırlama çalışmaları için her bitkiden 30 g tartıldı. Birden fazla çözgen kullanıldı ve soxhlet (Behr Labor Technik, Düsseldorf, Almanya) cihazıyla ardışık ekstraksiyon gerçekleştirildi. Her çözgen için ekstraksiyon aşamasında 150 ml hacim kullanıldı. Ekstraksiyon işleminin ardından evaporatör yardımıyla çözgen buharlaştırıldı. Aynı bitkiye ait farklı çözgenlerle elde edilen bütün ekstraktlar 100 ml hacimli polipropilen bir kapta birleştirilerek liyofilizasyon aşamasına kadar -80 °C'de saklandı. Ekstraksiyon parametreleri Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Bitkilerden ekstrakt eldesinde işlem sıralarına göre kullanılan çözümler ve ekstraksiyon süreleri

Tür	Çözgen	Süre (saat)
<i>H. humile</i>	n-Hekzan	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>O. caespitosum</i> (toprak altı)	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>O. caespitosum</i> (toprak üstü)	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>A. multifida</i>	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>C. drabifolia</i>	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>D. bithynicum</i>	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>S. olympicus</i>	n-Hekzan	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>T. pichleri</i>	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>G. olympica</i>	Metanol	24
	H ₂ O	8
	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
<i>E. campylopoda</i>	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8

Çizelge 3.2. Bitkilerden ekstrakt eldesinde işlem sıralarına göre kullanılan çözümler ve ekstraksiyon süreleri (devam)

Tür	Çözgen	Süre (saat)
<i>A. sibthorpianus</i>	Metanol	24
	H ₂ O	8
	n-Hekzan	3
	Kloroform	10
<i>P. pilosum</i>	n-Hekzan	12
	Kloroform	12
	Metanol	24
	H ₂ O	8
<i>D. oleoides</i>	Metanol	24
	H ₂ O	8
	n-Hekzan	12
	Kloroform	12

Polipropilen kaplarda kalan çözgeni de uzaklaştırmak için bütün örnekler liyofilize edilmek üzere liyofilizatöre (Christ, Osterode am Harz, Almanya) yerleştirildi. Liyofilizasyon işlemi 48 saat -50 °C’de kurutma (main drying) ve 24 saat -60 °C’de son kurutma (final drying) basamaklarıyla tamamlanarak bitkilere ait ekstraktlar toz haline getirildi. Toz haline getirilen ekstraktlar -80 °C’de saklandı.

3.2 Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması ve Kansere Hücrelerinin Üretilmesi

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre soyları kontrollü şartlar altında üretilerek hücre kültürü çalışmaları yürütüldü. Hücrelerin 37 °C’de, % 5 CO₂’li ortamda tek tabaka kültür (monolayer) şeklinde büyümeleri sağlandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları için % 5 fetal bovine serum (FBS) ve % 1 Penisilin-G (100 U/ml) - Streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI1640, MCF10A içinse DMEM:Ham’s F12 (1:1), 5% FBS, %1 Penisilin-G (100 U/ml) - Streptomisin (100 µg/ml), EGF (20 ng/ml), kolera toksin (10 ng/ml) ve insülin (0,12 IU/ml) besiyerleri kullanıldı.

3.2.1 Besiye Değişimi ve Hücre Soylarının Pasajlanması

Besiye değişimi her 2-3 günde bir gerçekleştirildi (75 cm² hücre kültür kapları için). Besiye tamamen aspire edilip yaklaşık 2-3 ml PBS ile yıkandı. Sonrasında üzerine 12-

15 ml besiyeri eklenip inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin pasajlanması, konfluensinin (hücre kültür kabı yüzeyinin hücrelerce kaplanma oranı) yaklaşık % 80 olduğu noktada gerçekleştirilir. Pasaj işleminde, PBS yıkamasının ardından 75 cm² hücre kültür kaplarına yaklaşık 1 ml % 0,05 Tripsin-EDTA eklenip inkübatöre (Sanyo, Japonya) kondu. İnkübasyon süresi MCF-7 ve MDA-MB-231 için 5 dk iken MCF-10A hücrelerinde ilk olarak 1 dk beklenip tripsin aspire edildikten hemen sonra tekrar eklenmesiyle 15 dk olarak optimize edilmiştir. Ardından, 15 ml'lik santrifüj tüplerine ilave edilen yaklaşık 10 ml besiyerinin üzerine hücre kültür kaplarının yüzeyinden ayrılmış olan tripsin içindeki hücreler eklenerek 230 g'de 5 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edildi ve peletin üzerine yaklaşık 1-2 ml besiyeri eklendi. Yeni besiyeriyle geri ekilen hücre 1/3- 1/6 oranında değişti.

3.2.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi

Stoklama amaçlı olarak veya belli bir zaman aralığında kullanılmayacak hücreler dondurulup uygun bir zamanda çözülerek kullanılabilir. Konfluensi % 100'e yaklaştığında pasaj işlemi gerçekleştirildi, ancak son adımda besiyeri yerine hücre dondurma işlemine uygun % 10 FBS ve % 10 DMSO içeren DMEM besiyeri kullanıldı. 75 cm² hücre kültür kabı için hücrelerin tamamı toplam 4 adet 2 ml hacimli "cryovial" tüplere transfer edildi ve hızlıca -80 °C'de donduruldu.

Hücrelerin çözülmesi için -80 °C derin dondurucudan çıkarılan "cryovial" tüpler, içinde kaynar su bulunan kaplar içinde bekletildi ve donmuş olan hücrelerin çözülmesi sağlandı. Sıvı hızlıca içinde hücre soyuna uygun besiyeri bulunan santrifüj tüpüne aktarılarak 230 g'de 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında 1 adet 25 cm² hücre kültür kabına yaklaşık 5 ml toplam hacimde hücrelerin tamamı ekildi.

3.2.3 Hücre Sayımı

Hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra besiyeri ile sulandırıldı. hücre süspansiyonundan 10 µl örnek 96 kuyucuklu mikropalakada bir kuyucuğa pipetlendi. Üzerine 10 µl tripan mavisi ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Hematositometreye eklenen bu karışım iki alanda sayılarak 1 ml hücre süspansiyonundaki hücre sayısı hesaplandı.

3.2.4 Ekstrakt Çözeltilerinin Hazırlanması ve Saklanması

-80 °C'de saklanan ekstraktlar mikrokaşık ile en az 10 mg alınıp bijou üzerine eklenerek hassas tartıda (Shimadzu, Japonya) tartıldı, 100 mg/ml olacak şekilde DMSO ile sulandırıldı ve 5 dk sonikasyon yardımıyla örneklerin tamamen çözünmesi sağlandı. Böylece, 200 µg/ml çözeltide DMSO oranı 1:500, 100 µg/ml çözeltide DMSO oranı 1:1000 olarak belirlendi. Besiyeriyle yapılan seyreltmelerde her hücre soyuna uygun olan besiyeri kullanıldı.

3.3 Hücre Canlılık Testleri

Hücre canlılığının ölçümü için ilk olarak sulforodamin B (SRB) testi uygulandı. Ardından, en yüksek canlılık inhibisyonu gösteren bitki ekstraktları için ATP testi kullanıldı. Burada, ilk adımda sulforodamin B testi kullanılarak düşük maliyetle bir tarama çalışması gerçekleştirildikten sonra, ikinci adım olarak ATP testi ile % canlılığın yüksek hassasiyetle belirlenmesi hedeflendi.

3.3.1 Sulforodamin B Testi

1990 yılında geliştirilen ve in vitro sitotoksosite tarama çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden biridir (Skehan ve ark. 1990). Yöntemin prensibi, trikloro asetik asit (TCA) ile sabitlenmiş hücrelerin protein içeriğine SRB'nin asidik koşullarda bağlanabilmesine dayanır. SRB, asidik pH'ta bazik aminoasitlere bağlanır ve bazik ortamda tekrar çözünerek hücre miktarına bağlı olarak kolorimetrik bir ölçüm yapılmasına olanak verir (Horobin ve Kiernan 2002). Parlak pembe renkteki SRB'nin yapısındaki iki sülfonik grup bazik aminoasitlere bağlanan kısımdır. Yaklaşık 20 katlık hücre sayısı artışlarında dahi sonuçlarda lineerlik gözlenmektedir (Vichai ve Kirtikara 2006). SRB genellikle yine kolorimetrik bir test olan MTT ile kıyaslanmıştır. MTT'nin prensibi metabolik aktiviteye dayandığından ve SRB yönteminde ölü hücreler de boyandığından SRB'nin ne ölçüde doğru sonuç verebileceği bir soru işareti yaratmıştır, ancak SRB ve MTT test sonuçlarının oldukça korale olduğu görülmüştür. Böyle bir deney kurgusuyla test edilen maddelerin IC₅₀ değerlerinin SRB testi sonucunda kısmen

daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Rubinstein ve ark. 1990, Perez ve ark. 1993, Haselsberger ve ark. 1996). Sonuç olarak, SRB yöntemi düşük maliyetli, hızlı çalışılabilen fakat yüksek hassasiyete sahip olmayan bir yöntemdir.

SRB testi için MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre soyları kullanılmıştır. Hücreler, Çizelge 3.2’de de belirtilen bütün ekstraktlarla muamele edilmişlerdir. Bütün ekstraktlar 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,13 µg/ml konsantrasyonlarda seri dilüsyonla 3 tekrarlı ve 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalara uygulandı. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37 °C, % 5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu yöntem her hücre soyunda 3 bağımsız tekrar ile çalışıldı. Negatif kontrol için 200 µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. Kör (blank) olarak kullanılacak kuyucuklara ise sadece 200 µl besiyeri eklendi. Inkübasyon sonrasında mikropalakalara ters çevrilerek içeriği atıldı. Her kuyucuğa 100 µl % 10’luk TCA pipetlendi. Mikroplaka 4 °C’de 1 saat inkübe edildi. Plate ters çevrilerek içeriği atıldı. Her kuyucuk 200 µl deiyonize H₂O ile 5 defa yıkandı. Her yıkama sonunda plate ters çevrilerek içeriği atıldı. % 0,4 (w/v) SRB çözeltisinden her kuyucuğa 100 µl pipetlendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika beklendikten sonra mikropalaka ters çevrilerek içeriği atıldı. Her kuyucuk 100 µl % 1’lik (v/v) asetik asit çözeltisiyle 5 defa yıkandı. Her yıkama sonunda mikropalaka ters çevrilerek içeriği atıldı. Kuyucuklar tamamen kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 µl, 10 mM tris bazı pipetlendi. Karıştırıcıda (shaker) 10 dakika boyunca 600 rpm devirde mikropalakalar çalkalandı. Optik yoğunluk (abs) 564 nm dalgaboyunda ELISA mikropalaka okuyucusunda (FLASH Scan S12, Analytik Jena, Almanya) ölçüldü. % canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Abs}(564)_{\text{ekstrakt}} - \text{Abs}(564)_{\text{kör}}) / (\text{Abs}(564)_{\text{kontrol}} - \text{Abs}(564)_{\text{kör}}) \times 100$$

3.3.2 ATP Hücre Canlılık Testi

In vitro koşullarda kültüre edilen ökaryotik hücreler kapalı bir sistemde homeostazı sürdürürken görece sabit ATP düzeylerine sahiptirler. Hücre ölümü sürecinde hücrede ATP sentezi mümkün olmazken kalan ATP de ATPazlar tarafından sindirilir.

Dolayısıyla, pek çok koşulda örneklerin ATP miktarının ölçümü canlı hücre sayısı hakkında geçerli bir fikir verir (Crouch ve ark. 1993, Andreotti ve ark. 1995).

ATP miktarının ölçümü ateş böceğinde (*Photinus pyralis*) bulunan lusiferaz enziminin ürettiği ışık sinyallerine dayanır. Yöntem ilk kullanıldığında doğrudan ateş böceğinden elde edilen lusiferaz ile substratı olan lusiferinin biraraya getirildiği, fakat bir kaç saniye boyunca ışık üretebilen bir reaksiyon oluşturabiliyordu (Niles ve ark. 2008). Ancak günümüzde lusiferaz reaksiyonunu optimize edecek tamponların kullanılması ve yönlendirilmiş evrim ile stabil lusiferaz enzimlerinin eldesi yöntemin oldukça gelişmiş ve güvenilir olmasını sağlamıştır (Niles ve ark. 2008). Mikroplakalarda kullanılan hücre canlılığı test sistemleri içinde en hassasıdır ve hücrelerde arkaplan oluşturabilecek bir biyoluminesans olmadığından 10'dan az hücre dahi tespit edilebilmektedir (Niles ve ark. 2008). Ayrıca, test maddeleriyle interferans riskinin de düşük olduğu bir yöntemdir. Lusiferaz reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir:



ATP canlılık testi kolorimetrik yöntemlere göre daha hassas ve güvenilir olduğu için SRB yönteminden sonra elde edilen sonuçlar en etkili 2 ekstrakt için doğrulanmıştır. ATP testi için, *A. multifida* ve *A. sibthorpius* 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,13 µg/ml konsantrasyonlarda seri dilüsyonla 3 tekrarlı ve 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrolakalara uygulandı. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37 °C, % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu yöntem her hücre soyunda 2 bağımsız tekrar ile çalışıldı. Negatif kontrol için 200 µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. Inkübasyon sonrasında ATP kitinin içinde yer alan hücre lizis tamponu kullanılarak (50 µl/kuyucuk) hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresini takiben, 50 µl hücre süspansiyonu beyaz renkli 96 kuyucuklu ekim kaplarına aktarıldı ve ardından 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren çözelti ilave edildi. Reaksiyon sonunda oluşan ATP miktarı (lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla), ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, Winooski, USA) kullanılarak

ölçüldü. Böylece, % canlılık grafiği RLU değerleri baz alınarak oluşturuldu. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ canlılık} = (\text{RLU}_{\text{uygulanan kuyucuk}} - \text{RLU}_{\text{MI}}) / (\text{RLU}_{\text{negatif kontrol}} - \text{RLU}_{\text{MI}}) \times 100$$

3.4 İkili Boyamayla Hücre Ölüm Modunun Belirlenmesi

İkili boyama yönteminde kullanılan floresans boyalar DNA'ya bağlanır uygun dalgaboyundaki ışınlarla uyarıldıklarında nükleusu görünür kılarlar. Böylece nükleus morfolojisi incelenerek hücre ölüm modu belirlenebilir.

Hoechst 33342 canlı, apoptotik veya nekrotik tüm hücreleri boyayabilir. Apoptotik hücreler kromatin kondensasyonu veya sonrasında gerçekleşen nükleus fragmentasyonu ile tanımlanabilirler (Oberhammer ve ark. 1994). Yoğun bir nükleus kondensasyonu gerçekleşmesi ise piknozis olarak tanımlanır ve piknotik nükleus görece küçük olmasından dolayı daha yoğun floresans ışıma yapar (Burgoyne 1999). Apoptozisin geç dönemlerinde (sekonder nekrozis) hücre membran bütünlüğü bozulur. Hücreyi bu evrede tanımlamak için membran bütünlüğü bozulmamış hücreye nüfuz edemeyen bir floresans boya, propidyum iyodür (PI) kullanılabilir. Esas olarak PI, hem nekrozis hem de sekonder nekrozisi tanımlamak için kullanılır. PI ile boyanan hücrenin nekrotik veya sekonder nekrotik olduğunu anlamak için Hoechst 33342 boyamasında apoptotik hücre özelliklerinin görülüp görülmediği yorumlanır. Eğer piknotik nükleus veya nükleus fragmentasyonu mevcutsa söz konusu hücre sekonder nekrotiktir. Nekrotik bir hücre nükleusu ise genellikle normal hücrelere göre kısmen daha büyük olmasıyla ve daha zayıf floresans ışıma yapmasıyla tanımlanabilir. Onkozis sürecinde hücre ile birlikte nükleusun da hacimce büyümesi (şişmesi) söz konusudur.

İkili boyama yöntemi için, *A. multifida* ve *A. sibthorpius* 100, 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,13 µg/ml konsantrasyonlarda seri dilüsyonla 100 µl/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrotiplalara pipetlendi. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ilave edildi. Sonrasında hücreler, 48 saat 37 °C'de ve % 5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her bir kuyucuğa PBS çözeltisinde hazırlanan Hoechst 33342 için son konsantrasyonu 5 µg/ml ve PI için son konsantrasyonu 1 µg/ml olarak seyrelmiş

floresans boyalar eklendi. Mikroplaka 30 dk 37 °C’de inkübe edildikten sonra floresans ataçmanlı faz kontrast mikroskopta (Olympus CKX41) 100× büyütmede kuyucukların aynı bölgesinden temsili fotoğraflar çekildi.

3.5 Genetik Toksikoloji Test Sistemleri

3.5.1 Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

Sonraki yıllarda hasarlı DNA görüntüsünün kuyruklu yıldız benzemesinden dolayı komet testi adını alan mikrojel elektroforez kavramı, ilk olarak 1984 yılında DNA süper-kıvrımlarının gevşemesine neden olan tek-zincir kırıklarının ölçen bir metod olarak Ostling ve Johanson (1984) tarafından sunulmuştur. Ardından, Singh ve ark. (1988) bu yöntemi alkali koşullarda (pH > 13) uygulayarak modifiye etmişlerdir. Buradaki hedef, agaroz jel içine gömülmüş hücrelerin her birinde DNA zincirinin göçünü tespit etmek üzere DNA jel elektroforezi ve floresans mikroskobiyi birleştirmektir (Olive ve Banath 2006). Böylece, eğer DNA hasar almışsa gevşeyen süper-kıvrımlardan serbesti kazanan DNA kırık uçları kısa bir elektroforez sürecinde anoda doğru hareket eder. DNA’nın elektroforetik koşullardaki göçü, fragment büyüklüğü ve DNA kırık uçlarının sayısına bağlıdır ki bu kırık uçlar daha büyük boyutta DNA’ya bağlı olsalar dahi kısa bir mesafe katedip “komet kafa”sından ayrılabilirler (Fairbairn ve ark. 1995). Düşük kırık sayısında komet kafasının uzaması (stretching) söz konusudur, ancak DNA kırık sayısı arttıkça serbest kalan DNA fragmentleri daha uzak mesafelere göç ederek elektroforez sırasında DNA hareketine hakim olan temel kuralları teşkil ederler (Fairbairn ve ark. 1995). Sonuç olarak, migrasyon yapan DNA miktarını ölçebilmek aynı zamanda DNA kırıklarının sayısını da belirlemek anlamına gelmektedir. Kuyruktaki DNA miktarını ve dağılımını tanımlayan kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki % DNA, komet testinde kullanılan temel tanımlayıcı ifadeler olmuşlardır (Olive ve Banath 2006).

Komet testi DNA kırıklarını ölçebildiği için yeni farmasötik veya kimyasal maddelerin genotoksik etkilerini değerlendirmek üzere yapılan standart test sistemleri içinde yerini almıştır (Hartmann ve ark. 2003, Collins 2004). Ayrıca, bu yöntemle DNA hasar tamirinin ölçülmesi de mümkündür; böylece fitokimyasalların potansiyel antigenotoksik etkilerini inceleme imkanı da doğar (Duthie ve Dobson 1999, Collins 2004).

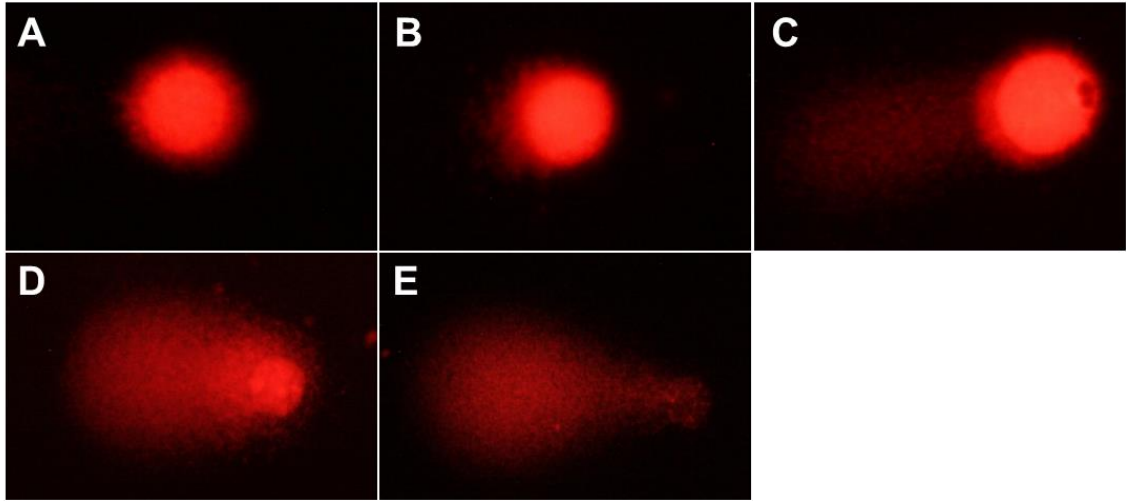
Bu yöntemin en önemli avantajları yüksek duyarlılıkla düşük düzeydeki DNA hasarlarını saptayabilmesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede uygulanabilirliği ve düşük maliyetidir (Tice ve ark. 2000). Buna karşın, kullanılacak konsantrasyonların yüksek oranda apoptotik veya nekrotik dozlar olması testten doğru sonuç alınmasına engeldir (Olive ve Banath 2006).

İlk olarak 6 kuyucuklu mikropalakalarda her bir kuyucuğa MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre soylarının herbirinden 1 ml’de 5×10^5 hücre ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra, son konsantrasyon *A. multifida* ve *A. sibthorpius*’nin IC_{50} dozları olacak şekilde bu kuyucuklara *A. sibthorpius* veya *A. multifida* içeren besiyerlerinden 1 ml eklendi. Ayrıca, her hücre soyu için sisplatin (CDDP) literatürde kullanılan IC_{50} dozları (MCF-7 için 70,0 μ M, MDA-MB-231 için 100,0 μ M ve MCF-10A için 52,2 μ M) seçilerek uygulandı (Tassone ve ark. 2003, Chen ve ark. 2013). CDDP, DNA-DNA-zinciriçi çapraz bağlar (intrastrand crosslink) oluşturan genotoksik bir ajan olduğu için pozitif kontrol olarak kullanıldı (Cepeda ve ark. 2007).

Alkali komet testi Singh ve ark. (1988)’ın yönteminde bazı modifikasyonlarla birlikte gerçekleştirildi (Çelikler Kasımoğulları ve ark. 2014). Kullanılacak lamalar deney öncesi % 1’lik Normal Erime Noktalı (NMP) agar ile kaplandı ve etiketlendi. Uygulama süreleri, kontrol grubu için 4 saat, ekstrakt grupları için kısa ve uzun süreli maruziyet sonuçlarını belirlemek için 4 ve 24 saat şeklinde seçildi. Süre sonunda hücreler tripsinize edilerek 300 μ l PBS eklendi ve hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonu 60 μ l’de 3×10^4 hücre olacak şekilde seyreltildi. Bu hücre süspansiyonu üzerine % 1’lik 160 μ l Düşük Erime Noktalı (LMP) agar eklendi. Bu şekilde LMP agar konsantrasyonu % 0,65’e düştü. Hızlıca 100’er μ l hacimde hücre süspansiyonu üzerinde NMP bulunan lamalar üzerine eklendi. Lamalar 20×40 mm lameller ile kapatılarak +4 °C’de 15 dk bekletilerek jelin katılaşması sağlandı. Sonrasında, lameller kaldırılarak lamalar +4 °C’de içinde lizis çözeltisi (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM tris bazı, % 1 Triton X-100, % 10 DMSO; pH 10) bulunan şalelere yerleştirildi ve karanlıkta gece boyunca bekletildi. Ertesi gün, lamalar içinde soğuk elektroforez tamponu çözeltisi (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA; pH > 13) bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Lamalar bu çözeltide DNA sarmalının açılması (unwinding) için 15 dk bekletildi. Tankın çevresine buz aküleri yerleştirilerek elektroforez sırasında sıcaklığın yükselmemesi hedeflendi. Yürütme işlemi 25 V ve 300 mA’de 30 dk sürdürüldü. Yürütmenin ardından tanktan

alınan lamalar pH'ın dengelenmesi için +4 °C'deki nötralizasyon tamponuna (0,4 M tris bazı; pH 7,5) yerleştirildi. Son olarak dH₂O ile yıkanan lamalar kurumaya bırakıldı.

Mikroskopik inceleme, Novel N-800M floresans ataçmanlı faz kontrast mikroskopta ×200 büyütmede BP 546/10 nm filtre kullanılarak gerçekleştirildi. Son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür lam üzerine pipetlendi ve 20×20 lamel kapatıldı. Her bir deney grubu için 50 nükleus sayıldı ve fotoğraflandı. Fotoğraflar, Kameram 21 (Mikrosistem, İstanbul, Türkiye) yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirmede komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kafa % DNA, Olive kuyruk moment, genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre yüzdesi verilerinden yararlanıldı. Hasar tiplendirmesi Şekil 3.1'deki gibi yapıldı.



Şekil 3.1. Komet testiyle mikroskopik inceleme sonucu karşılaşılan hasar tipleri: (A) Tip 0, (B) Tip 1, (C) Tip 2, (D) Tip 3, (E) Tip 4. Hasarsız hücreler Tip 0 olarak tanımlanır. İsimlendirme DNA hasarının artmasıyla birlikte Tip 1'den Tip 4'e devam eder

Genetik Hasar İndeksi (GHİ) şu formüle göre hesaplandı (Anderson ve ark. 1994):

$$GHİ = (1 \times \Sigma_{Tip1}) + (2 \times \Sigma_{Tip2}) + (3 \times \Sigma_{Tip3}) + (4 \times \Sigma_{Tip4}) / (\Sigma_{Tip0} + \Sigma_{Tip1} + \Sigma_{Tip2} + \Sigma_{Tip3} + \Sigma_{Tip4})$$

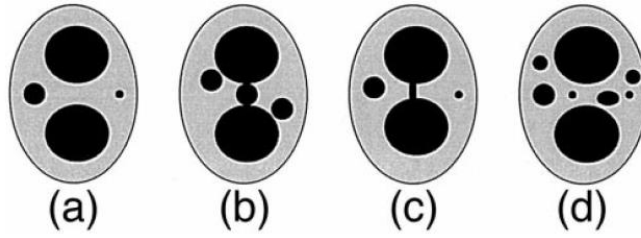
Hasarlı Hücre Yüzdesi (HHY) Formülü (Anderson ve ark. 1994):

$$\% \text{ Hasarlı Hücre} = \Sigma_{Tip2} + \Sigma_{Tip3} + \Sigma_{Tip4} / (\Sigma_{Tip0} + \Sigma_{Tip1} + \Sigma_{Tip2} + \Sigma_{Tip3} + \Sigma_{Tip4})$$

3.5.2 Mikronükleus (MN) Testi

Mikronükleus varlığı kromozom kırıkları ve/veya bütün bir kromozom kaybını gösterir (Fenech 2000). Kromozom kırıkları, hasar tamiri yapılmamış veya yanlış yapılmış DNA zincir kırıklarından ileri gelebilir (Savage 1993). Hücre bölünmesi gerçekleştiğinde bu asentrik kromozom(lar) veya iç ipliklerine tutunmayan kromozom(lar) hücre kutuplarına doğru hareket edemez. Telofaz evresinde bu yapıların da çevresinde nükleus membranı oluşur ve kromozom yapısı çözülerek (uncoil) interfaz nükleusuna benzer, ancak daha küçük bir nükleus oluşturur (mikronükleus). Farklı genotoksik çıktılar olarak, nükleus tomurcukları (nuclear bud, Nbud) gen amplifikasyonunu, nükleoplazmik köprüler ise hatalı onarılan telomer kaynaşmalarını gösterir (Fenech ve ark. 2003, Fenech 2007).

Mikronükleus yönteminin geçmişi 1950’li yıllara kadar dayandırılabilir, ancak mitojenle uyarılmış lenfositlerde kromozomal hasarı ölçmek için uygulamak ilk olarak Fenech ve Morley (1985) tarafından teklif edilmiştir. Bu yöntemde hücrelerin ilk mitoz bölünmede tutuklanmaları ve ardından oluşan mikronükleus yapılarının gözlenmesi hedeflenmiştir. Sitokinez aşamasında mitoz bölünmenin sitokalazin B maddesi tarafından bloklanması yöntemin tekrarlanabilirliğini yükselten ve yaygın laboratuvar kullanımına sokan önemli bir noktadır. Mikronükleus testi günümüze değin özellikle sonuçlarının değerlendirilmesi, skorlama yapılması anlamında gözden geçirilmiş ve bir konsensüs sağlanması için “HUMAN MicroNucleus Project” çalışması gerçekleştirilmiştir (Bonassi ve ark. 2001, Fenech ve ark. 2003). Ayrıntılı bir protokol sunduğu çalışmasında Fenech (2007) mikronükleus testini oldukça kapsamlı bir test sistemi olarak ortaya koymuş ve “sitokinez-bloklı sitom testi” olarak isimlendirmiştir. Bu test ile mikronükleus, nükleoplazmik köprüler ve nükleus tomurcukları (Nbud) gibi genotoksik hasar parametrelerinin yanı sıra apoptozis ve nekrozis gibi sitotoksik parametrelerinin ve hücrelerin bir, iki veya daha fazla nükleus içermelerinde göre sitostatik etkilerin ölçümü de mümkündür (Fenech 2007). Şekil 3.2’de (A) 1/3 ve 1/9 nükleus çapında 2 adet mikronükleus içeren hücre. (B) Nükleusa temas eden ancak üst üste çakışmayan mikronükleuslar (C) Nükleoplazmik köprüyle bağlı iki nükleus ve 2 mikronükleus. (D) Ender görülen fakat çeşitli büyüklüklerde 6 mikronükleus içeren hücre gösterilmiştir.



Şekil 3.2. MN yapılarının farklı şematik görünüşleri (Fenech 2000)

Mikronükleus skorlama kriterlerine dikkat etmek testin tekrarlanabilirliği ve skorlayıcı arası farkları minimuma indirmek için önem arz eder. Bu nedenle, doğru binükleer hücrelerin seçilmesi ve mikronükleus skorlamasının doğru yapılması için Fenech (2007) tarafından maddelenen kriterlere uyulmuştur:

- Mikronükleus yalnız binükleer hücrelerde skorlanmıştır.
- Binükleer hücre nükleusları aynı hücre membranı sınırlarında bulunmalı ve parçalanmamış hücre membranına sahip olmalıdır.
- Binükleer hücre nükleuslarının boyutları birbiriyle aynı veya yakın olmalı, boyanma yoğunlukları benzer olmalıdır.
- Binükleer hücrelerin birbirine temas etmeleri istenen bir durum değildir ancak böyle bir durumda her iki nükleusun da sınırla belli olmalıdır.
- Mikronükleus çapı, nükleus çapının 1/3'ünden büyük olmamalıdır. Aksi durumda ayrı bir nükleus olarak kabul edilir.
- Mikronükleus boyanma şekli nükleus ile aynı olmalıdır (örneğin artefaktlardan ayırt edilebilmesi için daha parlak veya yansıtıcı özellikte olmamalıdır)
- Mikronükleus nükleusa temas edebilir ancak sınırları belli olmalıdır ve nükleusla bağlantısı olan bir yapı olmamalıdır.

Şekil 3.3'te sitokinez safhasında çoklu nükleus içeren hücreler görülmektedir. Fotoğraflar % 5'lik giemsa boyamasının ardından Novel N-800M faz kontrast mikroskopta 400× büyütmede çekilmiştir.

Mikronükleus testiyle ayrıca Nükleus Bölünme İndeksi (NDI) de hesaplanabilir. Bunun için, en az 500 hücre sayılarak mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücreler not edilir ve oranları belirlenir. Bu sayede canlı hücrelerin proliferatif durumu

hakkında bilgi sahibi olunur. Dolayısıyla, bu parametrenin sitostatik etki için bir gösterge olduğu bildirilmiştir (Fenech 2007).



Şekil 3.3. Sitoklazim B ile bloklanmış hücre bölünmesi. Mo: mononükleer, Bi: binükleer, Tr: trinükleer, Te: tetranükleer hücre (400×)

Hücre ekimi 6 kuyucuklu mikropalakalarda her kuyucuğa 1 ml’de $2,5 \times 10^5$ MCF-7, MDA-MB-231 veya MCF-10A pipetlenerek gerçekleştirildi. Hücre ekiminin ertesi günü 1 ml hacimde ve son konsantrasyonları karşılık gelen hücre soyundaki IC_{50} değerleri olacak şekilde *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* içeren besiyeri ilave edildi. Çözgen kontrol olarak 1:1000 oranında DMSO kullanıldı. Aynı zamanda, bütün deney gruplarına eşzamanlı olarak son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitoklazim B eklendi. Sitoklazim B konsantrasyonu genel olarak 3 µg/ml olarak seçilse de 6 µg/ml dozu da yaygındır (Bonassi ve ark. 2001). Mikropalakalar 48 saat 37 °C, % 5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler tripsinize edildi. Aspirasyon sonrasında hücre peleti üzerine 150 µl PBS eklendi ve hücreler 2 kez 1 ml’lik enjektörden geçirildi. Sonrasında 150 µl’lik hacimden 50 µl çekildi ve hücrelerin şişmesini sağlamak amacıyla 450 µl hacmindeki hipotonik 65 mM KCl çözeltisine ilave edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Ardından hipotonik çözeltide 20 dk oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda hücre süspansiyonu ikiye bölünerek (2×500 µl) 600 rpm hızda 4 dk boyunca sitosantrifüj edildi. Böylece, hücrelerin sitosantrifüj kasetleri içine yerleştirilmiş lam üzerine yapışmaları ve bu yüzeyde yayılarak nükleus yapılarının ve anomalilerin boyama sonrası net olarak görünmesi kolaylaştırıldı. Lam yüzeyine yapışan hücreler -20 °C’de soğutulmuş % 90’lık metanol ile oda sıcaklığında 8 dk tespit işlemi yapıldı (Dhawan ve ark. 2003).

Mikroskopik inceleme, Novel N-800M floresans ataçmanlı faz kontrast mikroskopta 400× büyütmede BP 546/10 nm filtre kullanılarak gerçekleştirildi. Son konsantrasyon 2 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür lam üzerine pipetlendi ve 20×40 lamel kapatıldı.

Burada ayrıca mikronükleus testinde geleneksel olarak giemsa boyaması yapıldığını, ancak akridin oranj gibi floresans boyaların da benzer hatta daha yüksek performans gösterdiği belirtmek gerekir (Hayashi ve ark. 1983). Skorlama için MN testinde her deney grubunda 2000 binükleuslu hücre sayıldı. MN skorlama için Fenech (2007) tarafından belirlenen kriterler dikkate alındı. NDI belirlemek için ise her deney grubunda toplamı 1000 olmak üzere mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücreler sayıldı. NDI aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Fenech 2007):

$$NDI = (1 \times \Sigma_{N1} + 2 \times \Sigma_{N2} + 3 \times \Sigma_{N3} + 4 \times \Sigma_{N4}) / (\Sigma_{N1} + \Sigma_{N2} + \Sigma_{N3} + \Sigma_{N4})$$

NDI: nükleus bölünme indeksi, N1: mononükleer, N2: binükleer, N3: trinükleer, N4: tetranükleer.

3.6 Hematoksilen Boyama

Hematoksilen, *Haematoxylon campechianum* bitkisinden elde edilen bazik bir boyadır. Bu özelliğiyle DNA ve RNA gibi asidik yapılara bağlanarak koyu mavi-mor olarak boyar. Hematoksilen histoloji, histokimya, histopatoloji ve sitolojide en yaygın olarak kullanılan boyadır (Avwioro 2011). Histolojide genellikle bir sitoplazma boyası olan eosin ile birlikte kullanılır. Hematoksilen nükleik asitler dışında kullanılan mordana göre lipid, karbonhidrat veya fibrin gibi hücre dışı yapıların ve aynı zamanda parazitlerin boyanmasında kullanılabilir (Avwioro 2011). Hematoksilen bir nükleus boyası olarak uzun zamandır mitotik indeks belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntemle benzer olarak proliferatif aktivite için histolojide Ki-67 kullanılmaktadır ve buna ek olarak fosforillenmiş histon H3 önerilmiştir (Brenner ve ark. 2003). Hematoksilen ve eosin boyası kullanılarak yapılan boyamaların ise zaman alan ve uzmanlık gerektiren yöntemler olduğu belirtilmiştir (Brenner ve ark. 2003).

İlk olarak 6 kuyucuklu mikrolakaların her bir kuyucuğuna etil alkolde steril edilmiş 22×22 mm lamel steril bir pens yardımıyla yerleştirildi. Her kuyucuğa 1 ml'de $2,5 \times 10^5$ MCF-7, MDA-MB-231 veya MCF-10A hücresi ekildi. Hücre ekiminin ertesi günü 1 ml hacimde ve son konsantrasyonu 3,13, 6,25, 12,5, 25 ve 50 µg/ml olacak şekilde *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* içeren besiyeri ilave edilerek mikrolakalar 48 saat 37 °C,

% 5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. 100 µg/ml dozu her iki bitki için de toksik etkisinden dolayı kullanılmadı.

Süre sonunda besiyeri aspire edilerek kuyucuklar PBS ile yıkandı. Ardından -20 °C'de soğutulmuş % 90'lık metanol ile hücreler oda sıcaklığında 8 dk tespit işlemi yapıldı. Metanol çözeltisi aspire edilip hücreler PBS ile yıkandıktan sonra lamel üzerine 200 µl hematoksin eklendi ve 2 dk beklendi. Kuyucuklar hematoksin aspire edildikten sonra seri şekilde 3 kez dH₂O ile yıkandı. Lameller bir enjektör ucu yardımıyla kaldırılıp kurutuldu ve bir damla gliserol damlatılmış lam yüzeyine kapatıldı.

Mikroskobik incelemeler Novel N-800M faz kontrast mikroskopta 400× büyütmede gerçekleştirildi ve hücreler fotoğraflandı. MCF-10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde mitotik indeks ve multinükleus parametreleri incelendi. MCF-7 hücrelerinde ise hücre nükleus/sitoplazma oranı yüksek olduğundan multinükleus parametreleri değerlendirilmeyip mitotik indeks incelendi. Hücrelerin sayımı 10 adet rastgele alan seçilerek yapıldı ve toplam hücre sayının 500'ün altında olması halinde farklı alanlardan bu sayının üzerine çıkıncaya kadar sayım yapıldı. Belirlenen mitotik figürler profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez olarak ayrıca kaydedildi. Hücre sınırları belli ve diğer hücrelerden ayırt edilebilen hücreler arasından çift veya daha fazla nükleusa (multinükleasyon) sahip olan hücreler sayıldı.

3.7 Antioksidan Kapasiteyi Belirlemeye Yönelik Testler

3.7.1 DPPH Testi

Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından geliştirilen ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH') serbest radikalinin antioksidan moleküllerce süpürülmesinin ölçümüne dayanan bir metottur. DPPH azot atomunda eşleşmemiş bir valens elektronu bulunan görece kararlı bir serbest radikal moleküldür (Sharma ve Bhat 2009). Bu yöntemin bitki ekstraktlarında yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir (Katalinic ve ark. 2006). Yüksek DPPH radikali süpürme aktivitesi, bitki ekstraktlarının fenolik bileşenlerce zenginliğini yansıtmaktadır (Dudonne ve ark. 2009).

DPPH testi ucuz ve seri olarak gerçekleştirilebilen bir testtir. Ancak bazı dezavantajları da vardır. DPPH testi pek çok laboratuvar da kullanıldığı için farklı laboratuvar

gruplarının yaptıkları modifikasyonlar nedeniyle deneyler arası karşılaştırmalar güçtür (Sharma ve Bhat 2009). DPPH testinde DPPH konsantrasyonu, test süresi, reaksiyon ortamı olarak etanol veya metanolün kullanılması gibi parametrelerdeki farklılıklar Sharma ve Bhat (2009) tarafından dile getirilmiştir. Ayrıca, reaksiyon ortamında kullanılan etanol veya metanol gibi çözümler fizyolojik koşullarla uyumlu olmayan bir durum yaratmaktadır.

DPPH yöntemi Molyneux (2004) tarafından ayrıntılı biçimde incelenmiş ve çalışmalarda ölçüme ve ölçümlerin yorumlanmasına dair tavsiyeler yer almıştır. DPPH testi bu tavsiyelere göre optimize edildi. İlk olarak, liyofilizatlardan en az 10 mg ve üzeri ağırlıklarda tartım yapıldı. Bitki ekstraktı çözeltileri DMSO antioksidan özellik gösterdiği için 1 mg/ml stok konsantrasyonda etanol:H₂O (1:1) çözümlerinde hazırlandı (Sanmartin-Suarez ve ark. 2011). Çözeltiler 5 dk sonikasyona tabi tutuldu. Referans çözeltiler olarak askorbik asit, gallik asit ve troloks seçildi. Bu maddeler için de 1 mg/ml stok konsantrasyonu etanol:H₂O (1:1) çözümlerinde hazırlandı. Her deney öncesi kullanılan bütün çözeltiler antioksidan aktivite kaybına karşılık taze olarak hazırlandı. DPPH testinde 3 bağımsız deney, 96 kuyucuklu mikrolakaların 90° çevrilerek kullanılmasıyla gerçekleştirildi (geleneksel olarak kullanılan satır ve sütunlar yer değiştirdi). Bütün kuyucuklara 100 µl hacimde etanol:H₂O (1:1) eklendi. Mikrolakanın ilk satırına 100 µl hacminde 1 000 µg/ml'lik ekstrakt çözeltisi veya referans madde eklenip mikrolakanın ilk 11 satırı kullanılarak seri dilüsyon yapıldı. Böylece, konsantrasyon aralığı 0,49- 500 µg/ml olarak gerçekleşti. Son satır negatif kontrol (DPPH kontrol) olarak belirlendi. Ardından her kuyucuğa, 100 µl metanol içerisinde çözülmüş DPPH, son konsantrasyonu 0,1 mM olacak şekilde pipetlendi. Mikrolakalar ısıtıcılı çalkalayıcıda 600 rpm'de 30 dakika 37 °C'de inkübe edilerek absorbans değeri 517 nm dalgaboyunda ELISA mikrolaka okuyucuda (FlashScan S12, Almanya) okundu. Absorbans/konsantrasyon grafiği çizildi ve öncelikle lineer artışın olduğu değerler belirlendi. Buna göre oluşturulan eğri denkleminde ekstraktın hangi konsantrasyonun DPPH serbest radikalinin yarısını temizlediği hesaplandı (IC₅₀).

3.7.2 CUPRAC Testi

Apak ve ark. (2004) tarafından geliştirilen bu yöntemle, antioksidan testlerin birbiriyle korelasyonlarının düşük olması ve özellikle besinler için kapsayıcı bir “antioksidan aktivite indeksi”nin oluşturulamaması nedeniyle basit, uygulanabilir ve kapsayıcı bir test ortaya koymak hedeflenmiştir. Bu yöntemde polifenolik maddelerin bakır(II)-neokuproin [Cu(II)-Nc] çözeltisini okside edici bir ajan olarak kabul edip reaksiyona girerek bakır(II) iyonunu indirgemeleri söz konusudur Apak ve ark. (2004). CUPRAC ismi de “bakır indirgeyici antioksidan kapasite” tanımının kısaltması olarak verilmiştir. İndirgeme reaksiyonu sonucu oluşan renkli Cu(I)-Nc şelatı spektrofotometrik olarak 450 nm dalgaboyunda ölçülür (Apak ve ark. 2008). Yöntemin avantajları olarak kullanılan çözeltilerin ve reaksiyon sonucu oluşan yapının görece kararlı olması, kolay uygulanabilir ve hava, güneş ışığı, nem ve bir dereceye kadar pH gibi olumsuz etki yaratabilecek parametrelere karşı duyarlı olmaması ve absorbans-konsantrasyon eğrisinin diğer testlere göre daha geniş bir aralıkta lineer olması sayılabilir (Apak ve ark. 2008).

Apak ve ark. (2004) tarafından deney tüplerine uygun olarak geliştirilen yöntem 96 kuyucuklu mikropalakalara uyarlandı. İlk olarak, liyofilizatlardan en az 10 mg ve üzeri ağırlıklarda tartım yapıldı. Bitki ekstraktı çözeltileri DMSO antioksidan özellik gösterdiği için 1 mg/ml stok konsantrasyonda etanol:H₂O (1:1) çözgeninde hazırlandı (Sanmartin-Suarez ve ark. 2011). Çözeltiler 5 dk sonikasyona tabi tutuldu. Referans çözeltiler olarak askorbik asit, gallik asit ve troloks seçildi. Bu maddeler için de 1 mg/ml stok konsantrasyonu etanol:H₂O (1:1) çözgeninde hazırlandı. Her deney öncesi kullanılan bütün çözeltiler antioksidan aktivite kaybına karşılık taze olarak hazırlandı. CUPRAC testinde 3 bağımsız deney, 96 kuyucuklu mikropalakaların 90° çevrilerek kullanılmasıyla gerçekleştirildi (geleneksel olarak kullanılan satır ve sütunlar yer değiştirdi). Bütün kuyucuklara 55 µl hacimde etanol:H₂O (1:1) eklendi. Mikroplakanın ilk satırına 55 µl hacminde 1 mg/ml’lik ekstrakt çözeltisi veya referans madde eklenip mikroplakanın 12 satırı da kullanılarak seri dilüsyon yapıldı. Böylece konsantrasyon aralığı 0,49-1 000 µg/ml olarak gerçekleşti. CUPRAC testinde kullanılması gerekli diğer çözeltiler olan CuCl₂, NH₄Ac ve neokuproin çözeltileri taze hazırlanıp eşit hacimlerde karıştırıldı ve her kuyucuğa bu çözeltiden 150 µl pipetlendi. Mikroplakalar

ısıtıcılı çalkalayıcıda 600 rpm’de 60 dakika 37 °C’de inkübe edilerek absorbens değeri 450 nm dalgaboyunda ELISA mikropłaka okuyucuda (FlashScan S12, Almanya) okundu. Absorbans/konsantrasyon grafiği çizildi ve öncelikle lineer artışın olduğu değerler belirlendi. Buna göre bir eğri denklemi oluşturuldu. Troloks içeren 1 mg/ml çözeltiye karşılık gelen absorbens değeri hesaplanarak bu değeri elde etmek için karşılık gelen bitki ekstrakt çözelti konsantrasyonları karşılık gelen eğri denklemleri kullanılarak hesaplandı. Böylece CUPRAC antioksidan kapasitesi, 1 µg troloks aktivitesine karşılık gelen ekstrakt çözelti aktivitesi olarak µg cinsinden belirlendi (µg troloks eşdeğeri / µg ekstrakt).

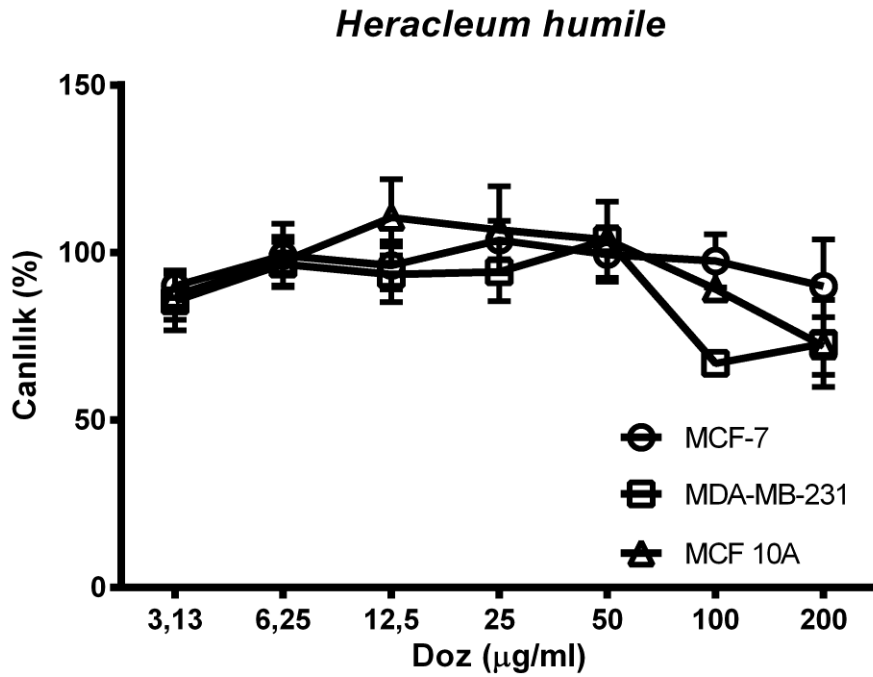
3.8. İstatistikî Analiz

İstatikî analizler SPSS 22.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama ve standart sapma veya standart hata olarak verildi. Her bir parametrenin normal dağılım analizleri yapılarak uygun parametrik veya non-parametrik istatistik analizler uygulandı. Parametrik testlerden One way ANOVA, non-parametrik testlerden ise Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Fark grupları homojenite testi sonuçlarına göre Tamhane’s T2 testine göre $p < 0,05$ anlamlılık seviyesinde verildi. Grafikler Microsoft Office Excel 2013 ve GraphPad Prism 6 yazılımları kullanılarak hazırlandı. IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında Microsoft Office Excel 2013 yazılımında yer alan tahmin fonksiyonu kullanıldı. Hata çubukları komet testi grafiklerinde standart hata, diğeri bütün testlerde standart sapma olarak gösterildi. Grafiklerin üzerindeki istatistikî değerlendirmeler yine SPSS 22.0 paket bilgisayar programı kullanılarak yapıldı.

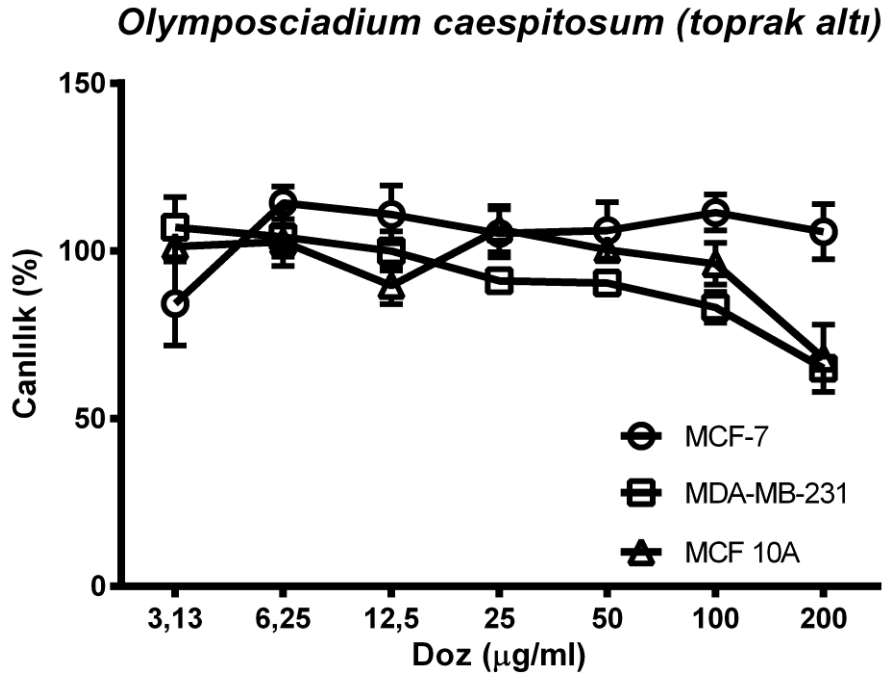
4. BULGULAR

4.1 Sulforodamin B Testiyle Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Taranması

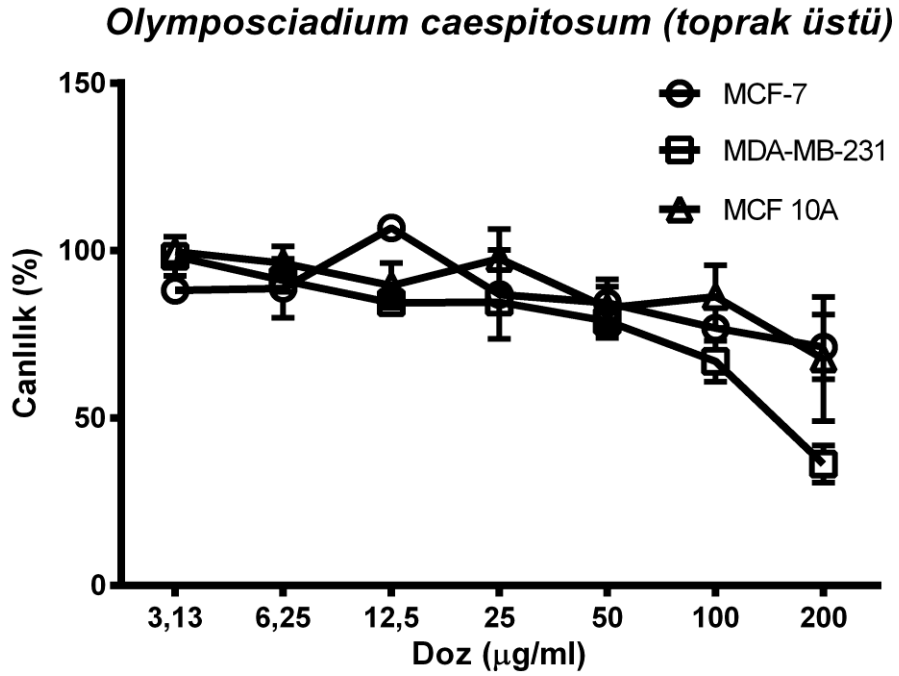
Büyüme baskılayıcı etkileri yüksek olan ekstraktları saptamak üzere ilk olarak SRB testi gerçekleştirilmiştir. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde ve 48 saatlik zaman aralığında, bazı ekstraktlar doza bağımlı olarak büyüme baskılayıcı etkiler göstermişlerdir. *H. humile* (Şekil 4.1), *O. caespitosum* toprak altı kısımları (Şekil 4.2), *G. olympica* (Şekil 4.9) ve *E. campylopoda* (Şekil 4.10) ekstraktları kullanılan bütün dozlarda büyüme baskılayıcı etki göstermemişlerdir. Buna karşılık, *O. caespitosum* toprak üstü kısımları (Şekil 4.3), *D. bithynicum* (Şekil 4.6), *S. olympicus* (Şekil 4.7) ve *T. pichleri* (Şekil 4.8) ekstraktları sadece 100 veya 200 µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda aktivite göstermişlerdir. Daha düşük konsantrasyonlarda büyüme baskılayıcı etkileri olan ekstraktlar *A. multifida* (Şekil 4.4), *C. drabifolia* (Şekil 4.5), *A. sibthorpianus* (Şekil 4.11) ve *P. pilosum* (Şekil 4.12) ekstraktları olarak kaydedilmiştir.



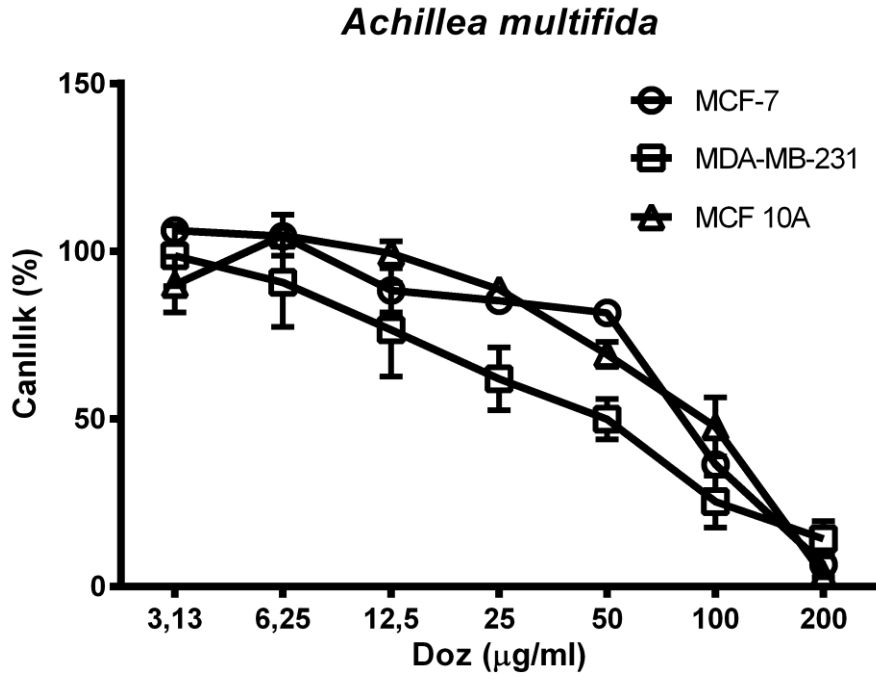
Şekil 4.1. *H. humile* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



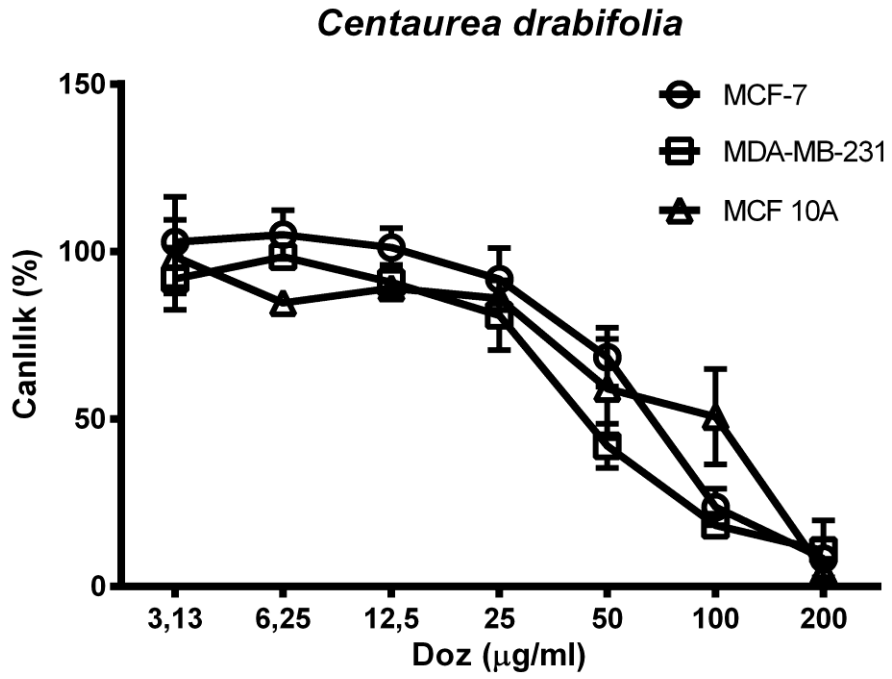
Şekil 4.2. *O. caespitosum* toprak altı kısımları ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



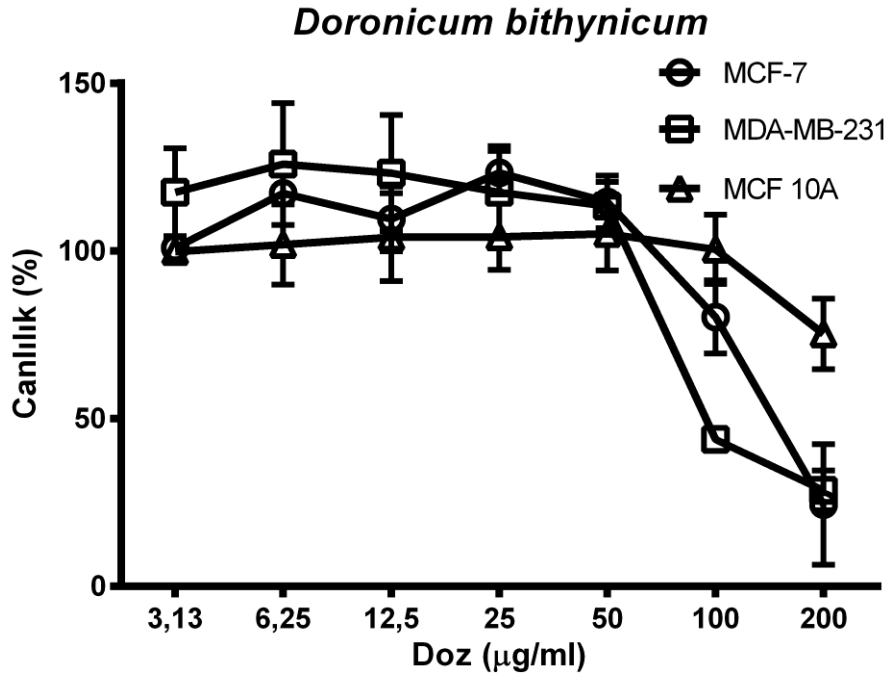
Şekil 4.3. *O. caespitosum* toprak üstü kısımları ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



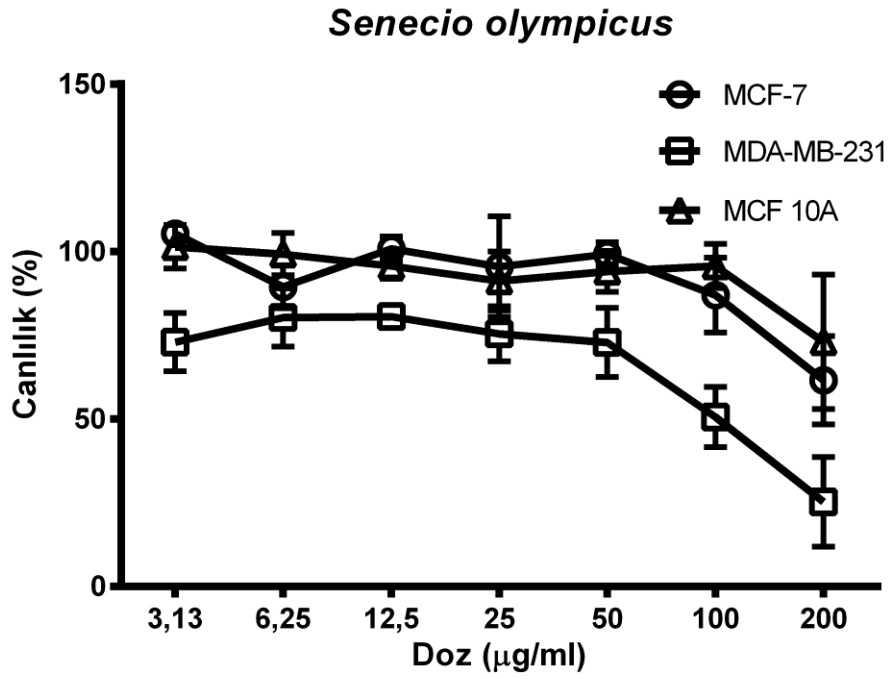
Şekil 4.4. *A. multifida* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



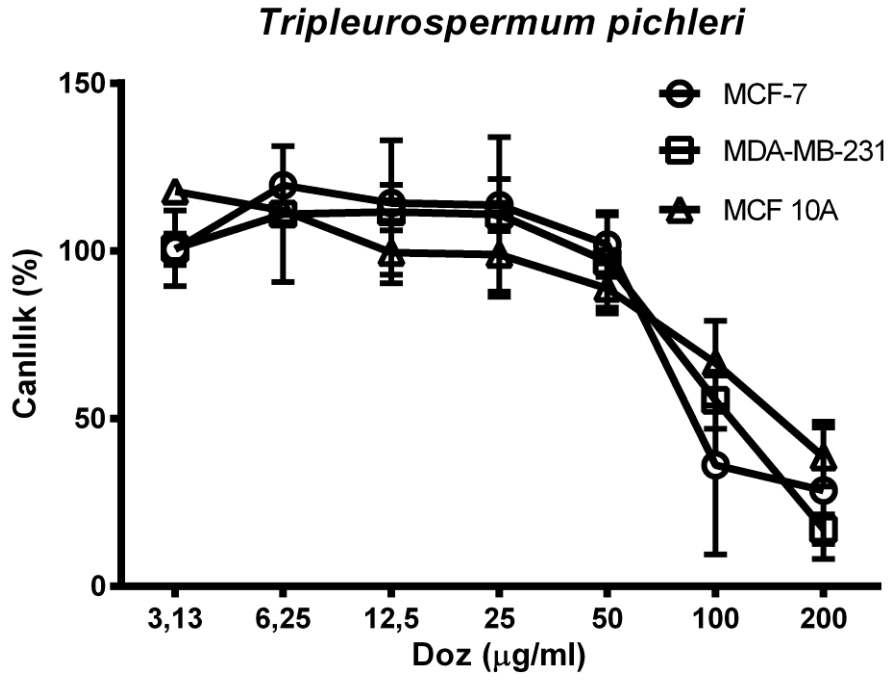
Şekil 4.5. *C. drabifolia* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



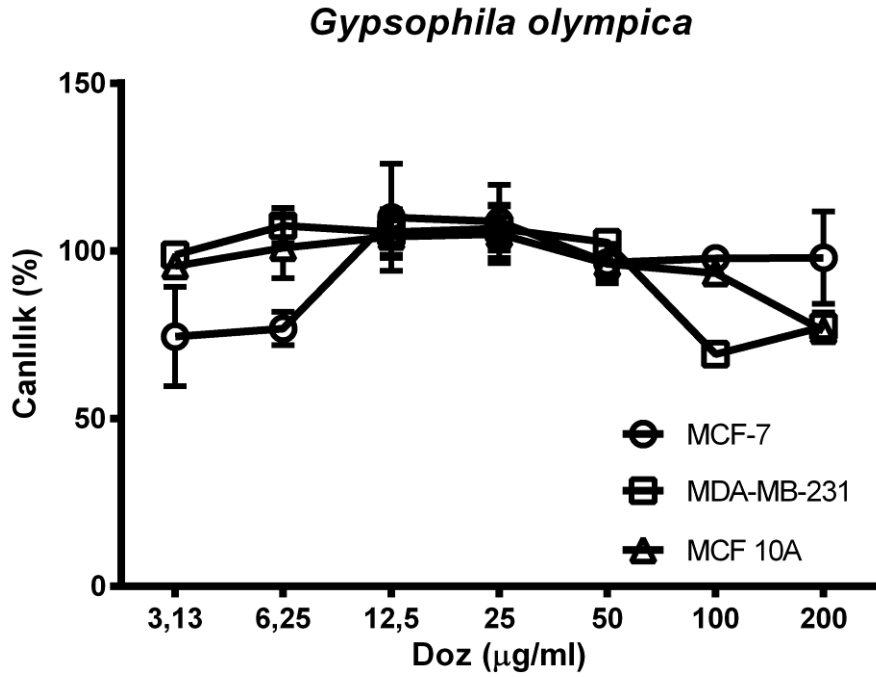
Şekil 4.6. *D. bithynicum* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



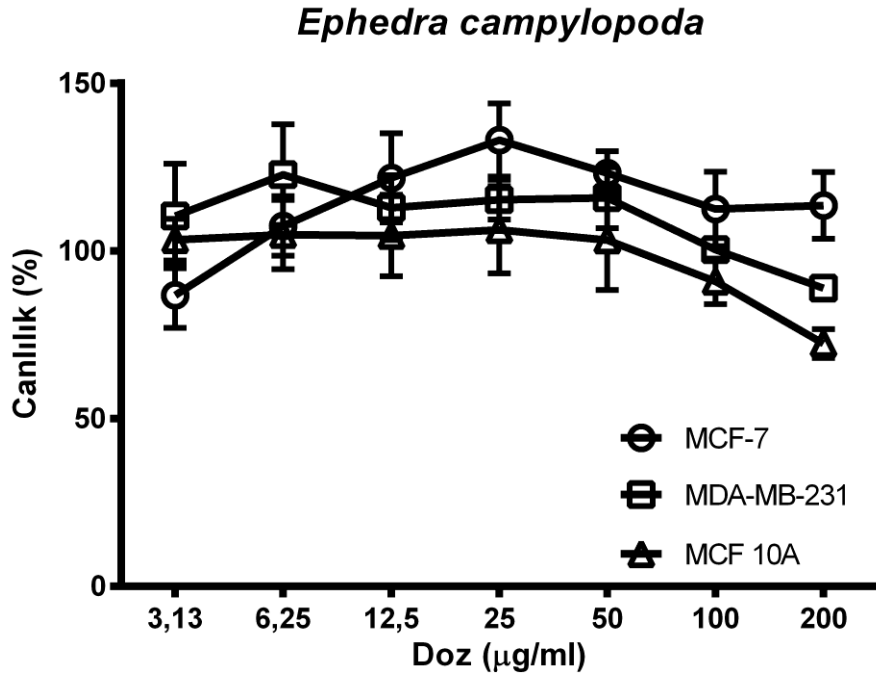
Şekil 4.7. *S. olympicus* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



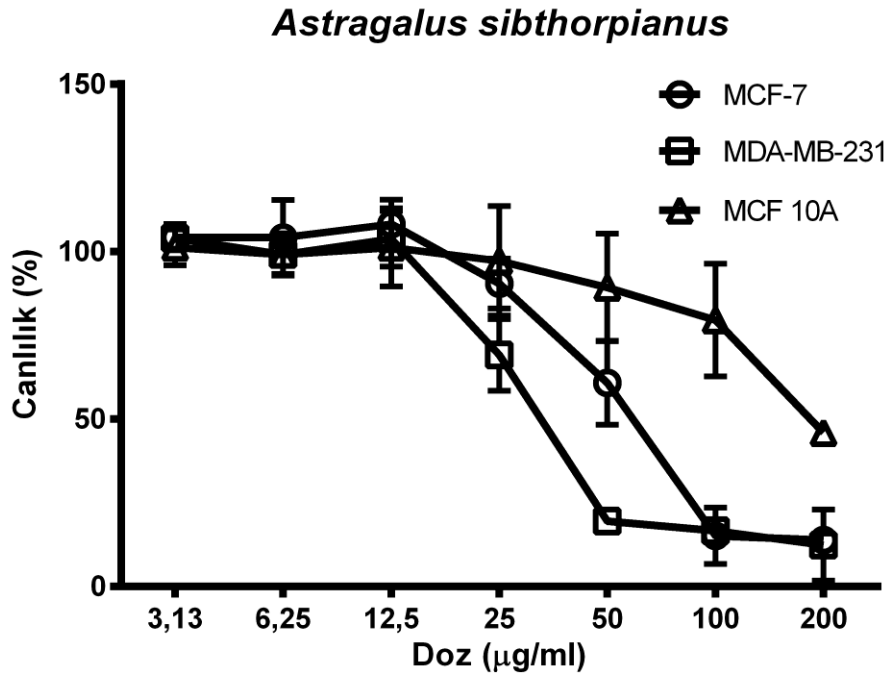
Şekil 4.8. *T. pichleri* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



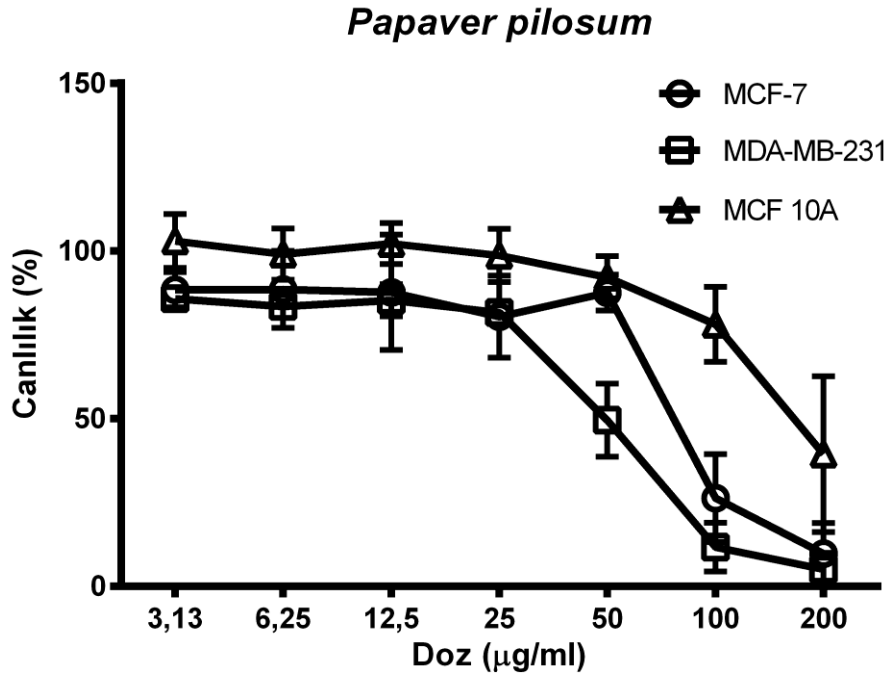
Şekil 4.9. *G. olympica* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



Şekil 4.10. *E. campylopoda* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



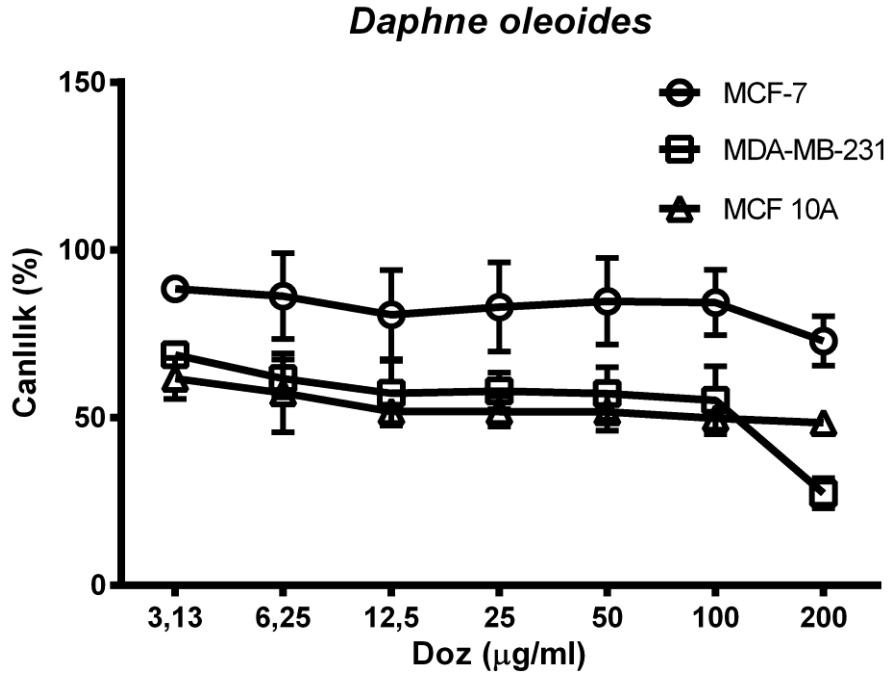
Şekil 4.11. *A. sibthorpius* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



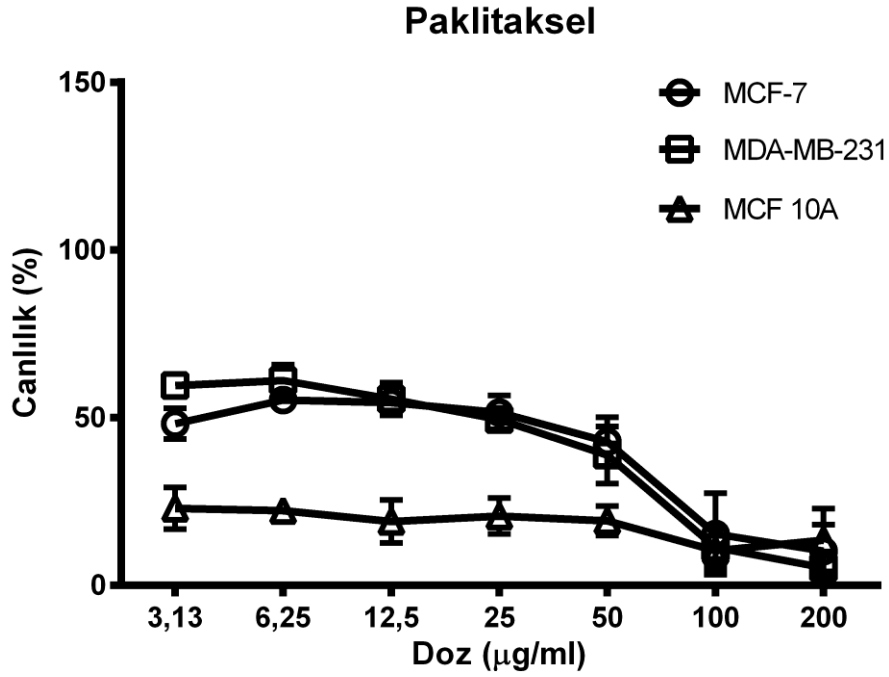
Şekil 4.12. *P. pilosum* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi

Hücre büyümesini baskılayan ekstraktlarda geleneksel sitotoksosite eğrisi gözlenmiştir; ancak *D. oleoides* ekstraktı, ilginç bir şekilde uygulandığı dozdan bağımsız olarak antiproliferatif ölçekte değerlendirilebilecek bir etki göstermiştir (Şekil 4.13). Doğal bir antikanser bileşik olan paklitakselin hücre büyümesini baskılayıcı etkileri Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Bütün ekstraktlara ve paklitaksele ait IC₅₀ değerleri Çizelge 4.1'de belirtilmiştir. SRB hücre canlılık testine göre 48 saatlik uygulama sonucu MCF-7, MDA-MB-231 kanser hücrelerinde en düşük IC₅₀ değerine sahip ekstrakt *A. sibthorpianus* ekstraktı olarak belirlenmiştir. Ekstraktın malignan olmayan MCF-10A hücrelerinde büyüme baskılayıcı etkisini görece yüksek dozlarda göstermesi de dikkat çekicidir. Diğer etkili ekstraktlar ise *A. multifida*, *C. drabifolia* ve *P. pilosum* ekstraktlarıdır. Bu ekstraktların etki düzeyleri birbirine yakındır. Mikroskopik incelemede, *A. multifida* ekstraktının IC₅₀ değerinin hesaplanandan daha düşük dozlarda olabileceği düşünüldüğünden sonraki deneylerde *A. multifida* seçilmiştir. Diğer ekstraktların IC₅₀ değerleri 100 µg/ml üzerindedir ve bir kısmının belirlenen doz aralığının dışındadır (IC₅₀ > 200 µg/ml). Hücre soyları içinde genel olarak MDA-MB-231 ekstrakt uygulamasına daha duyarlı olan hücre soyudur. MCF-10A ve kanser hücre

soyları arasındaki IC₅₀ değerleri kıyaslandığında katlık farklar *A. sibthorpianus* dışında sadece *P. pilosum* ekstraktında görülmektedir.



şekil 4.13. *D. oleoides* ekstraktının SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi



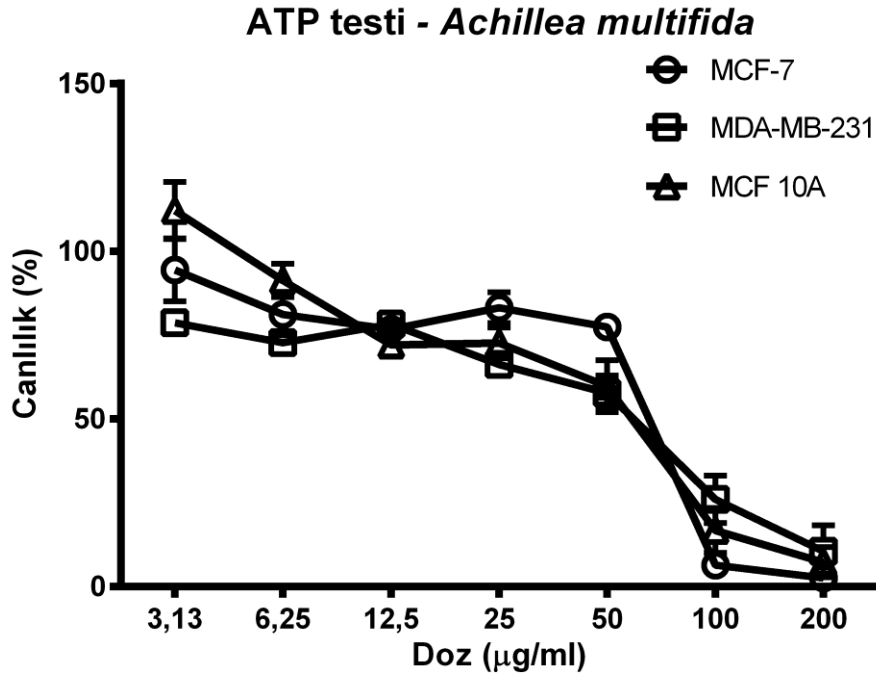
şekil 4.14. Paklitakselin SRB testi ile % canlılık üzerine etkisi

Çizelge 4.1. *A. multifida* ve *A. sibthorpius*'un SRB testine göre hesaplanan IC₅₀ değerleri

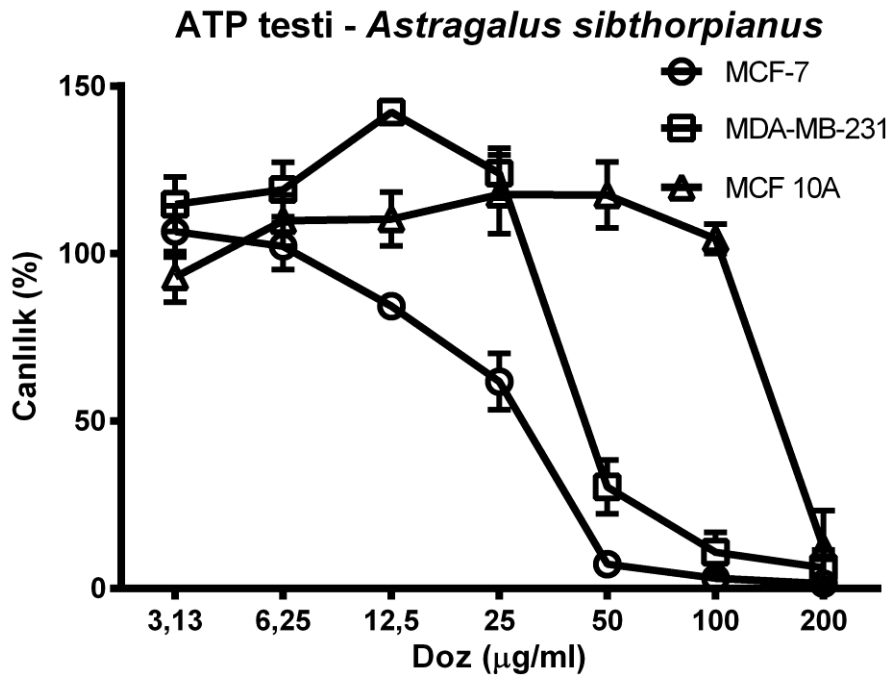
Ekstrakt	IC ₅₀		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
<i>H. humile</i>	> 200	> 200	> 200
<i>O. caespitosum</i> toprak altı kısımları	> 200	> 200	> 200
<i>O. caespitosum</i> toprak üstü kısımları	> 200	155,18	> 200
<i>A. multifida</i>	85,03	49,93	94,52
<i>C. drabifolia</i>	70,65	44,86	101,49
<i>D. bithynicum</i>	154,22	95,56	> 200
<i>S. olympicus</i>	> 200	102,32	> 200
<i>T. pichleri</i>	89,49	114,27	159,13
<i>G. olympica</i>	> 200	> 200	> 200
<i>E. campylopoda</i>	> 200	> 200	> 200
<i>A. sibthorpius</i>	61,83	34,64	187,94
<i>P. pilosum</i>	80,68	49,65	172,57
<i>D. oleoides</i>	> 200	118,68	95,51
Paklitaksel	29,44	23,80	< 3,13

4.2 ATP Testiyle *A. multifida* ve *A. sibthorpius* Ekstraktlarının Sitotoksik Aktivitelerinin Doğrulanması

Çalışılan ekstraktlar içinde en etkili olan *A. sibthorpius* ve *A. multifida* ekstraktlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri daha hassas bir yöntem olan ATP hücre canlılık testiyle belirlenmiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Her iki ekstrakt da doza bağımlı olarak hücre büyümesini baskılayıcı yönde etki göstermişlerdir. İstisnai olarak, *A. sibthorpius* 12,5 µg/ml dozunda ve MDA-MB-231 hücrelerinde proliferatif bir etki göstermektedir. Ancak, % 100'ün üzerinde olan hücre canlılığı, yüksek bir eğimle azalarak 25-50 µg/ml doz aralığında % 50 canlılığın altına düşmüştür.



Şekil 4.15. *A. multifida* ekstraktının ATP testi ile % canlılık üzerine etkisi



Şekil 4.16. *A. sibthorpius* ekstraktının ATP testi ile % canlılık üzerine etkisi

Grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. *A. sibthorpius* ekstraktı her hücre soyunda farklı bir sitotoksosite eğrisi oluştururken *A. multifida*

ekstraktının çizdiği profil hücre soyları arasında herhangi bir ayırım yapmadığı yönündedir. Genel olarak, SRB ve ATP testi sonuçlarının birbirine yakın olduğu ve ATP testiyle elde edilen IC₅₀ değerlerinin kısmen daha düşük olduğu belirtilebilir (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *A. multifida* ve *A. sibthorpianus*'un ATP testine göre hesaplanan IC₅₀ değerleri

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)		
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A
<i>A. multifida</i>	69,34	62,18	61,30
<i>A. sibthorpianus</i>	30,41	44,75	158,94

4.3 İkili Boyama Yöntemiyle *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* Ekstraktlarının Apoptotik Etkilerinin Araştırılması

A. multifida ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının apoptotik etkilerini tespit etmek için Hoechst 33342 ve propidyum iyodür boyama yöntemi kullanılmıştır. Ekstraktlar SRB ve ATP testlerinde kullanılan konsantrasyonlarda ve 48 saat süreyle hücre soylarına uygulanmış; böylece hücre canlılığında doza bağımlı olarak görülen değişimlerin hangi hücre ölüm modları aracılığıyla gerçekleştiği araştırılmıştır. *A. multifida* ekstraktıyla MCF-7 hücrelerine muamele edilmesi sonrasında 6,25 µg/ml dozundan itibaren piknotik nükleus morfolojileriyle karakterize apoptotik hücreler görülmeye başlamıştır (Şekil 4.17C). 100 µg/ml konsantrasyona kadar piknotik nükleuslar gözlenmekle birlikte, bu hücrelerin önemli bir kısmının PI ile boyandığı için sekonder nekrozise gittiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.17C-F, beyaz →). Ancak temsili fotoğraflarda erken apoptotik hücreler de bulunmaktadır (Şekil 4.17C-F, turuncu →). Toksik etkinin oldukça yüksek olduğu 100 ve 200 µg/ml dozlarında ise nükleusun hücrelerin çoğunluğunda kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17G-H). MCF-7 hücre soyunda *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulamasında görece düşük dozlarda piknotik veya geç apoptotik hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 4.18). Ancak ağırlıklı olarak 50 µg/ml ve üzeri dozlarda hücrelerin tamamına yakınının piknotik ve sekonder nekrotik olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.18F-H). Bir düşük doz olan 25 µg/ml konsantrasyonda PI pozitif

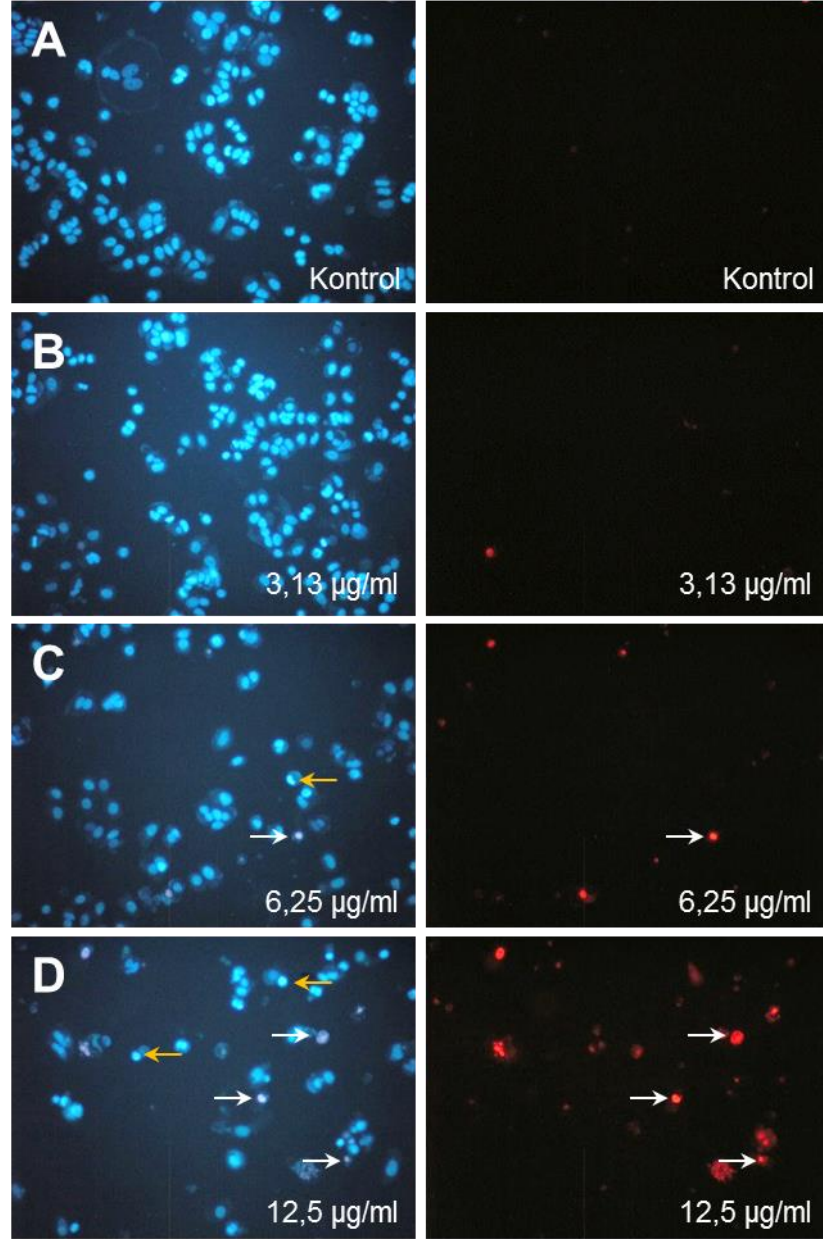
hücreler görülmüştür ancak 50 µg/ml konsantrasyonda görülen oranda piknotik nükleus gözlenmemiştir (Şekil 4.18E). Sekonder nekrotik hücrelerin 48 saat sonunda ağırlıkta olmasından dolayı, erken apoptotik hücrelerin daha erken bir zaman noktasında yakalanabileceği düşünülmüştür. Artan dozlarda hücre yoğunluğunun azaldığı da sitotoksikite testleriyle uyumlu olarak görülmektedir.

MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrasında MCF-7 hücre soyuna benzer olarak 3.13 µg/ml gibi düşük bir konsantrasyondan itibaren piknotik nükleuslar gözlenmiştir (Şekil 4.19). Bu hücreler yüksek oranda PI ile de boyandığı için apoptozis temelinde nekrotik bir ölüm modunun hâkim olduğu söylenebilir. Hücre yoğunluğu 200 µg/ml konsantrasyonda düşmüştür, fakat MCF-7 hücrelerinde olduğu gibi Hoechst 33342 ve PI negatif ölü hücreler görülmemiştir. *A. sibthorpianus* ekstraktının MDA-MB-231 hücrelerinde ortaya koyduğu etki hücre ölüm modu açısından MCF-7'de ortaya çıkan tabloya benzerdir (Şekil 4.20). 25 µg/ml konsantrasyonun altında yorumlanabilecek nitelikte hücre ölümü bulunmamaktadır. 25 µg/ml konsantrasyonda hücre ölümü sınırlıdır ve bunların birçoğunda piknotik nükleus barındıran hücre gözlenmemiştir (Şekil 4.20E). MDA-MB-231 hücrelerinde de 50 µg/ml ve üzeri dozlarda hücrelerin yüksek oranda sekonder nekrotik karakterde olduğu tespit edilmiştir.

MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması sonrasında görülen PI pozitif hücreler, diğer hücre soylarına kıyasla doza bağımlı olarak yükselmiştir ve özellikle hücre ölümünün belirgin olduğu 100-200 µg/ml konsantrasyonlarında daha fazladır (Şekil 4.21). Ayrıca, doz yükseldikçe hücre yoğunluğunun da buna paralel olarak azaldığı ve piknotik nükleus oranının da düşük olduğu gözlenmiştir. Esas olarak, yoğun hücre ölümünün gerçekleştiği 100-200 µg/ml konsantrasyonlarında nükleus morfolojilerinde bir değişim olmaması MCF-10A hücrelerinde farklı ölüm modunun etkin olabileceğini düşündürmektedir. *A. sibthorpianus* ekstraktıyla muamele edilmiş MCF-10A hücrelerinde piknotik nükleusa sahip hücreler 12,5 µg/ml dozunda ve daha yüksek dozlarda gözlenmiştir (Şekil 4.22). Bu hücrelerin kayda değer bir kısmı erken apoptotiktir (Şekil 4.22E-G). MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 50 µg/ml ve üzeri dozlarda gözlenen sekonder nekrotik hücrelerin ağırlıkta olduğu bir tablo MCF-10A hücrelerinde gözlenmemiştir. Hücre yoğunluğu 100 µg/ml dozundan itibaren belirgin

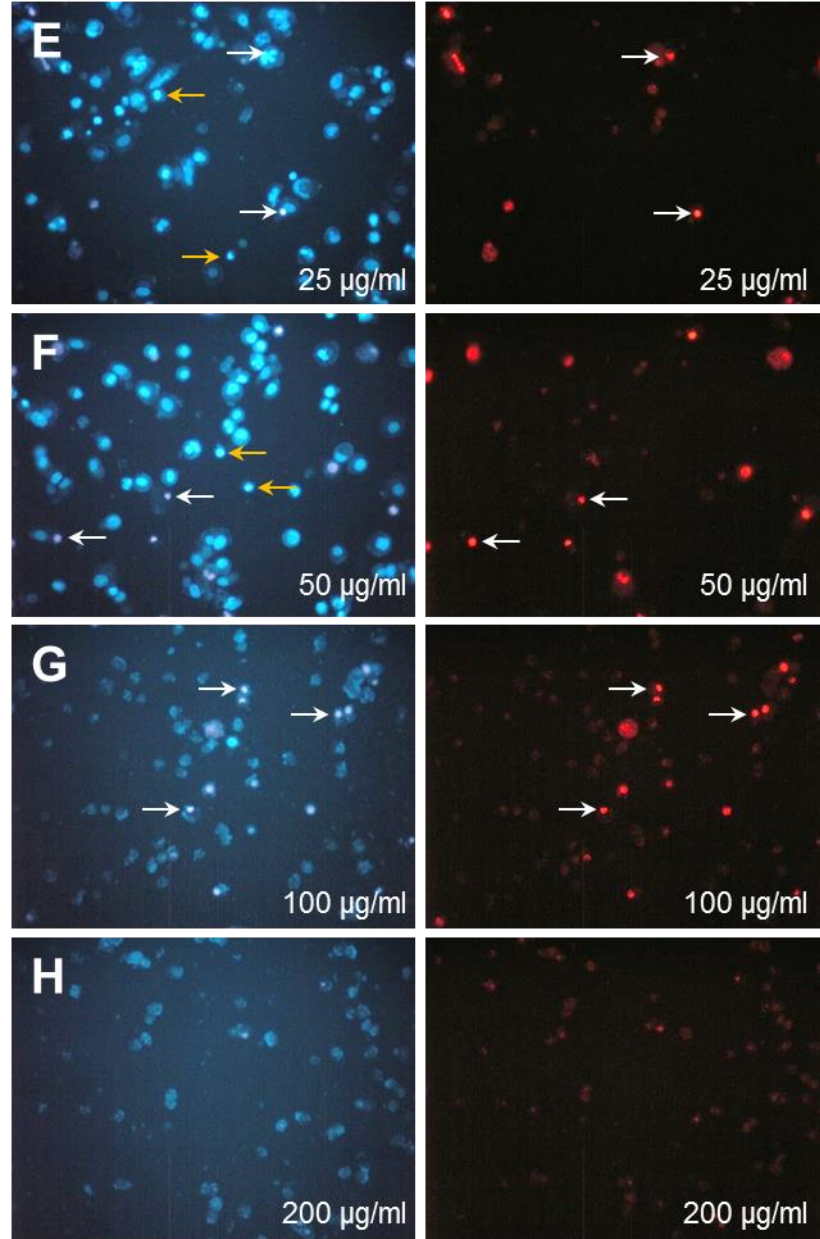
şekilde azalmıştır, ancak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde görülen yoğunlukta apoptotik hücrelere rastlanmamıştır.

***A. multifida*, MCF-7**



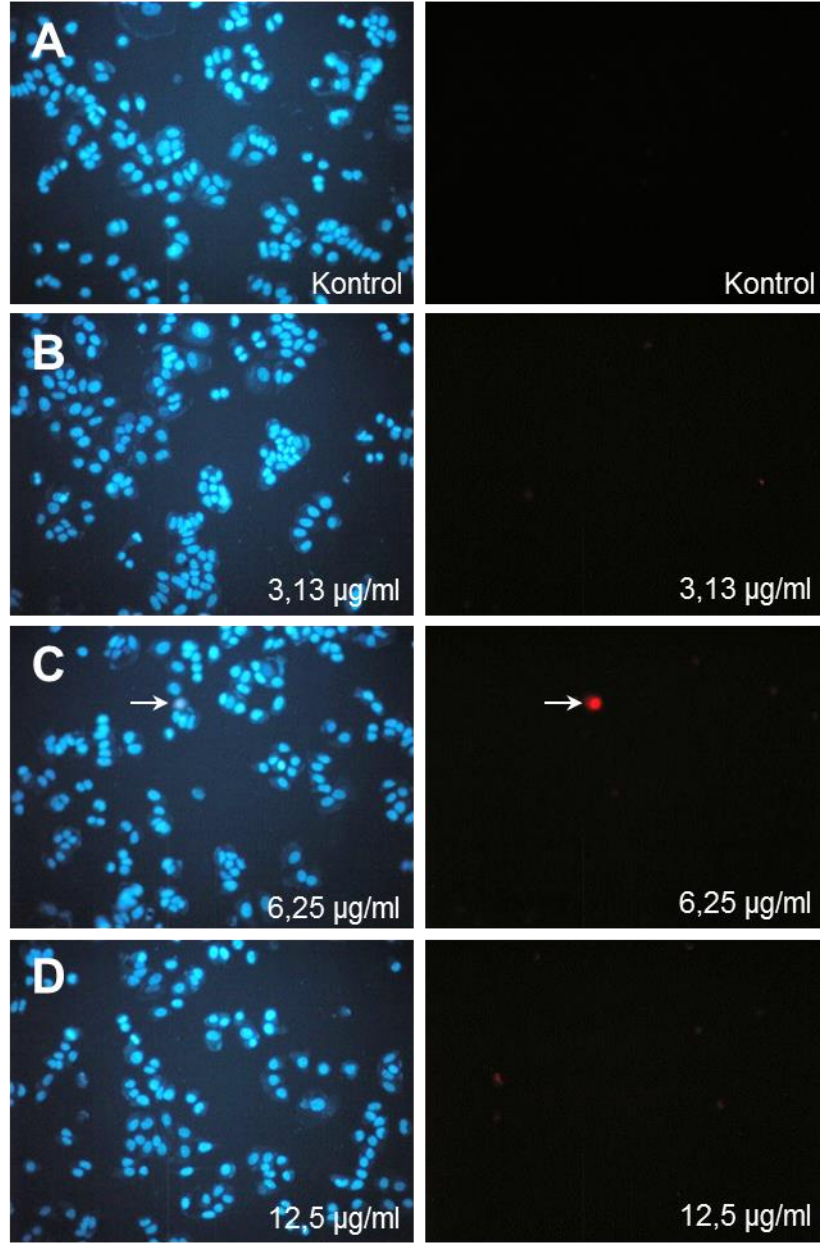
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

A. multifida, MCF-7



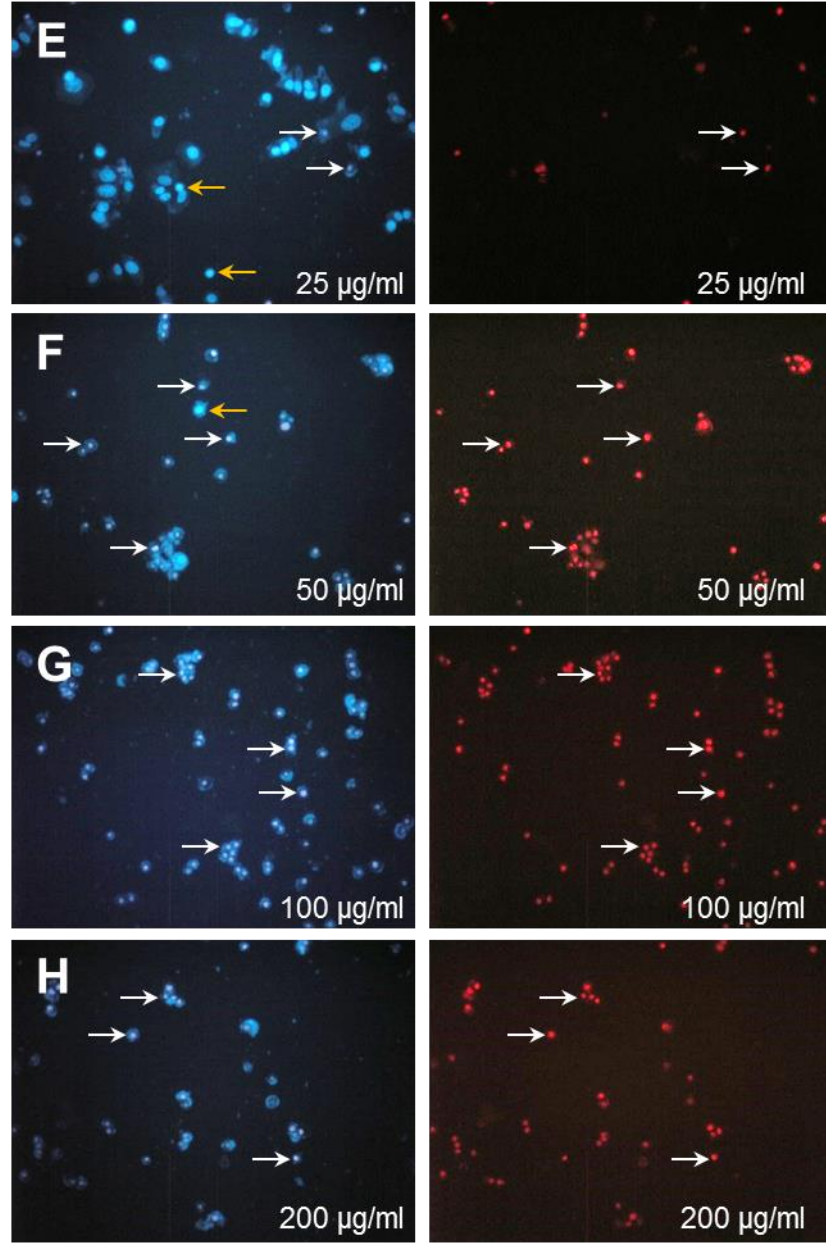
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

***A. sibthorpianus*, MCF-7**



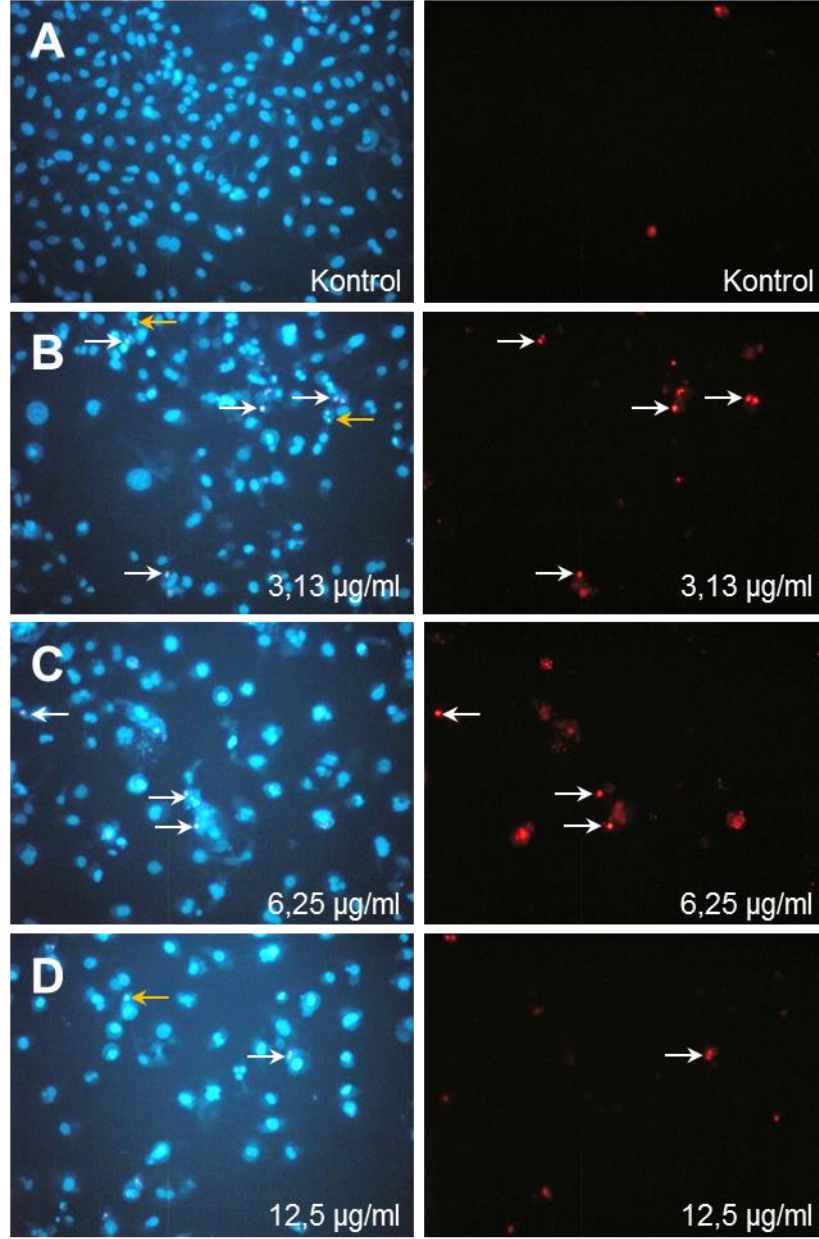
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

A. sibthorpianus, MCF-7



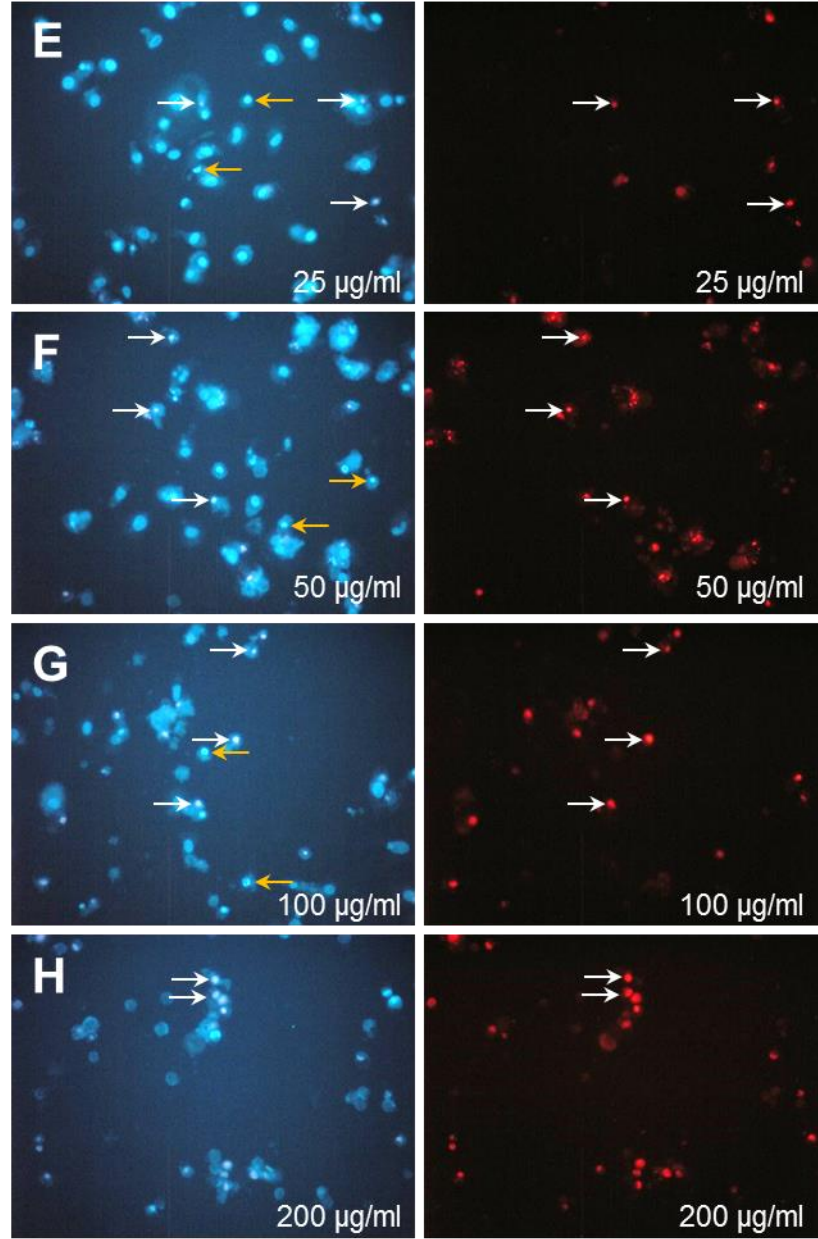
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

A. multifida, MDA-MB-231



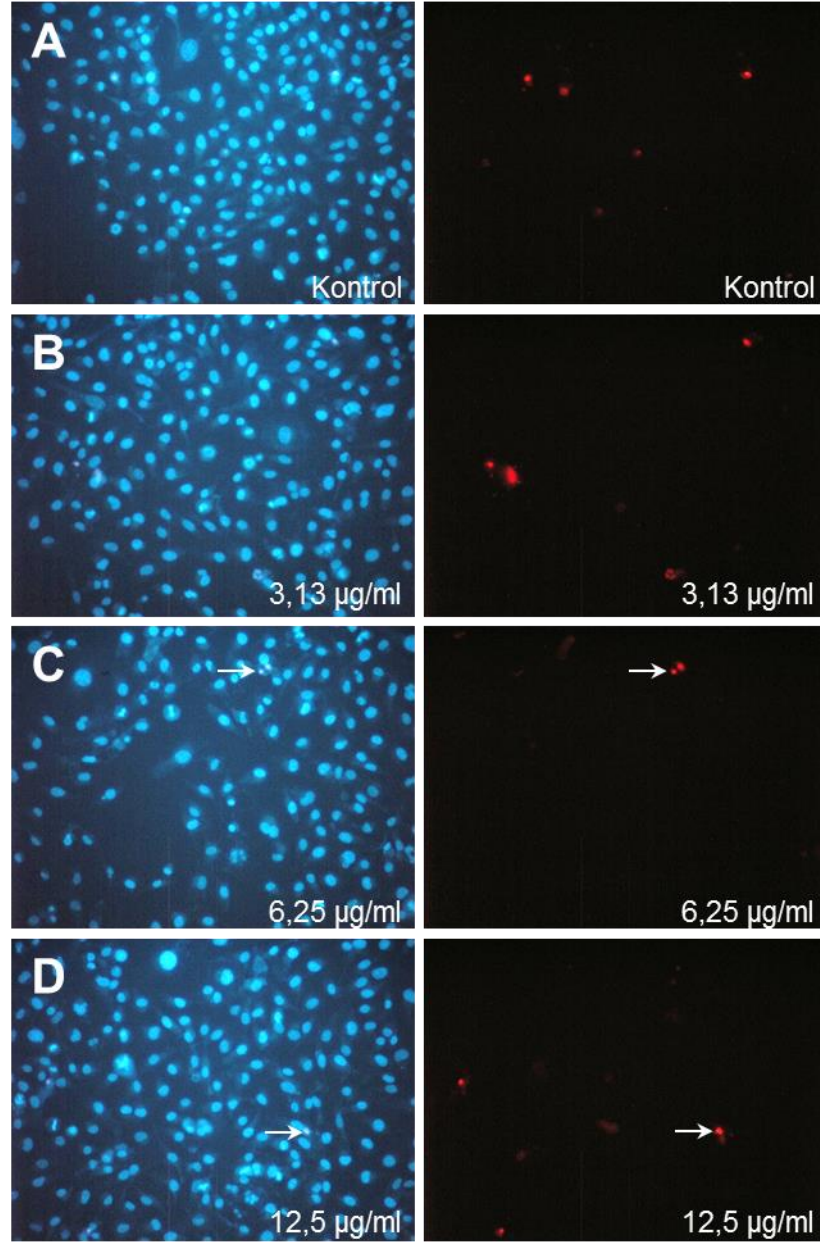
Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

A. multifida, MDA-MB-231



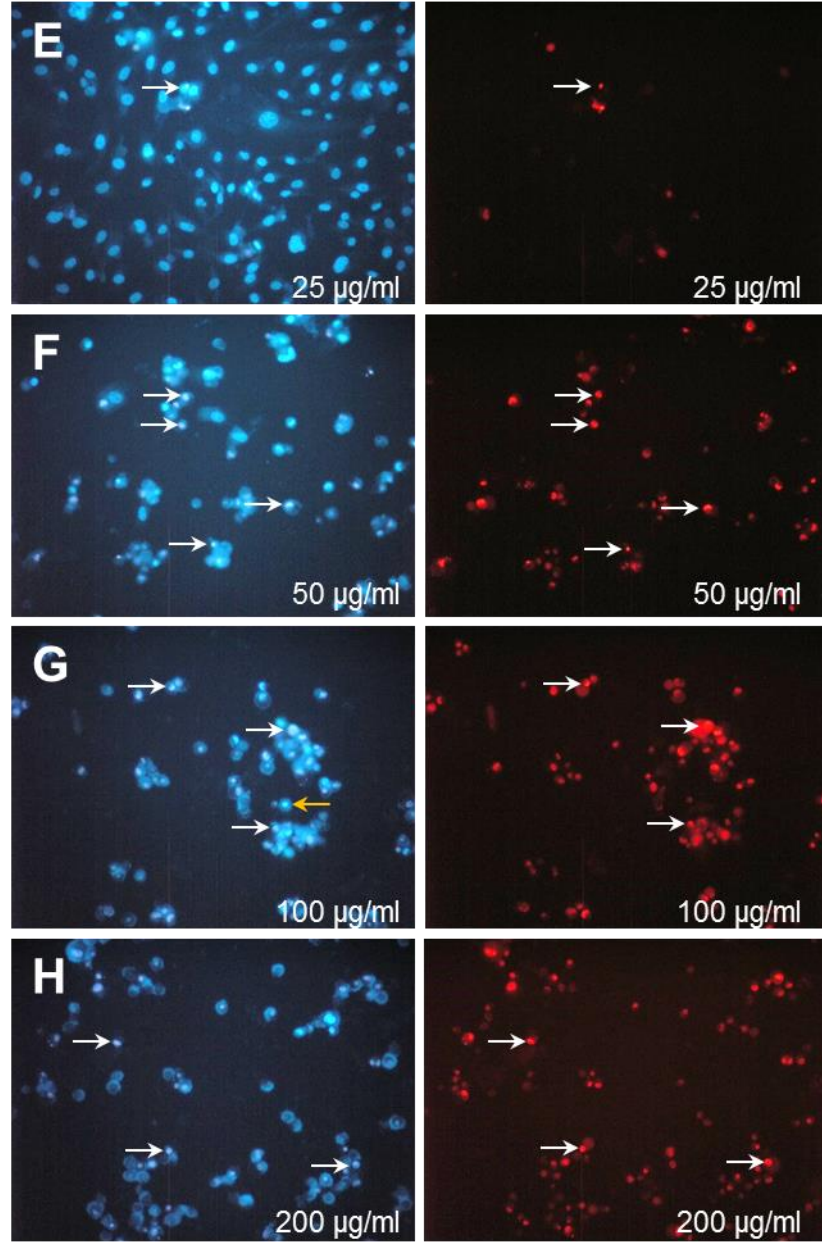
Şekil 4.19. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

***A. sibthorpianus*, MDA-MB-231**



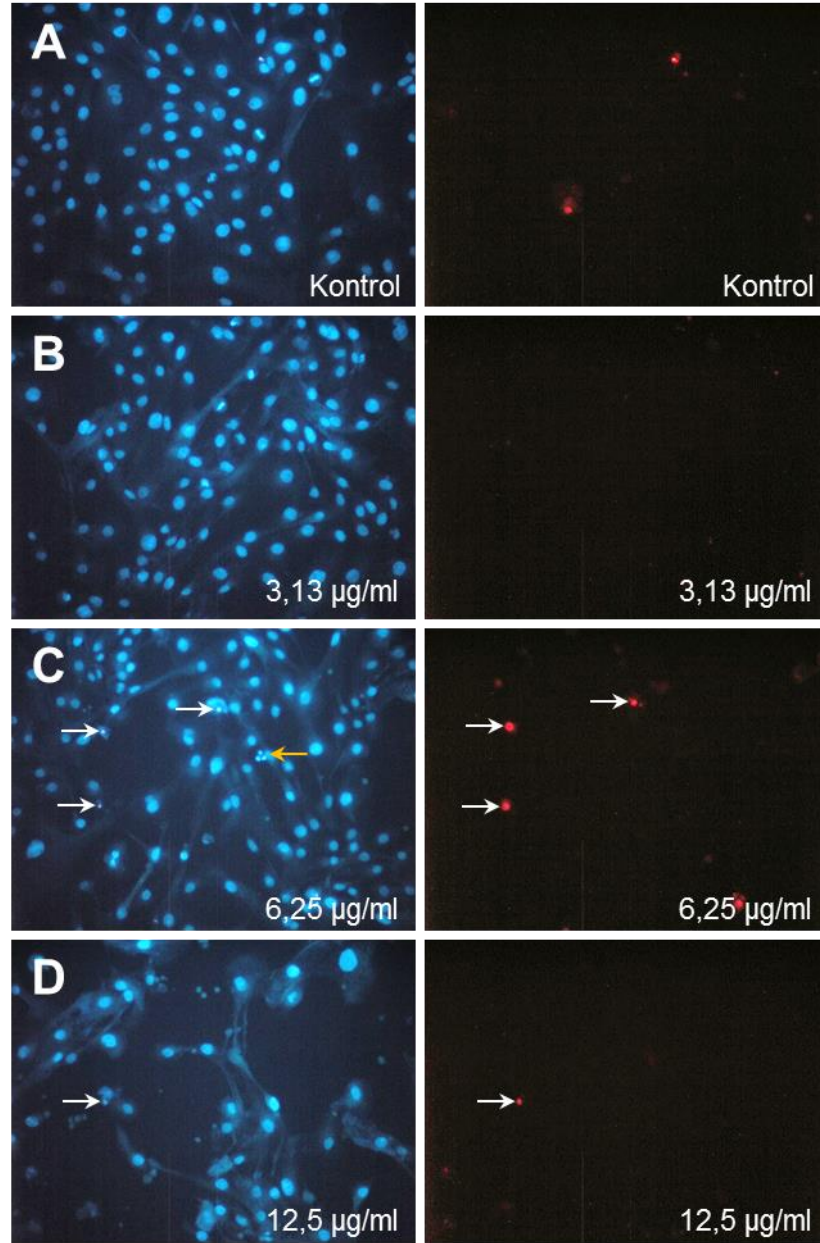
Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

***A. sibthorpianus*, MDA-MB-231**



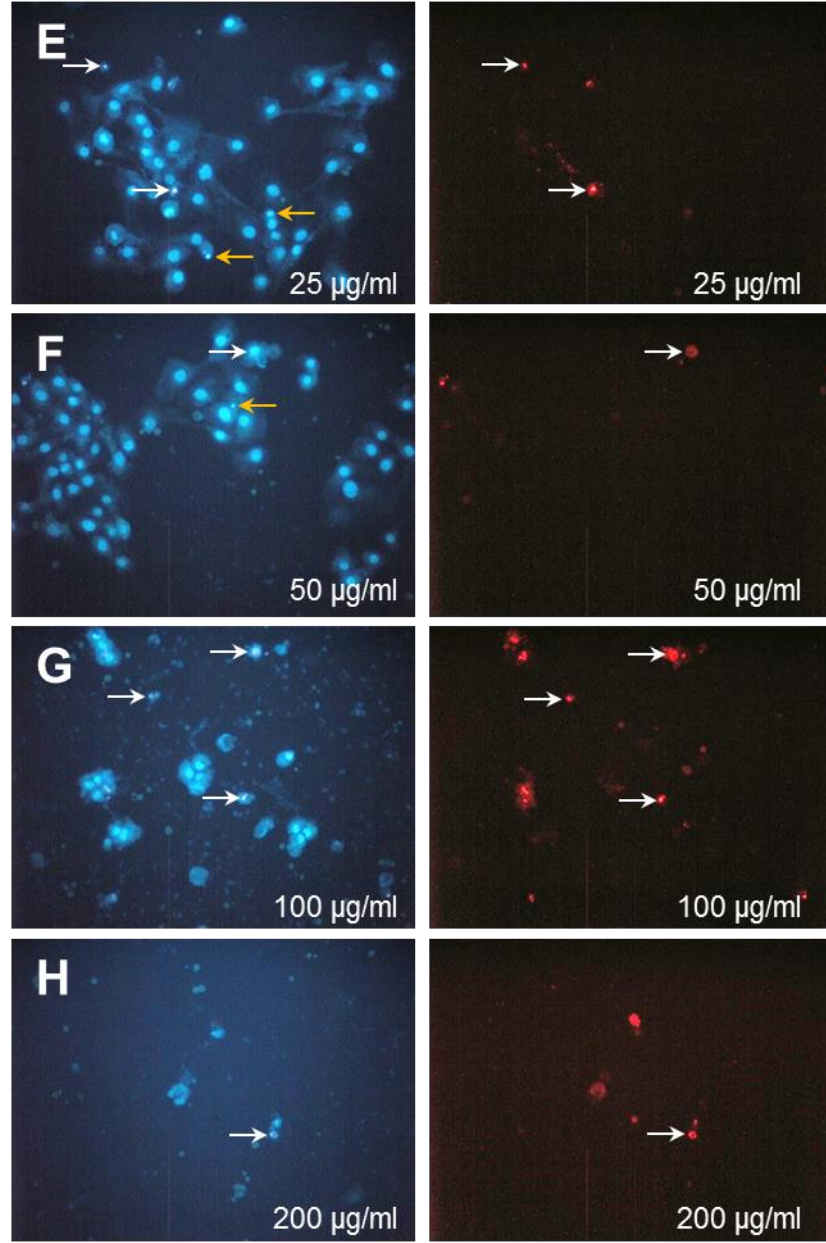
Şekil 4.20. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

A. multifida, MCF-10A



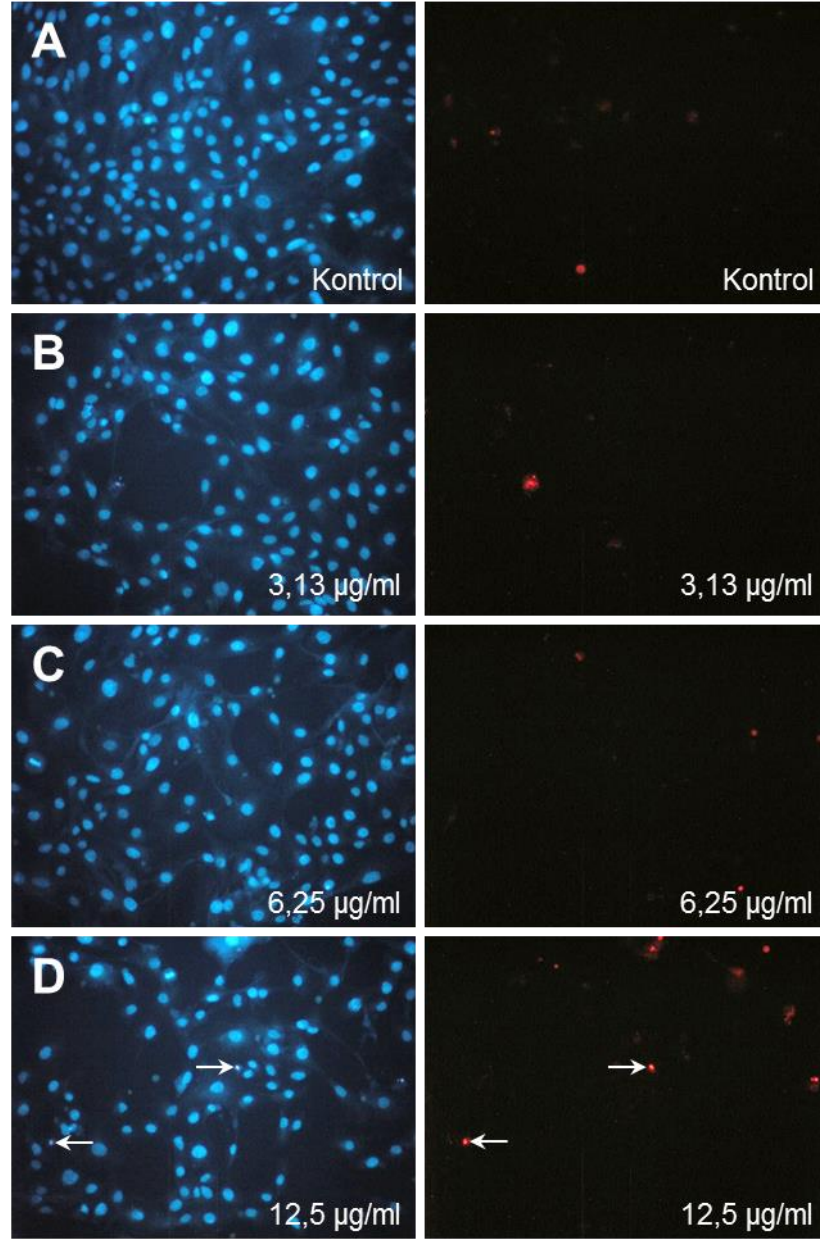
Şekil 4.21. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

A. multifida, MCF-10A



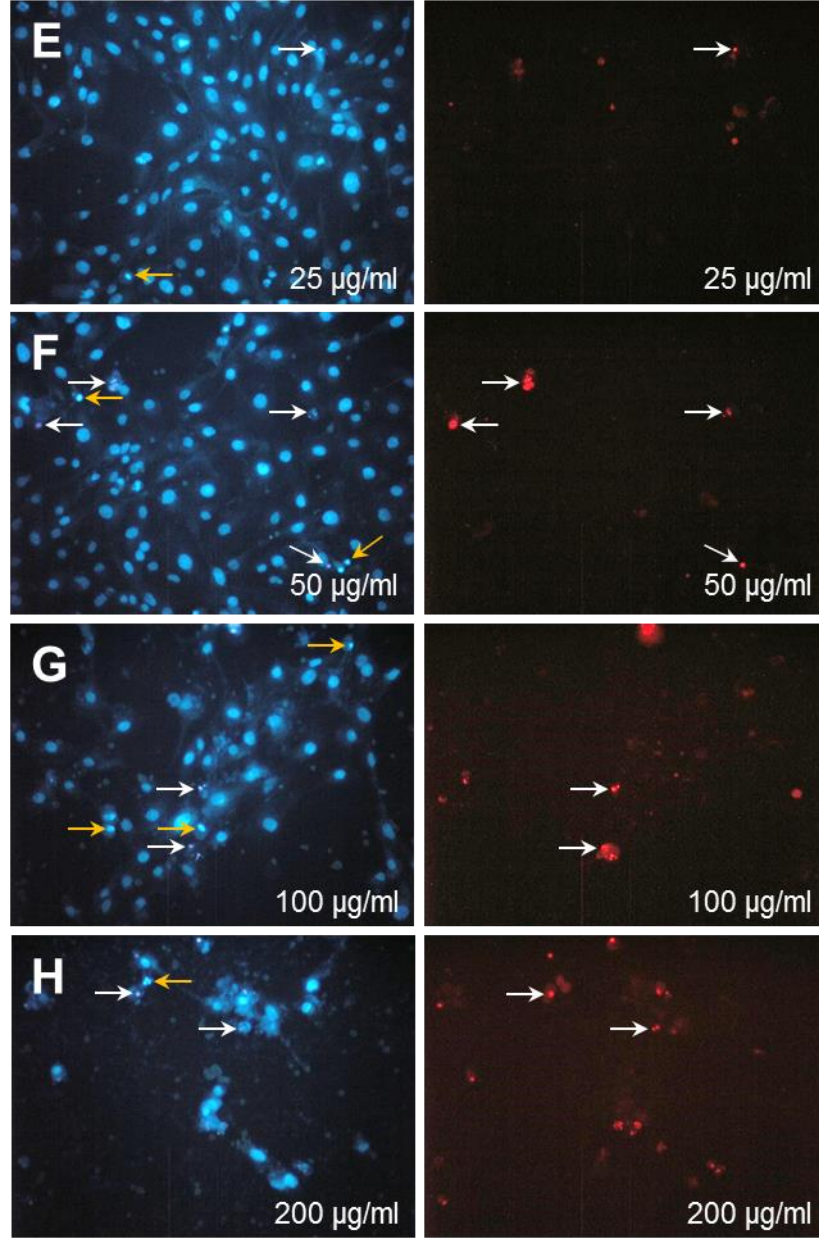
Şekil 4.21. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

***A. sibthorpianus*, MCF-10A**



Şekil 4.22. MCF-10A hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×)

A. sibthorpianus, MCF-10A



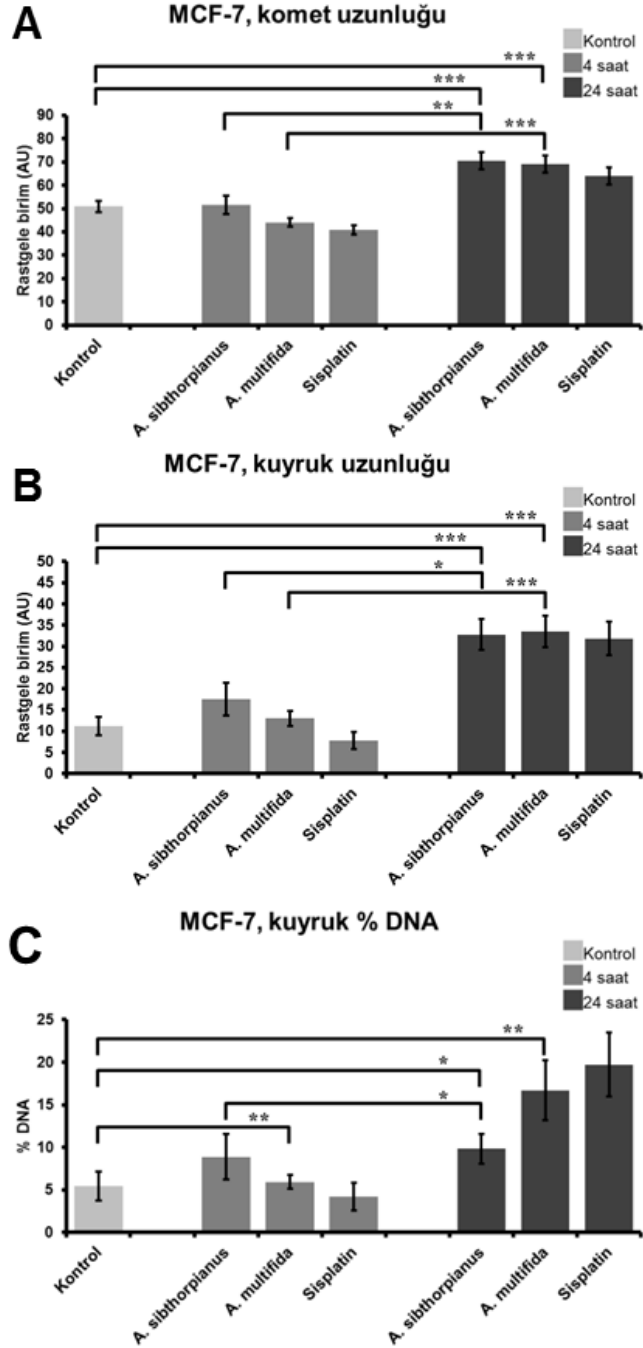
Şekil 4.22. MCF-10A hücrelerinde *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması. Sol sütun: Hoechst 33342, sağ sütun: PI. Beyaz →: sekonder nekrotik, turuncu →: erken apoptotik hücre (100×) (devam)

4.4 *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* Ekstraktlarının DNA Hasarı İndükleyici Etkileri

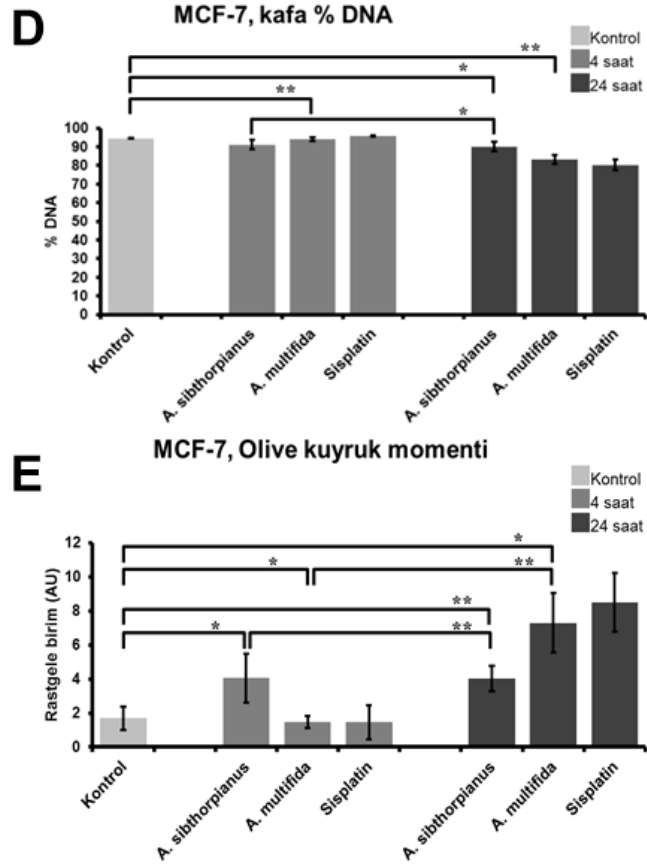
Komet testiyle *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının DNA'da tek zincir veya çift zincir kırıkları oluşturarak DNA hasarı indükleyici etkileri kısa (4 saat) ve uzun (24 saat) süreli olarak değerlendirilmiştir. Komet testi sonucunda komet alanı, komet uzunluğu, komet yoğunluğu, kuyruk alanı, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk % DNA, Olive kuyruk moment, kafa çapı, kafa alanı, kafa yoğunluğu, kafa % DNA, genetik hasar indeksi ve % hasarlı hücre gibi çok çeşitli parametreler değerlendirilebilir. Bunlar içerisinde komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk % DNA, kafa % DNA ve Olive kuyruk moment kullanılmıştır. Komet uzunluğu, baş ve kuyruk uzunluğunun toplamını rastgele birim (AU) cinsinden ifade eder. Kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk moment de aynı şekilde ifade edilmiştir. Olive kuyruk moment, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesinin çarpımı olarak tanımlanmakta ve sonuçları daha doğru yansıttığı için komet test verilerini yorumlamakta birincil olarak tercih edilmektedir. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde karşılık gelen IC₅₀ dozları kullanılarak yapılan uygulamaların sonuçları sırasıyla Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te verilmiştir. Bu şekillerde komet uzunluğu (A), kuyruk uzunluğu (B), kuyruk % DNA (C), kafa % DNA (D), Olive kuyruk moment (E) parametreleri yer almaktadır. Komet uzunluğu ve kuyruk uzunluğunun her hücre soyunda normal dağılım gösterdiği ve varyansının homojen olmadığı belirlenmiştir ve fark grupları Tamhane's T2 testiyle oluşturulmuştur. Kuyruk % DNA, kafa % DNA ve Olive kuyruk moment normal dağılım göstermemektedir. Değerler, parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testiyle analiz edilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde 4 saatlik *A. sibthorpianus* uygulaması kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA yüzdesinde bir artışa neden olmasına rağmen bu artışlar anlamlı değildir (Şekil 4.23B, C). Buna karşılık, Olive kuyruk momentinde ise anlamlı artış vardır (Şekil 4.23E). *A. sibthorpianus* ekstraktının DNA hasar indükleyici etkisi ancak 24 saatlik uygulamasında ortaya çıkmaktadır. Bu noktada, DNA hasarı açısından 24 saat ile hem çözgen kontrol hem de 4 saatlik uygulamalar arasında anlamlı farklar oluşmuştur. *A. multifida* uygulamasında 4 saatte kuyruk DNA yüzdesi ve Olive kuyruk moment anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.23C, E). Sürenin 24 saate uzamasıyla kontrole kıyasla

DNA hasarının anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür. Bu hasar, komet uzunluğu, kuyruk uzunluğu ve Olive kuyruk momentindeki değişimlerle 4 saate nazaran da anlamlı olarak artış göstermiştir.

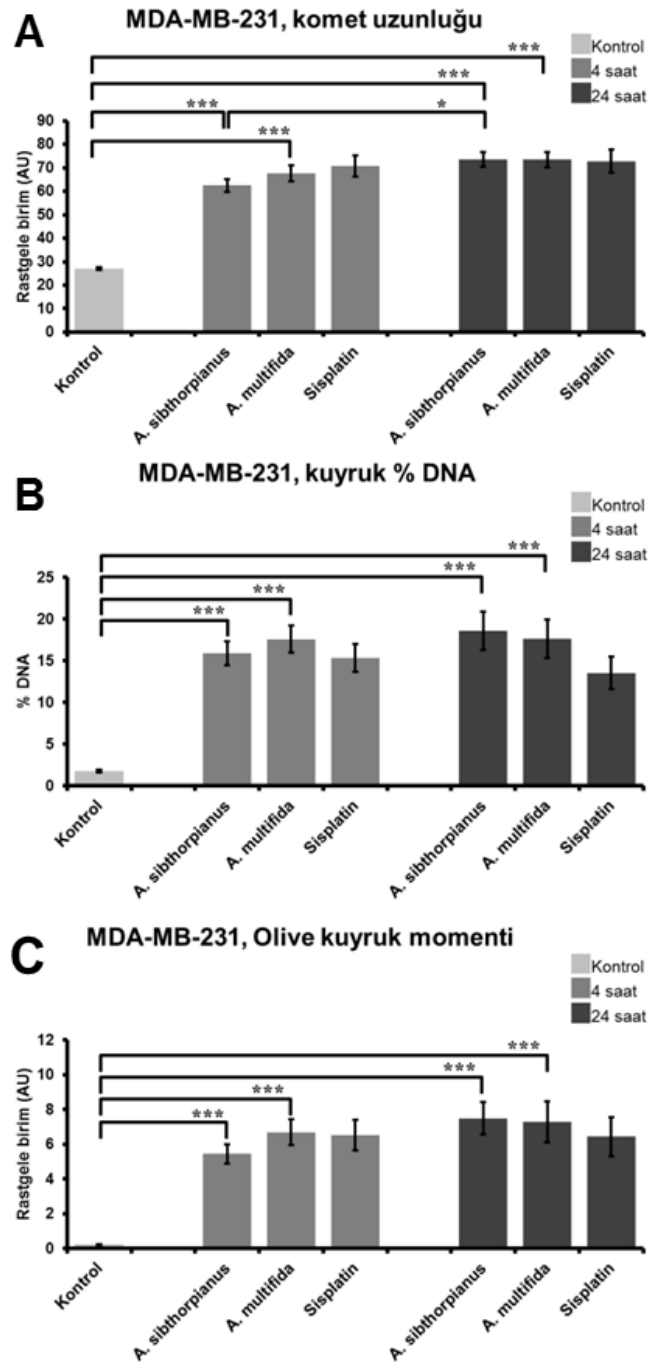


Şekil 4.23. *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MCF-7 hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, **; p<0,005, ***; p<0,0001

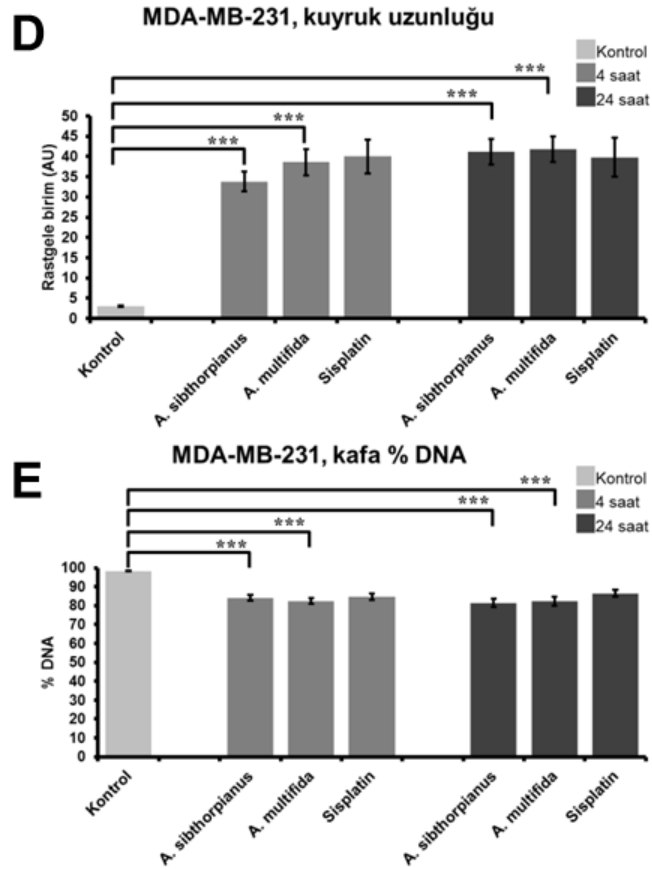


Şekil 4.23. *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MCF-7 hücrelerinde komet testi. *, p<0,05, **, p<0,005, ***, p<0,0001 (devam)

MDA-MB-231 hücre soyunda *A. sibthorpianus* uygulaması 4 saat ve 24 saatlik zamanlarda DNA hasarını indüklemiştir (Şekil 4.24). Buna karşılık, komet uzunluğu haricinde 4 ve 24 saatlik uygulamalar arasında zamana bağlı anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.24A). *A. multifida* ekstraktı da benzer şekilde hem 4 hem de 24 saatlik uygulamalarda DNA hasarını indüklemiştir, ancak belirtilen süreler arasında DNA hasarında anlamlı bir değişim bulunmamaktadır. Ekstraktlar bu hücre soyunda yarattıkları DNA hasarının şiddeti açısından yüksek seviyede benzerlik göstermektedir. Grafikteki değerlerin sayısal karşılıkları Çizelge 4.6’da ayrıntılı olarak incelenebilir.

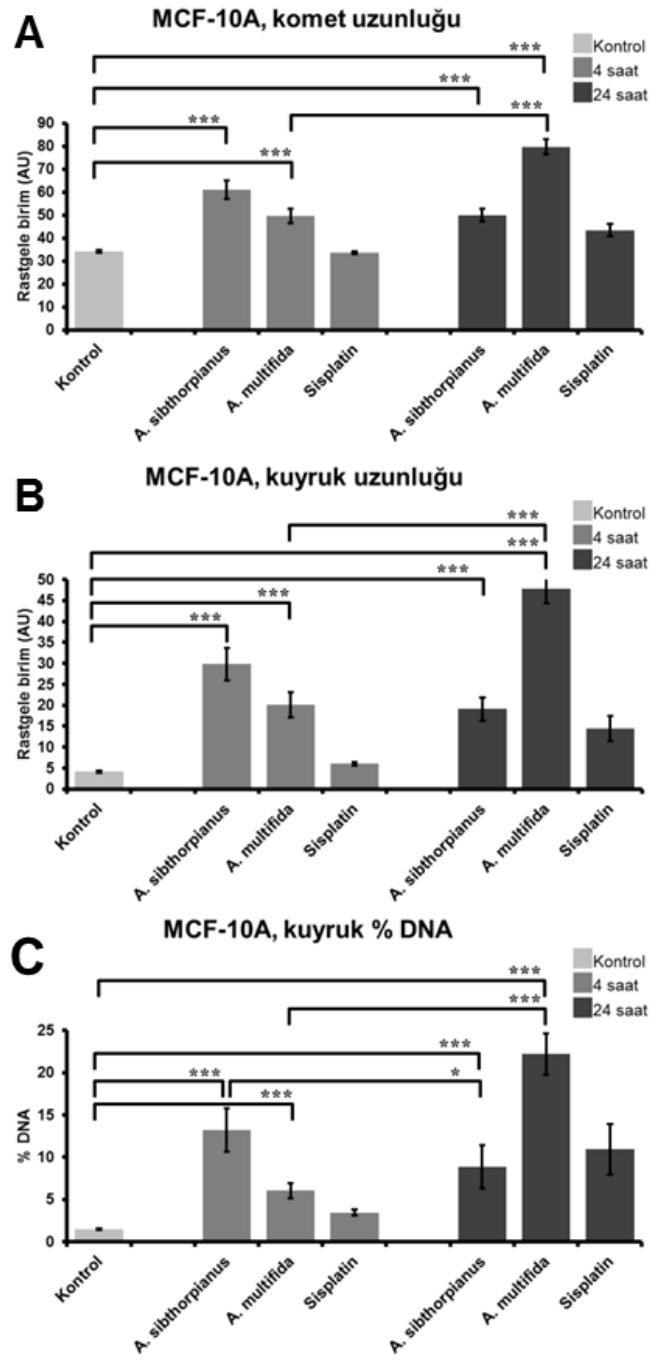


Şekil 4.24. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MDA-MB-231 hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, ***; p<0,0001

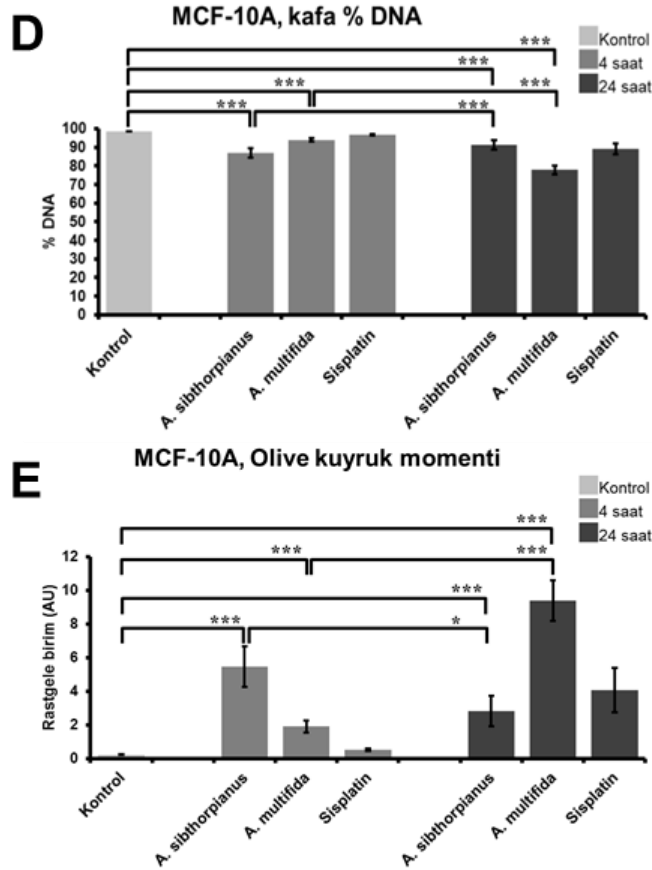


Şekil 4.24. *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MDA-MB-231 hücrelerinde komet testi. *, p<0,05, ***, p<0,0001 (devam)

MCF-10A hücrelerinde 4 saatlik *A. sibthorpianus* uygulamasında kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve Olive kuyruk momenti anlamlı ve katlık yükselmeler görülmüştür (Şekil 4.25B, C ve E). Ancak uygulamanın süresi 24 saate uzatılınca kuyruk % DNA ve Olive kuyruk momentinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Bu, zamanla MCF-10A hücrelerinde DNA hasar tamirinin gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak burada gerçekleşen DNA hasar tamiri kısmîdir ve hücreyi uygulama öncesindeki duruma döndürememiştir. *A. multifida* uygulamasında kafa % DNA anlamlı olarak azalmış, incelenen diğer parametrelerde de anlamlı yükselme gerçekleşmiştir (Şekil 4.25). Sürenin uzamasıyla birlikte DNA hasarının incelenen parametrelerde anlamlı olarak yükseldiği, örneğin kuyruk DNA yüzdesinin yaklaşık 4 kat arttığı belirlenmiştir.

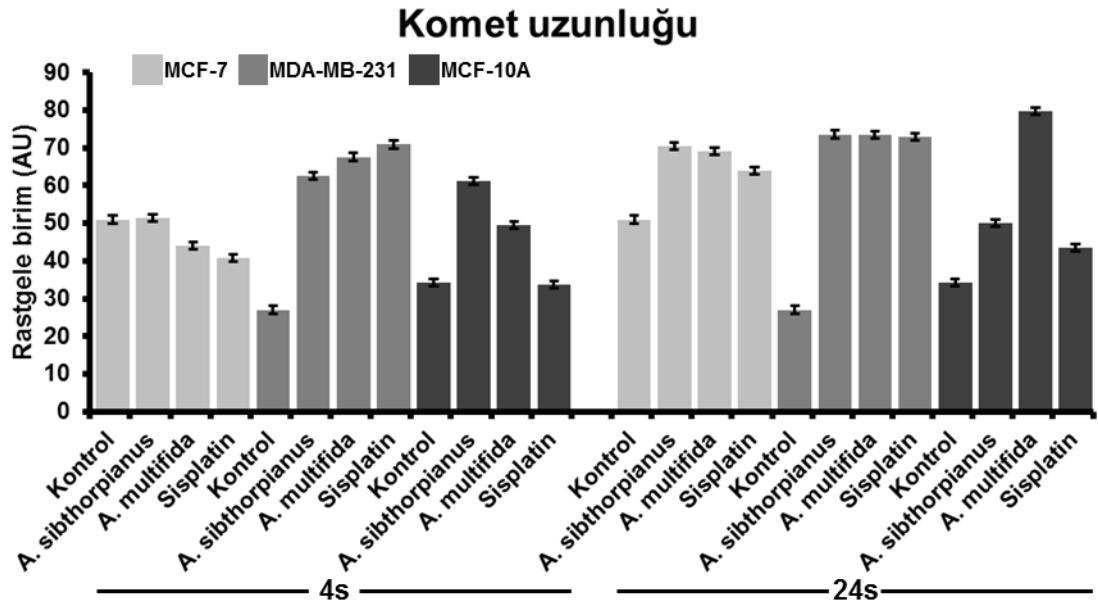


Şekil 4.25. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MCF-10A hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, ***; p<0,0001

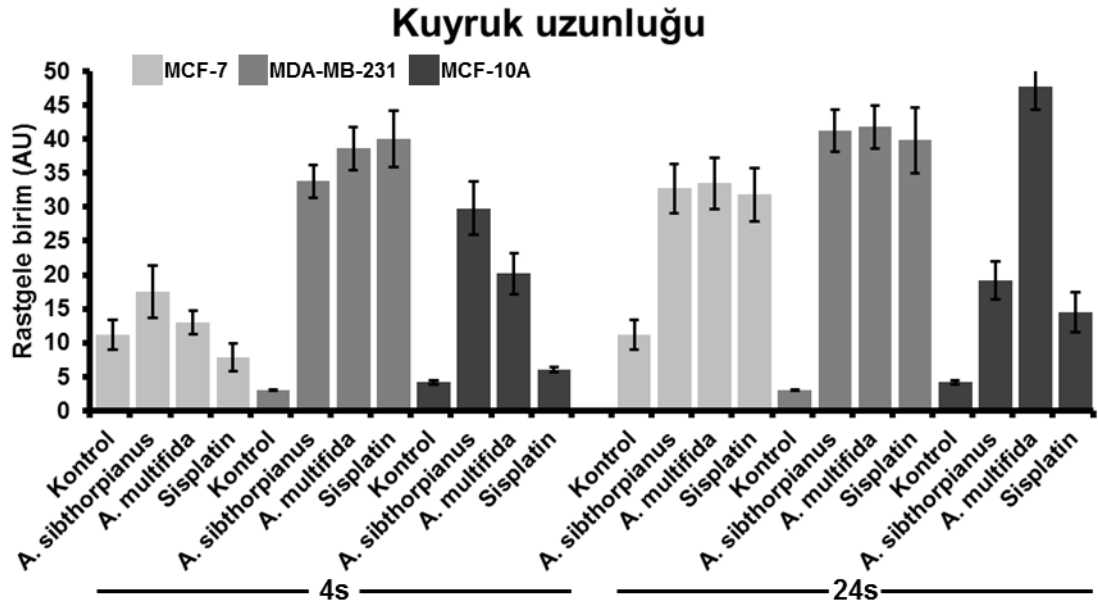


Şekil 4.25. *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının IC₅₀ dozuyla MCF-10A hücrelerinde komet testi. *; p<0,05, ***; p<0,0001 (devam)

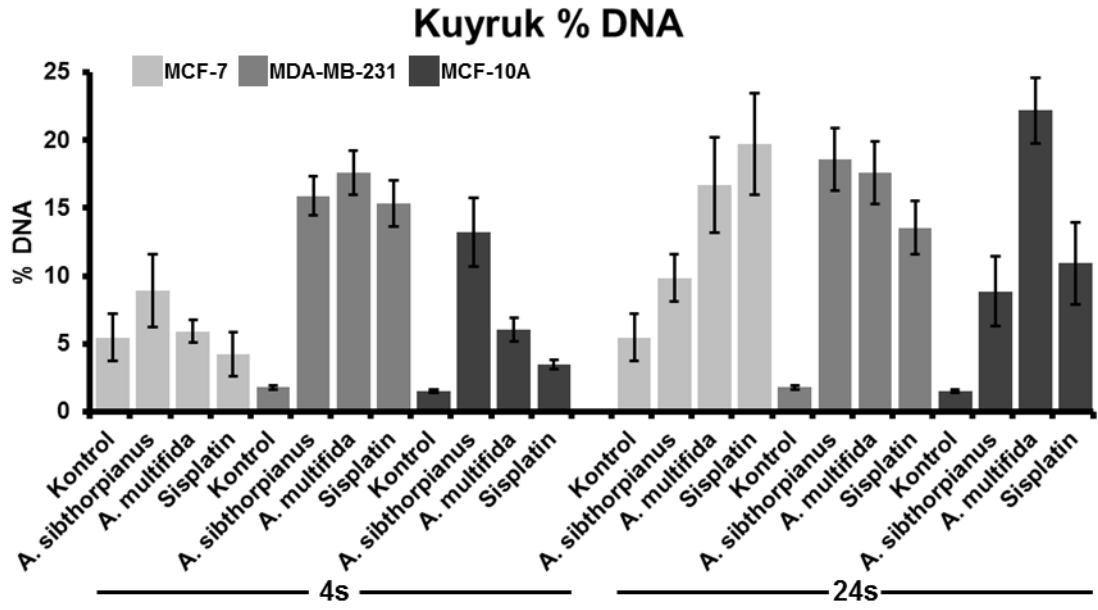
Hücre soyları arasında ve zamana bağlı olarak karşılaştırmalar yapma amaçlı olarak *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının DNA hasarı yapıcı etkileri komet uzunluğu (Şekil 4.26), kuyruk uzunluğu (Şekil 4.27), kuyruk % DNA (Şekil 4.28), kafa % DNA (Şekil 4.29) ve Olive kuyruk momentindeki (Şekil 4.30) değişimler birleştirilerek sunulmuştur. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde *A. multifida* ekstraktının MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde geç (24 saat) dönemde DNA hasarını daha yüksek oranda indüklediği söylenebilir. *A. sibthorpianus* ekstraktının etkisi ise hücre soylarına göre değişim göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde DNA hasarı geç dönemde indüklenirken MDA-MB-231 hücrelerinde oluşan DNA hasarı zamana bağlı değişim göstermemektedir. MCF-10A’da ise oluşan DNA hasarı tamir edilmiştir.



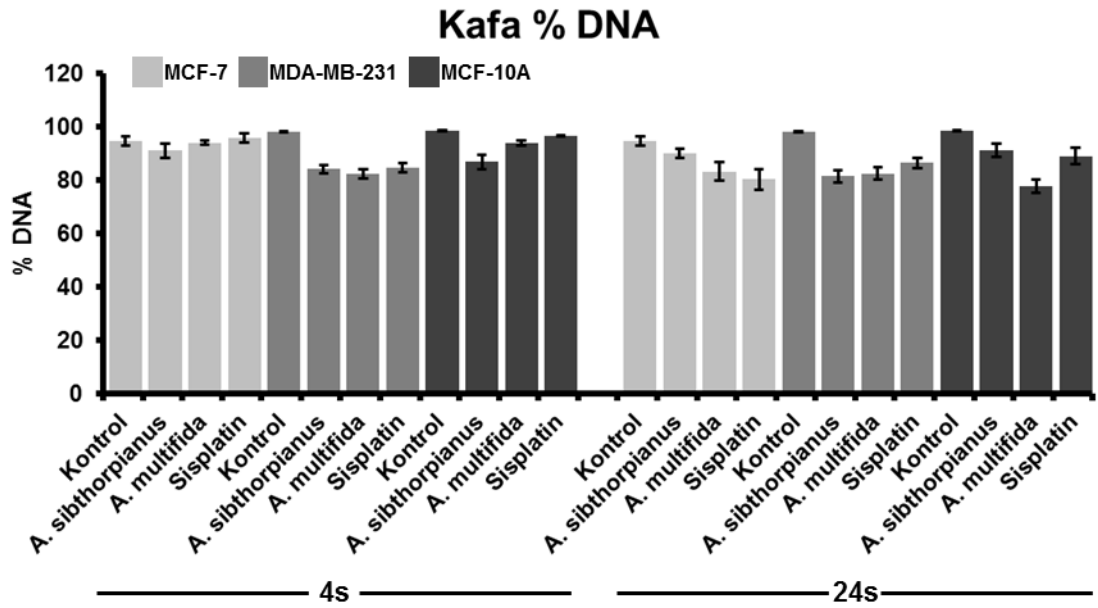
Şekil 4.26. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte komet uzunluğu üzerine etkileri



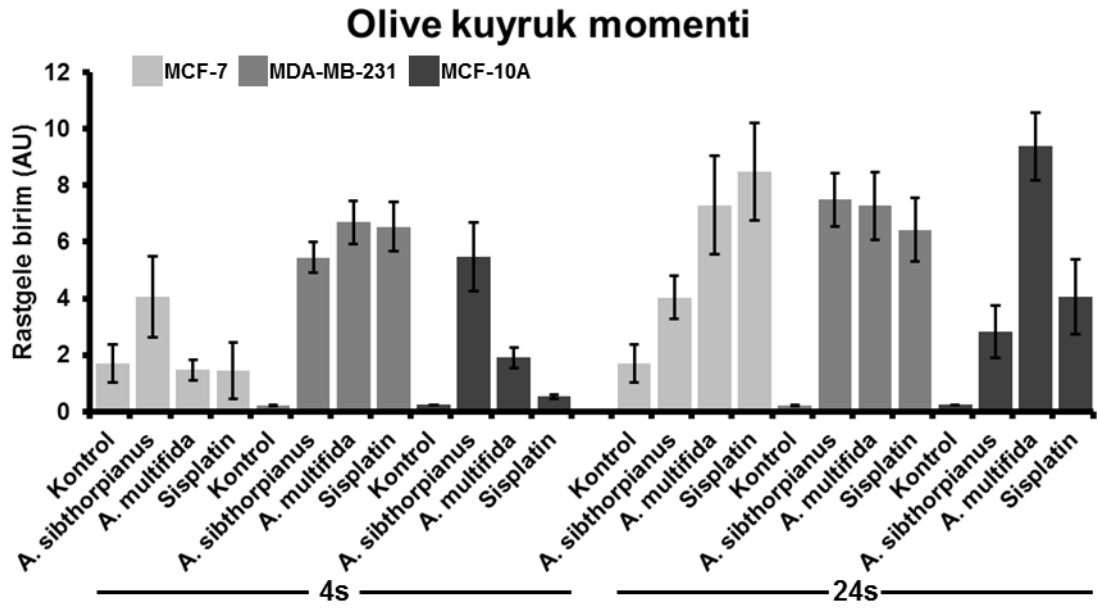
Şekil 4.27. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kuyruk uzunluğu üzerine etkileri



Şekil 4.28. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kuyruk % DNA üzerine etkileri



Şekil 4.29. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte kafa % DNA üzerine etkileri



Şekil 4.30. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda 4 ve 24 saatte Olive kuyruk momentini üzerine etkileri

MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının HHY ve GHİ üzerine etkileri de diğer komet parametreleriyle uyumlu olmuştur (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). HHY, 0 ile 1 arasında bir değer alabilir. Burada, kontrole kıyasla 4 saatlik *A. sibthorpius* uygulaması dışında HHY’de anlamlı artış bulunmaktadır. GHİ ise kontrole kıyasla bütün uygulamalarda ve zaman dilimlerinde anlamlı artış göstermiştir. HHY’de tek azalma *A. sibthorpius* uygulamasında bu değer 0,50’den 0,22’ye düşmesiyledir. *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının DNA hasarını ne ölçüde indükledikleri GHİ değerleri karşılaştırılarak görülebilir. Buna göre, *A. multifida* ekstraktının DNA hasar yapıcı etkisi daha yüksektir.

Çizelge 4.3. MCF-7 hücrelerinde *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma)

Komet parametresi	Çözgen kontrol (1:1000 DMSO)	<i>A. multifida</i> ^a		<i>A. sibthorpius</i> ^b		Sisplatin	
		4 saat	24 saat	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
HHY	0,18 ± 0,01	0,08 ± 0,01***	0,40 ± 0,01***	0,18 ± 0,01	0,38 ± 0,01*	0,04 ± 0,01	0,48 ± 0,01
GHİ	0,31 ± 0,01	0,66 ± 0,01***	1,22 ± 0,01***	0,50 ± 0,01*	1,04 ± 0,01**	0,20 ± 0,01	1,20 ± 0,01

^a Tek yönlü ANOVA sonuçları fark grupları kontrole göre Tukey HSD testiyle belirlenmiştir, ***; p<0,0001

^b Kruskal-Wallis test sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir, *; p<0,05, **; p<0,005

HHY: Hasarlı hücre yüzdesi

GHİ: Genetik hasar indeksi

Çizelge 4.4. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama ± standart sapma)

Komet parametresi	Çözgen kontrol (1:1000 DMSO)	<i>A. multifida</i>		<i>A. sibthorpius</i>		Sisplatin	
		4 saat	24 saat	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
HHY ^a	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,01*	0,72 ± 0,01*	0,69 ± 0,01*	0,70 ± 0,01*	0,56 ± 0,01	0,49 ± 0,01
GHİ ^a	0,00 ± 0,00	1,56 ± 0,02*	1,56 ± 0,01*	1,30 ± 0,01*	1,50 ± 0,01*	1,30 ± 0,02	1,19 ± 0,01

^a Kruskal-Wallis test sonuçları kontrole göre değerlendirilmiştir, *; p<0,05.

HHY: Hasarlı hücre yüzdesi

GHİ: Genetik hasar indeksi

Çizelge 4.5. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* ve *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda HHY ve GHİ üzerine etkileri (ortalama $\pm$ standart sapma)

Komet parametresi	Çözgen kontrol (1:1000 DMSO)	<i>A. multifida</i>		<i>A. sibthorpius</i>		Sisplatin	
		4 saat	24 saat	4 saat	24 saat	4 saat	24 saat
HHY^a	0,00 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,01 ***	0,80 $\pm$ 0,01 ***	0,50 $\pm$ 0,01 ***	0,22 $\pm$ 0,01 ***	0,02 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01
GHİ^a	0,00 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,01 ***	1,84 $\pm$ 0,01 ***	0,98 $\pm$ 0,01 ***	0,82 $\pm$ 0,01 ***	0,40 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01

^a Tek yönlü ANOVA sonuçları fark grupları kontrole göre Tukey HSD testiyle belirlenmiştir, ***; p<0,0001.

HHY: Hasarlı hücre yüzdesi

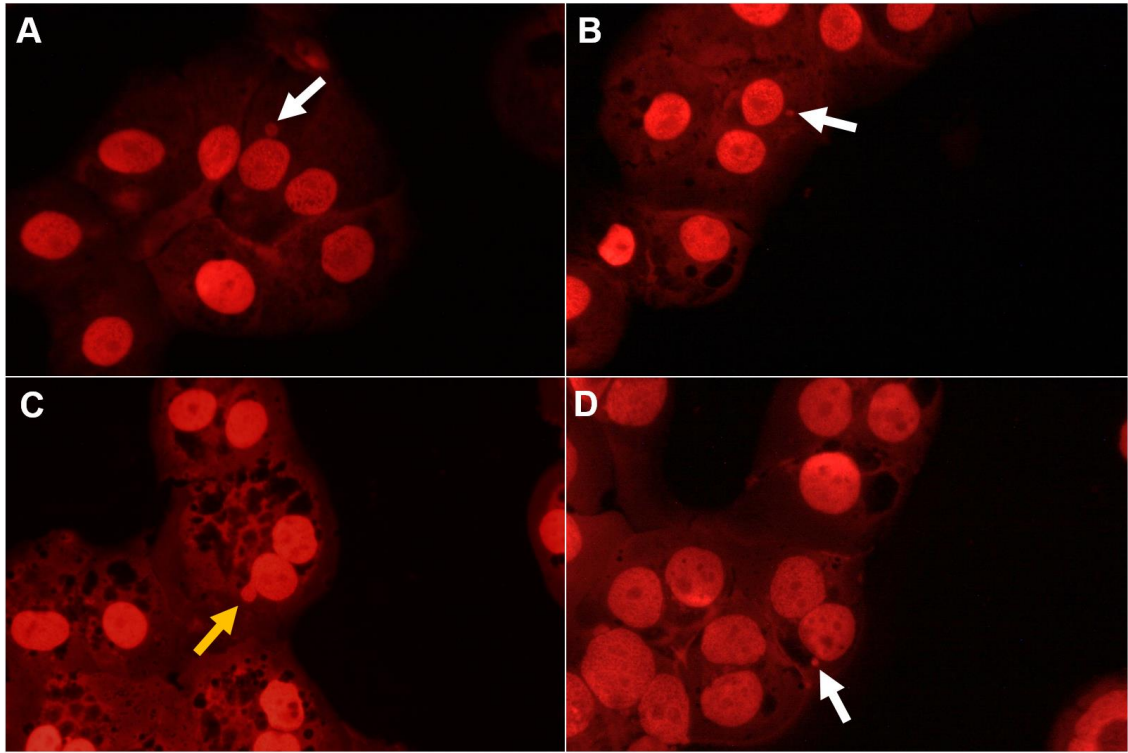
GHİ: Genetik hasar indeksi

Çizelge 4.6. Hücre soylarında *A. multifida*, *A. sibthorpius* ekstraktlarının IC₅₀ dozunda komet parametreleri üzerine etkileri (ortalama ± standart hata)

Hücre soyu	Uygulama (IC ₅₀)	Süre (saat)	Komet uzunluğu (AU)	Kuyruk uzunluğu (AU)	Kuyruk % DNA (%)	Kafa % DNA (%)	Olive kuyruk momenti (AU)
MCF-7	Kontrol	4	50,94 ± 2,44	11,21 ± 2,21	5,47 ± 1,71	94,53 ± 1,71	1,70 ± 0,68
	<i>A. sibthorpius</i>	4	51,45 ± 3,94	17,51 ± 3,86	8,88 ± 2,67	91,12 ± 2,67	4,05 ± 1,44
	<i>A. multifida</i>	4	44,03 ± 1,91	12,97 ± 1,75	5,92 ± 0,81	94,08 ± 0,81	1,47 ± 0,36
	Sisplatin	4	40,75 ± 2,02	7,82 ± 2,04	4,23 ± 1,64	95,77 ± 1,64	1,46 ± 1,00
	<i>A. sibthorpius</i>	24	70,35 ± 3,65	32,76 ± 3,62	9,84 ± 1,74	90,16 ± 1,74	4,03 ± 0,76
	<i>A. multifida</i>	24	69,01 ± 3,65	33,48 ± 3,75	16,70 ± 3,52	83,30 ± 3,52	7,30 ± 1,73
	Sisplatin	24	63,94 ± 3,75	31,83 ± 3,97	19,71 ± 3,77	80,29 ± 3,77	8,49 ± 1,73
MDA-MB-231	Kontrol	4	27,02 ± 0,48	2,99 ± 0,10	1,77 ± 0,13	98,23 ± 0,13	0,21 ± 0,01
	<i>A. sibthorpius</i>	4	62,47 ± 2,59	33,79 ± 2,46	15,89 ± 1,41	84,11 ± 1,41	5,44 ± 0,55
	<i>A. multifida</i>	4	67,56 ± 3,36	38,60 ± 3,19	17,59 ± 1,62	82,41 ± 1,62	6,69 ± 0,75
	Sisplatin	4	70,85 ± 4,52	39,99 ± 4,18	15,34 ± 1,68	84,66 ± 1,68	6,53 ± 0,88
	<i>A. sibthorpius</i>	24	73,52 ± 3,16	41,22 ± 3,14	18,57 ± 2,31	81,43 ± 2,31	7,49 ± 0,94
	<i>A. multifida</i>	24	73,46 ± 3,12	41,81 ± 3,14	17,62 ± 2,29	82,38 ± 2,29	7,27 ± 1,19
	Sisplatin	24	72,82 ± 4,95	39,81 ± 4,77	13,54 ± 1,97	86,46 ± 1,97	6,43 ± 1,12
MCF-10A	Kontrol	4	34,15 ± 0,64	4,15 ± 0,30	1,51 ± 0,09	98,49 ± 0,09	0,23 ± 0,01
	<i>A. sibthorpius</i>	4	61,09 ± 3,98	29,82 ± 3,88	13,21 ± 2,56	86,79 ± 2,56	5,47 ± 1,21
	<i>A. multifida</i>	4	49,54 ± 3,14	20,16 ± 3,00	6,03 ± 0,87	93,97 ± 0,87	1,90 ± 0,36
	Sisplatin	4	33,63 ± 0,57	6,04 ± 0,33	3,45 ± 0,33	96,55 ± 0,33	0,52 ± 0,06
	<i>A. sibthorpius</i>	24	49,99 ± 2,60	19,14 ± 2,76	8,86 ± 2,55	91,14 ± 2,55	2,83 ± 0,92
	<i>A. multifida</i>	24	79,70 ± 3,38	47,73 ± 3,37	22,19 ± 2,43	77,81 ± 2,43	9,39 ± 1,20
	Sisplatin	24	43,44 ± 2,63	14,44 ± 2,97	10,92 ± 3,02	89,08 ± 3,02	4,07 ± 1,32

4.5 *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* Ekstraktlarının Kromozom Hasarı, Multinükleasyonu İndükleme ve Hücre Bölünme İndeksi Üzerine Etkileri

Komet testi sonrasında, *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde yarattıkları genetik hasar farklı yönlerden araştırılmıştır. *A. sibthorpianus* ekstraktının IC₅₀ dozu kullanılarak 48 saatlik uygulama sonucunda MN testiyle kromozomal hasara neden olup olmadığı belirlenmiştir. Bunun için, Şekil 4.31’de gösterildiği gibi MN testi gerçekleştirilmiş deney gruplarında etidyum bromür boyaması yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Çekilen fotoğraflarda (400×) etidyum bromür boyamasında farkedilmesi güç olabilecek MN yapılarının da tespit edilebildiği görülmektedir. Şekil 4.31A,B ve D kısımlarında MN yapıları görülmekte ve Şekil 4.31C’de bir nükleus tomurcuğu ayırt edilebilmektedir.



Şekil 4.31. *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması sonucunda oluşan MN ve Nbud. Beyaz →: MN, turuncu →: nükleus tomurcuğu (400×)

Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. MN, Nbud ve NDI değerleri her hücre soyunda normal dağılım göstermiş, istatistikî analizde Student’s t testi uygulanmıştır. *A. sibthorpianus* ekstraktı MCF-7 hücrelerinde MN ve Nbud oluşumu

üzerinde anlamlı bir fark yaratmamıştır. Ancak, NDI’de anlamlı bir düşme vardır. NDI değerindeki düşmeler sitostatik ajanların yarattığı etkiyi yansıttığı için ekstrakt MCF-7 hücrelerinde ve bu uygulama koşullarında sitostatik bir ajan olarak etki göstermiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde Nbud ve NDI için anlamlı bir değişim söz konusu değildir. MN değerlerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış vardır, ancak MN değerindeki artışın seviyesi düşüktür. MCF-10A hücrelerinde de NDI değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Buna karşın, *A. sibthorpianus* ekstraktının bu hücre soyunda MN ve Nbud oluşumunu anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir. MN sayısı yaklaşık 2 kat, Nbud sayısı ise yaklaşık 3 kat yükselmiştir.

Çizelge 4.7. IC₅₀ dozunda *A. sibthorpianus* ekstrakt uygulaması sonrası MN testi (ortalama ± standart sapma)

Hücre soyu	Uygulama grupları	Çözgen kontrol (1:1000 DMSO)	<i>A. sibthorpianus</i> IC ₅₀
MCF-7	MN ^a (‰)	26,24 ± 2,74	30,91 ± 2,61
	Nbud ^b (‰)	16,64 ± 2,15	15,68 ± 1,53
	NDI ^c	2,25 ± 0,09	1,64 ± 0,06**
MDA-MB-231	MN (‰)	11,04 ± 1,13	14,40 ± 1,26*
	Nbud (‰)	16,38 ± 0,14	15,94 ± 0,60
	NDI	1,51 ± 0,09	1,49 ± 0,05
MCF-10A	MN (‰)	10,57 ± 0,23	20,54 ± 0,49***
	Nbud (‰)	3,48 ± 0,39	9,69 ± 0,34***
	NDI	0,81 ± 0,04	0,83 ± 0,06

*; p<0,05, **; p<0,005, ***; p<0,0001.

^a mikronükleus

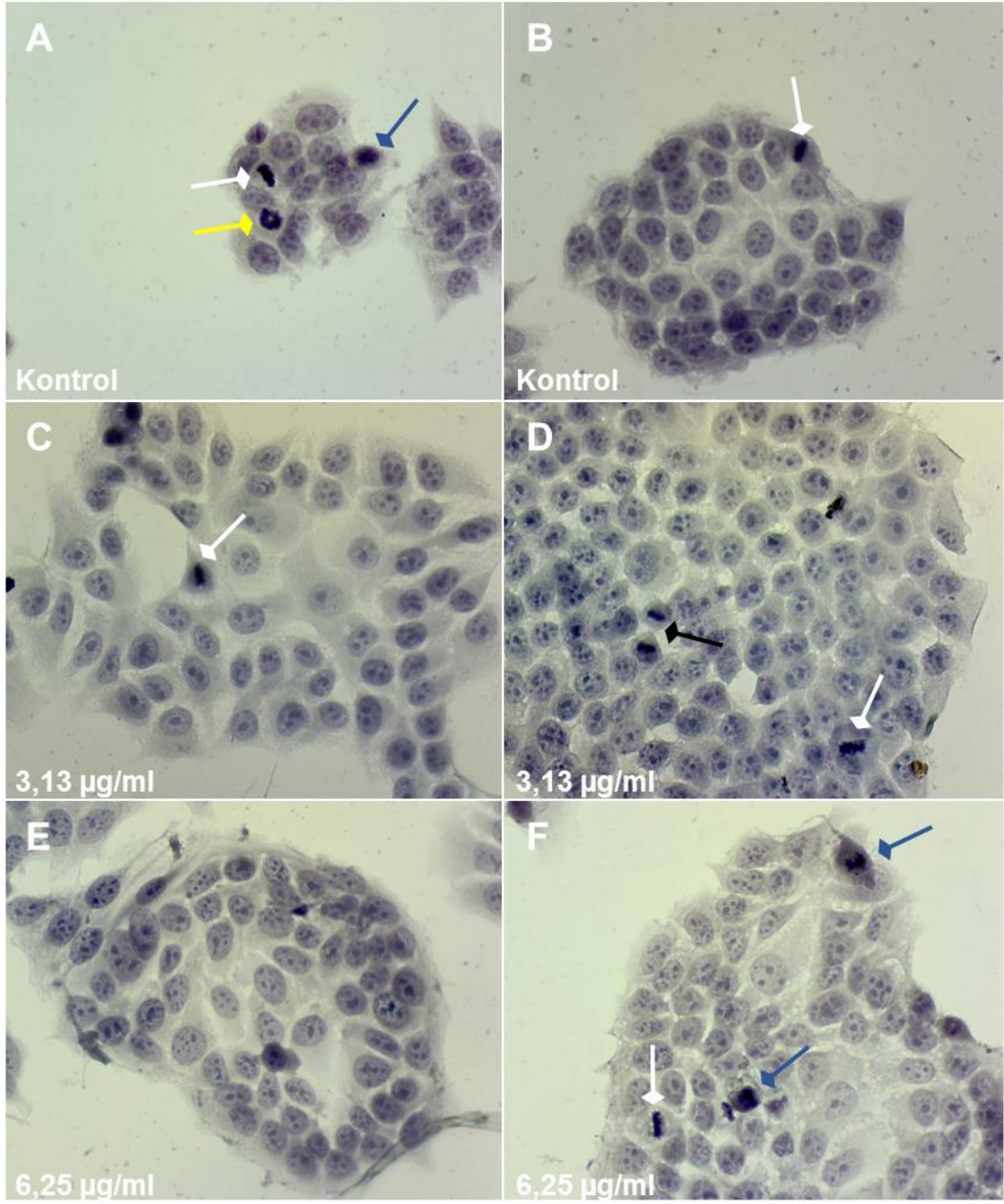
^b nükleus tomurcuğu

^c nükleus bölünme indeksi

Başlangıçta düşünülen deney planı, *A. multifida* ve *A. sibthorpianus* ekstraktlarının ikisinde de MN testi yapılmasını kapsamaktadır. Ancak *A. multifida* ekstraktı IC₅₀ dozu ve sitokalazin B uygulaması sonrasında mikroskopik incelemede binükleer hücre yüzdesinin beklenenden oldukça düşük olduğu fark edildiğinden *A. multifida* ekstraktının hücrenin olağan mitotik döngüsünü olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, yüksek oranda toksik olan 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonları hariç tutularak 48 saatlik *A. multifida* ekstrakt uygulamasını takiben hematoksilen boyama gerçekleştirilmiştir. MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A

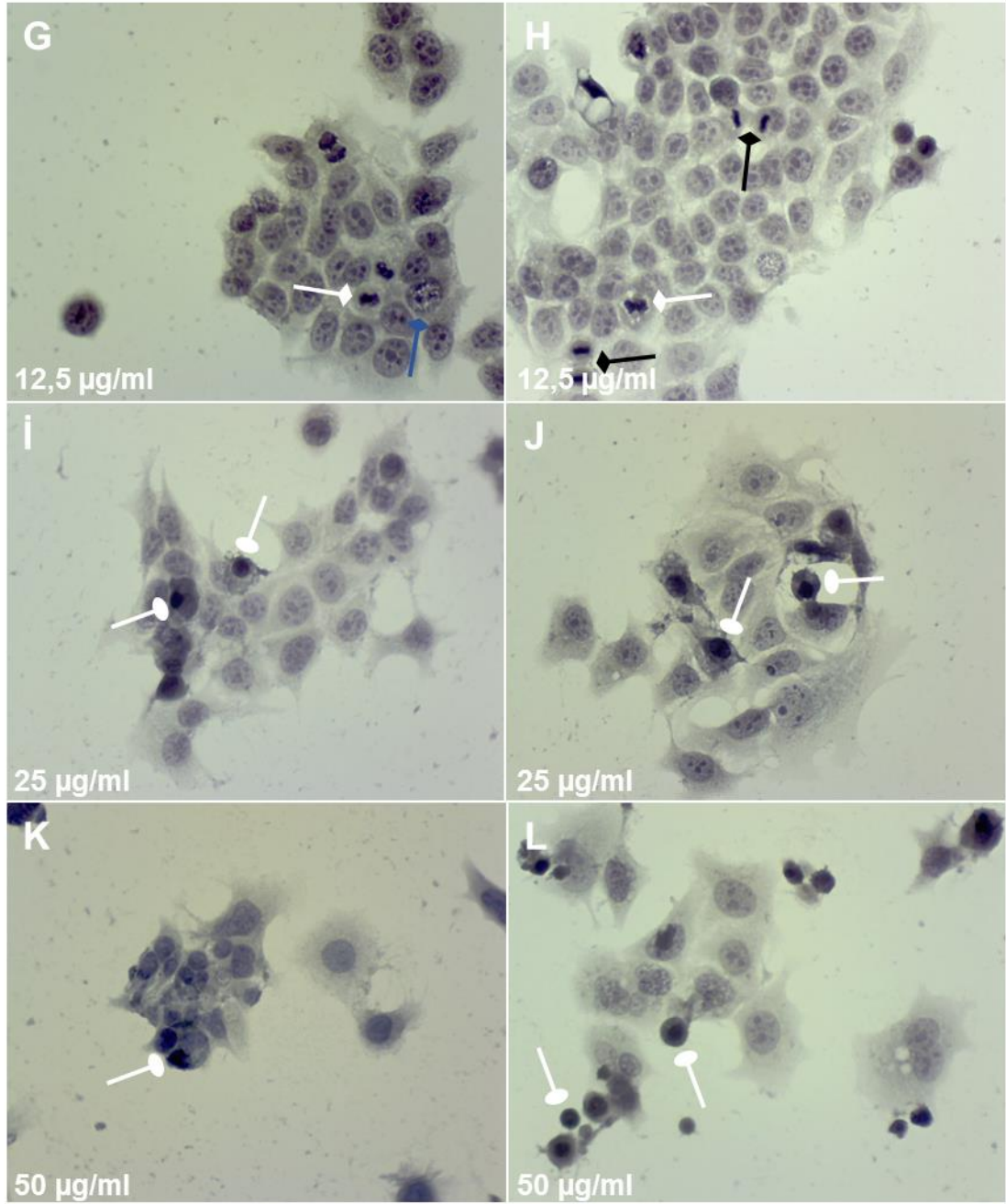
hücrelerinde mikroskopik inceleme yapılan örneklere ait temsili fotoğraflar sırasıyla Şekil 4.32, Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te gösterilmektedir. Hematoksilen boyaması yapılmış hücrelerde kontrol hücreleri (A-B), 3,13 µg/ml *A. multifida* ekstrakt konsantrasyonu (C-D), 6,25 µg/ml *A. multifida* ekstrakt konsantrasyonu (E-F), 12,5 µg/ml *A. multifida* ekstrakt konsantrasyonu (G-H), 25 µg/ml *A. multifida* ekstrakt konsantrasyonu ( -J), 50 µg/ml *A. multifida* ekstrakt konsantrasyonuna (K-L) ait fotoğraflar yukarıda adı verilen şekillerde gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde nükleus/sitoplazma oranı yüksek olduğu için nükleus anomalilerinin isabetli bir biçimde değerlendirilmesi mümkün olamamıştır. MCF-7 hücrelerinde mitotik indeks kontrol grubuna kıyasla 3,13 ve 12,50 µg/ml konsantrasyonda yükselmiş, 6,25 µg/ml konsantrasyonda sabit kalmış ve 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda ise dramatik derecede düşmüştür. Mitotik figürler Şekil 4.32A-H kısımlarında işaretlenmiştir. Piknotik nükleusa sahip hücreler, toksik etkinin belirgin olduğu 25 ve 50 µg/ml dozlarda görülmektedir (Şekil 4.32 -L). Nükleuslar pürüzsüz dairesel morfolojileri ile diğer sağlıklı hücrelerden ayırt edilebilmektedir. Bu dozlarda, mitotik indeksin düşüklüğü *A. multifida* ekstraktının yarattığı sitotoksik etkinin artmasıyla açıklanabilir.

MCF-7



Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoxilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), • : piknotik nükleus (beyaz) (400×)

MCF-7

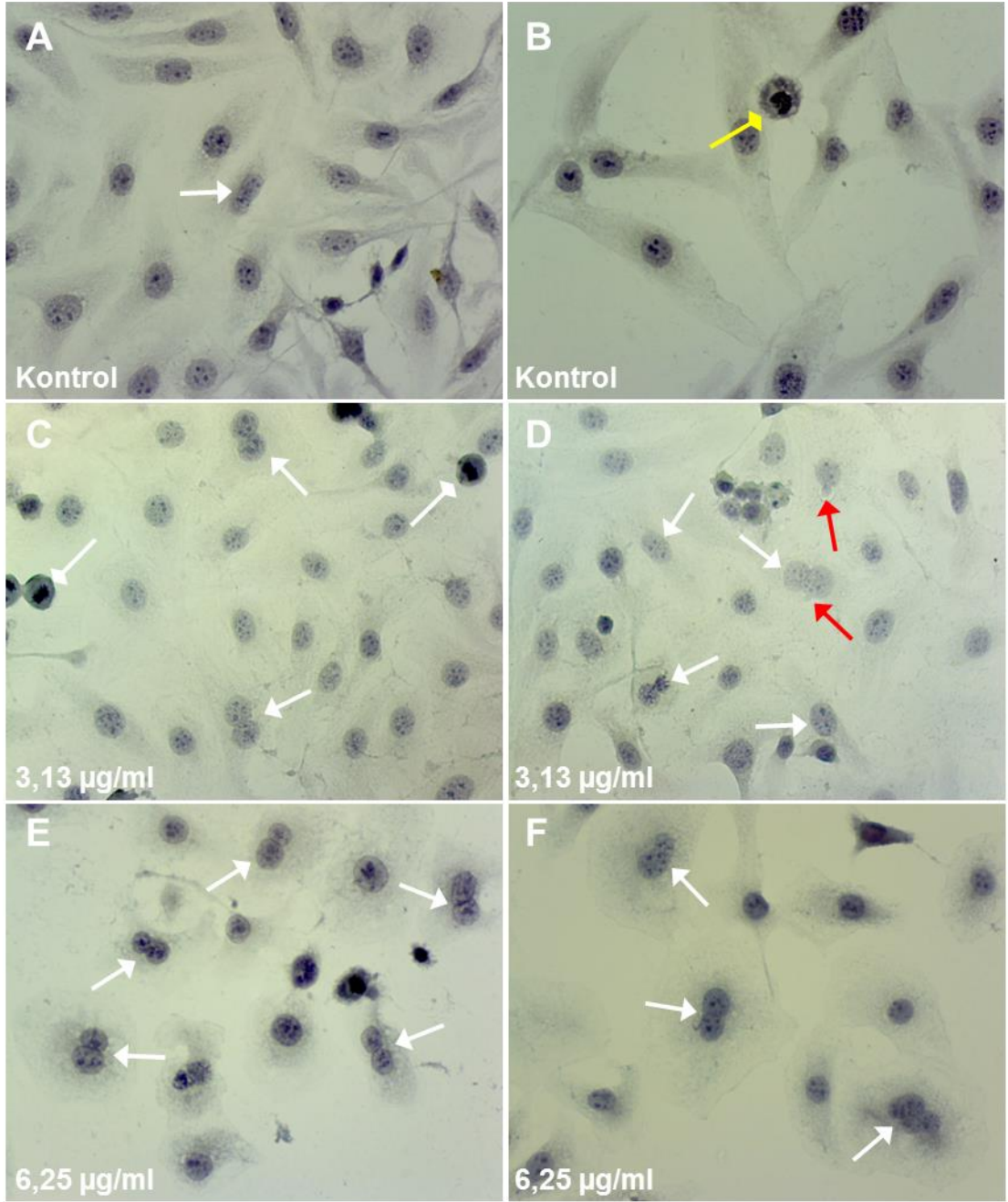


Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoksilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×) (devam)

MDA-MB-231 hücrelerinde mitotik indeks 3,13, 6,25 ve 12,5 µg/ml dozlarında yükselmiş, 25 ve 50 µg/ml gibi artan dozlarda ise önce düştüğü ve sonrasında kontrol hücre popülasyonundaki düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8). *A. multifida*

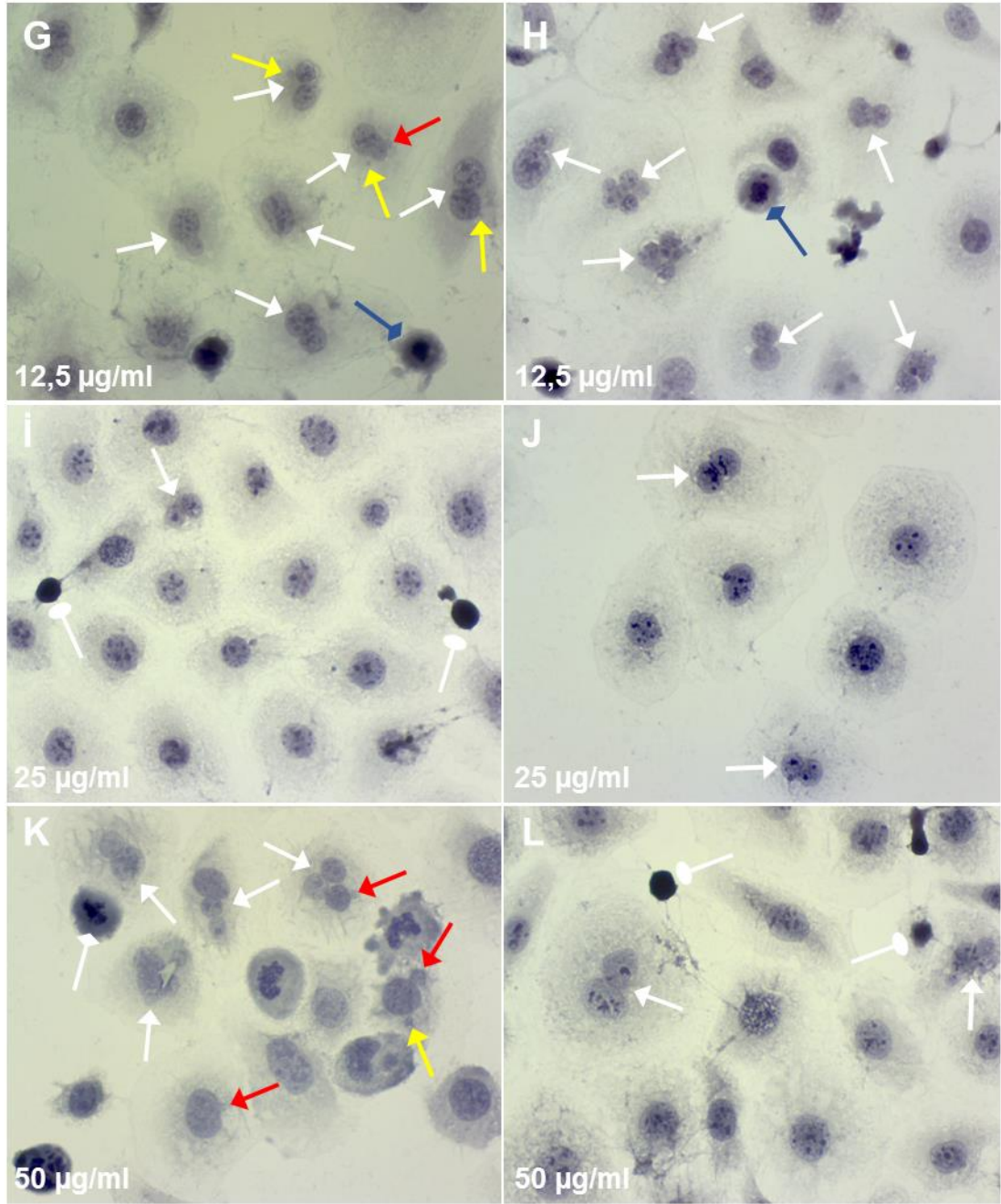
ekstraktının 12,5 µg/ml konsantrasyonu MN, Nbud ve multinükleasyonların oluşumunu dramatik biçimde yükseltmiştir. Şekil 4.33G-H'de görüldüğü üzere bazı alanlarda yaklaşık her hücrede bir nükleus anomalisi tespit edilmiştir. Bazı durumlarda binükleer hücre oluşumu, MN ve Nbud varlığı gibi birden fazla anomali tek bir hücrede mevcut olabilmektedir (Şekil 4.33G). Bazı hücrelerde ise 5 nükleus içeren multinükleasyon örnekleri gözlenmiştir (Şekil 4.33H). *A. multifida* ekstraktının 12,5 µg/ml konsantrasyonu toksik etkiler gösteren bir doz değildir. Aksine, mitotik indeksi yükseltici etki göstermiştir. Benzer etkiler diğer bütün dozlarda da gözlenmiştir, ancak en yüksek olarak 12,5 µg/ml konsantrasyonda görülmüştür. Bu konsantrasyona kıyasla 3,13 ve 6,25 µg/ml konsantrasyonlarda doza bağımlı olarak multinükleasyon yüzdesi yükselmiş, 25 µg/ml konsantrasyonda ise bir azalmadan sonra kısmen tekrar artmıştır. MCF-10A hücrelerinde mitotik indeks uygulanan en düşük konsantrasyon olan 3,13 µg/ml dozda yükselmiştir, ancak artan dozlarda kontrol grubuna göre azalma vardır (Çizelge 4.8). Diğer dozların içinde en yüksek mitotik indeks değeri 12,5 µg/ml dozundadır (% 1,30). MN ve Nbud değerleri kontrol grubunda MDA-MB-231 hücre soyuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Artan dozlarda *A. multifida* ekstrakt uygulaması MN ve Nbud değerlerini yükseltmemiş, aksine 50 µg/ml dozunda bir azalma meydana gelmiştir. MCF-10A hücrelerinin kontrol grubunda multinükleus içeren hücrelerin oranı MDA-MB-231 hücre soyununkinden yüksektir. Dolayısıyla başlangıç aşamasında MCF-10A hücrelerindeki nükleus anomali miktarı daha yüksektir. Toplam multinükleer hücrelerin yüzdelere bakıldığında MCF-10A hücrelerinde olduğu gibi 12,5 µg/ml konsantrasyonun dramatik biçimde multinükleasyonu indüklediği gözlenmiştir. 12,5 µg/ml dozunun altındaki ve üzerindeki dozlarda, 12,5 µg/ml konsantrasyonundan uzaklaştıkça multinükleer hücre sayıları da düşer, fakat kontrole göre yine de multinükleasyonu indükledikleri görülmektedir. Şekil 4.34'te *A. multifida* ekstrakt uygulaması sonrasında oluşan değişimler gösterilmiştir. İncelenen örnekler içerisinde mitoz bölünme anomalileri de tespit edilmiştir. Şekil 4.34C'de atipik bir mitotik figür görülmektedir. Şekil 4.34G-H temsili fotoğraflarında çok sayıda multinükleasyon örneği birarada görülebilir (örneğin Şekil 4.34H'ta 5 nükleus içeren bir hücre). Dolayısıyla buradaki sonuçların MDA-MB-231 hücrelerinde elde edilenlerle benzer olduğu ve *A. multifida* ekstraktının multinükleasyonu indükleyici etkisinin malignan ve non-malignan olmak üzere hücre soylarından bağımsız olduğu kanısına

MDA-MB-231



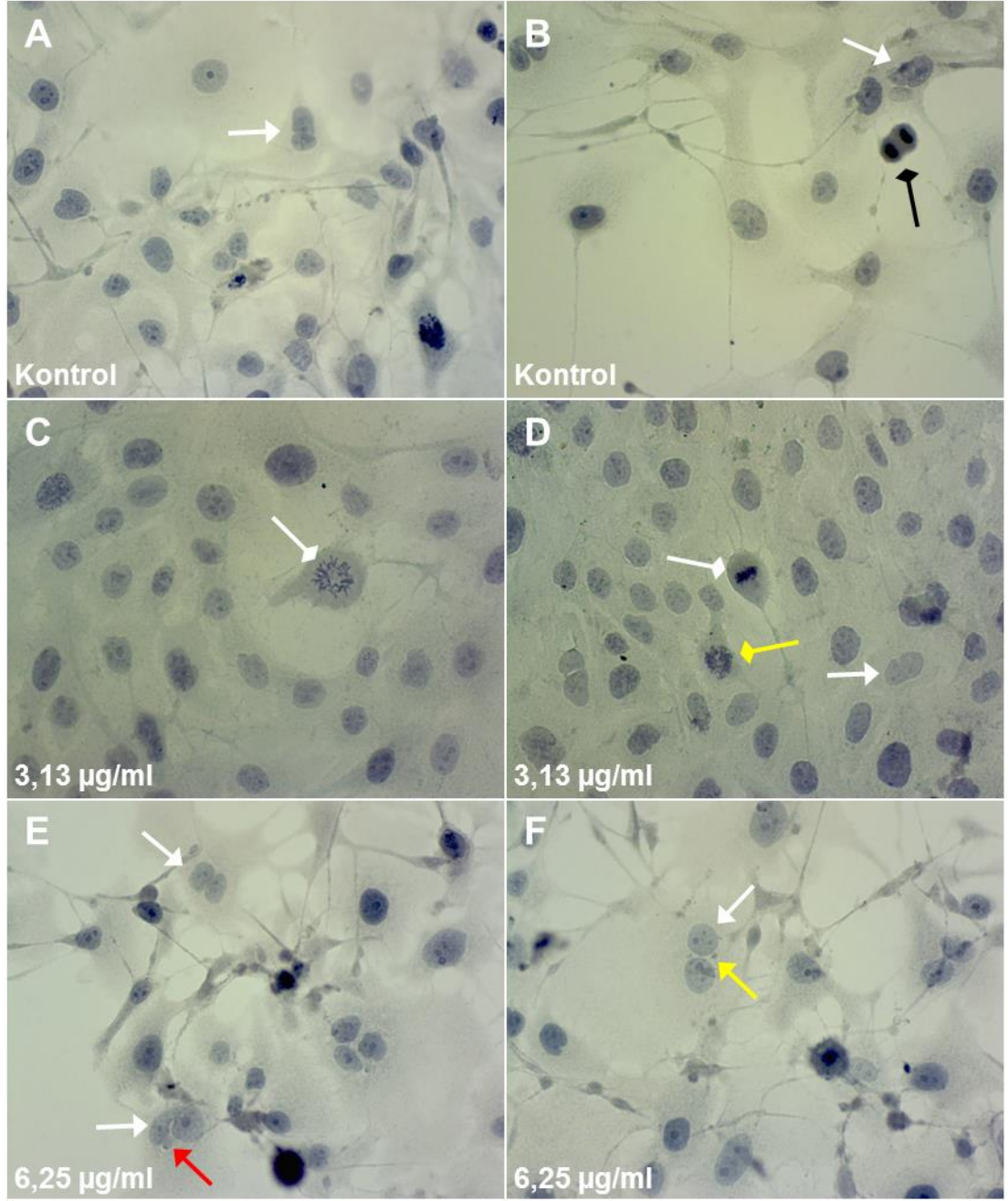
Şekil 4.33. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoksilin boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ►: nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×)

MDA-MB-231



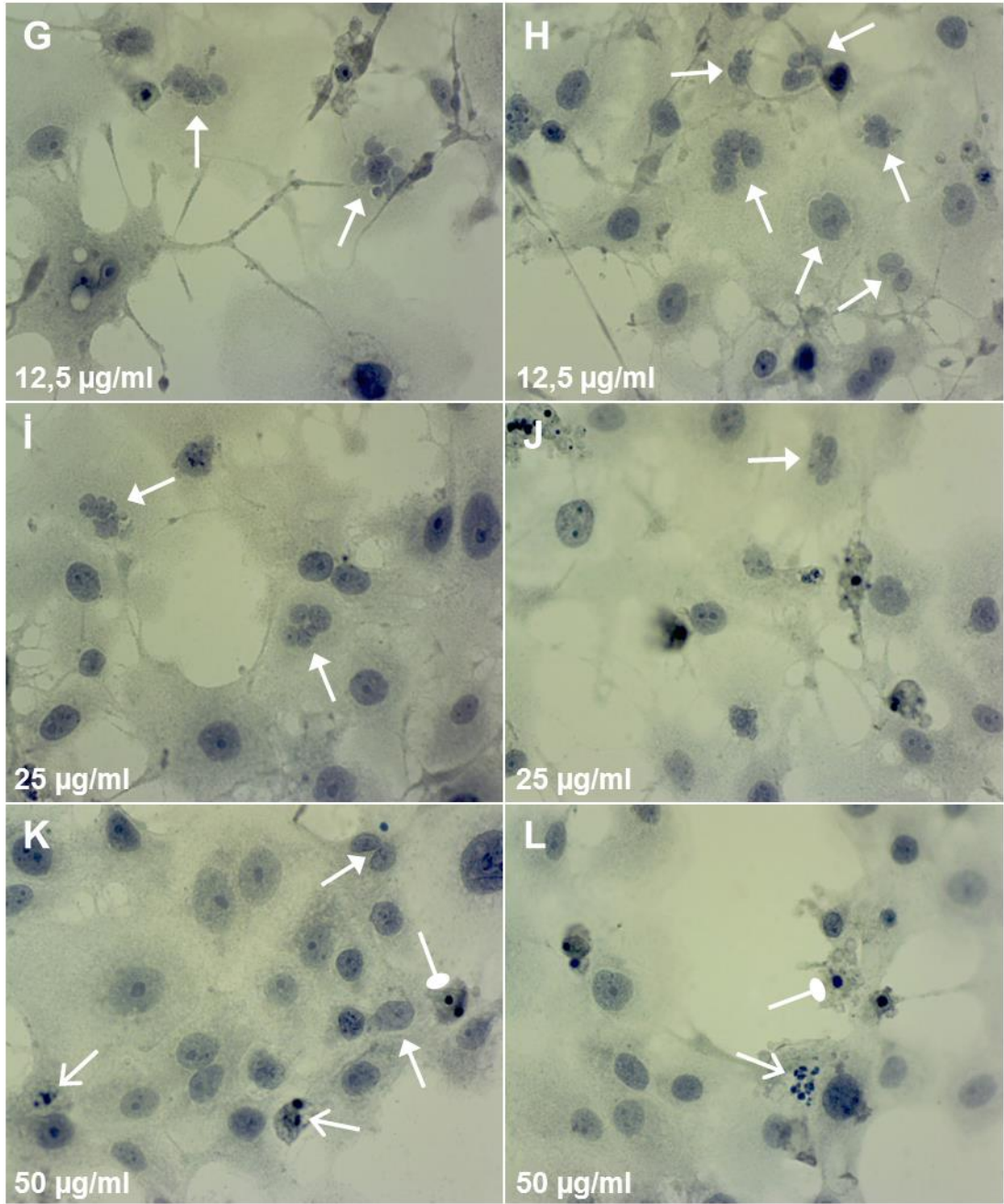
Şekil 4.33. MDA-MB-231 hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoksilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ► : nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×) (devam)

MCF-10A



Şekil 4.34. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoxilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ► : nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), > : nükleer fragmentasyon (beyaz), ● : piknotik nükleus (beyaz) (400×)

MCF-10A



Şekil 4.34. MCF-10A hücrelerinde *A. multifida* uygulaması sonrası hematoxilen boyama. → ucundaki figürlere göre; ♦ : mitotik figür (profaz-mavi, metafaz-beyaz, anafaz-sarı, telofaz-siyah), ▶ : nükleus anomalileri (multinükleasyon-beyaz, MN-sarı, Nbud-kırmızı), > : nükleer fragmentasyon (beyaz), • : piknotik nükleus (beyaz) (400×) (devam)

varılabilir. Daha yüksek dozlarda ise ortaya çıkan görüntü biraz daha farklıdır. MDA-MB-231 hücrelerinden farklı olarak 50 µg/ml’de piknotik nükleus yapılarının yanı sıra nükleer fragmentasyonlar da bulunmaktadır (Şekil 4.34K-L). Ayrıca, kondanse ve hiperkromatik özellikteki tipik apoptotik nükleusların MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenenlerden daha düşük bir çapa sahip olduğu söylenebilir (Şekil 4.34K-L). Üç hücre soyu için de mikroskopik incelemeler gerçekleştirildikten sonra sonuçlar bir tablo halinde biraraya getirilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *A. multifida* uygulaması sonrası hematoksilen boyamayla mitotik figür yüzdeleri ve nükleus anomalileri

Hücre soyu	Konsantrasyon (µg/ml)	Mitotik figür (%)	MN* (%)	Nbud** (%)	Multinükleer		
					Binükleer (%)	Diğer multinükleer (N _{nükleus} > 2) (%)	Toplam (%)
MCF-7	Kontrol	1,44	-	-	-	-	-
	3,13	1,82	-	-	-	-	-
	6,25	1,41	-	-	-	-	-
	12,50	2,03	-	-	-	-	-
	25	0,28	-	-	-	-	-
	50	0,58	-	-	-	-	-
MDA-MB-231	Kontrol	2,44	0,22	0,00	0,55	0,20	0,75
	3,13	3,47	0,29	0,25	1,04	6,42	7,46
	6,25	3,51	0,39	0,59	13,94	4,00	17,94
	12,50	5,35	1,17	3,39	15,52	5,61	21,13
	25	0,72	0,36	1,81	6,52	1,99	8,51
	50	2,50	2,51	2,31	9,25	3,08	12,33
MCF-10A	Kontrol	2,38	3,39	1,83	2,75	0,6	3,35
	3,13	2,75	3,30	2,25	5,51	1,42	6,93
	6,25	0,74	3,26	2,81	6,20	2,07	8,27
	12,50	1,30	2,76	2,76	6,50	11,64	18,14
	25	0,50	2,45	1,47	5,37	2,12	7,49
	50	0,60	1,59	0,48	4,44	0,63	5,07

*: Mikronükleus

** : Nükleus tomurcukları.

4.6 Ekstraktların Antioksidan Kapasitelerinin Tayini

Tez konusu oluşturan bitkilerin antioksidan kapasitelerini tayin etmek üzere, bitkilerin fenolik içeriklerini belirlemeye yönelik olarak DPPH ve CUPRAC testleri kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarında DPPH radikalinin yarısını süpürücü etki gösteren (IC₅₀) konsantrasyonlar Çizelge 4.9’da verilmiştir. Troloks, askorbik asit ve gallik asit referans maddeler olarak kullanılmıştır. Buna göre, en yüksek antioksidan kapasiteye sahip ekstrakt *A. sibthorpianus* olarak belirlenmiştir. *T. pichleri* ve *P. pilosum* ekstraktlarında ise kısmi bir antioksidan aktivite görülmüştür. Bunların dışındaki ekstraktlarda antioksidan aktivite zayıftır.

Çizelge 4.9. Ekstrakt ve referans maddelerin DPPH testiyle belirlenmiş antioksidan kapasiteleri

Ekstrakt	DPPH süpürücü aktivite (IC ₅₀) (µg/ml)
<i>H. humile</i>	257,84 ± 30,66
<i>O. caespitosum</i> toprak altı kısımları	479,71 ± 25,71
<i>O. caespitosum</i> toprak üstü kısımları	210,58 ± 6,23
<i>A. multifida</i>	101,51 ± 0,33
<i>C. drabifolia</i>	210,60 ± 29,51
<i>D. bithynicum</i>	97,39 ± 1,48
<i>S. olympicus</i>	171,35 ± 0,85
<i>T. pichleri</i>	69,36 ± 1,20
<i>G. olympica</i>	502,37 ± 8,37
<i>E. campylopoda</i>	507,44 ± 12,04
<i>A. sibthorpianus</i>	22,09 ± 0,75
<i>P. pilosum</i>	84,36 ± 2,57
<i>D. oleoides</i>	101,91 ± 6,31
Askorbik asit	5,01 ± 0,06
Gallik asit	1,29 ± 0,04
Troloks	7,71 ± 1,05

Ekstaktların CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasiteleri Çizelge 4.10’da verilmiştir. Diğer maddelerin antioksidan kapasitelerinin troloksun antioksidan kapasitesi temel alınarak ifade edildiği bu tabloda da *A. sibthorpianus* antioksidan

kapasitesi en yüksek ekstrakt olarak belirlenmiştir. Bu bitkiyi takiben sırasıyla *P. pilosum*, *T. pichleri* ve *D. bithynicum* gelmektedir. Dolayısıyla, her iki testte de birbiriyle uyumlu, benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.10. Ekstrakt ve referans maddelerin CUPRAC testiyle belirlenmiş antioksidan kapasiteleri

Ekstrakt	CUPRAC antioksidan kapasite ($\mu\text{g TE}/\mu\text{g ekstrakt}$)
<i>H. humile</i>	$0,08 \pm 0,001$
<i>O. caespitosum</i> toprak altı kısımları	$0,04 \pm 0,001$
<i>O. caespitosum</i> toprak üstü kısımları	$0,07 \pm 0,007$
<i>A. multifida</i>	$0,13 \pm 0,004$
<i>C. drabifolia</i>	$0,08 \pm 0,005$
<i>D. bithynicum</i>	$0,15 \pm 0,007$
<i>S. olympicus</i>	$0,14 \pm 0,015$
<i>T. pichleri</i>	$0,20 \pm 0,020$
<i>G. olympica</i>	$0,03 \pm 0,002$
<i>E. campylopoda</i>	$0,04 \pm 0,007$
<i>A. sibthorpianus</i>	$0,43 \pm 0,019$
<i>P. pilosum</i>	$0,22 \pm 0,013$
<i>D. oleoides</i>	$0,14 \pm 0,021$
Askorbik asit	$1,82 \pm 0,040$
Gallik asit	$3,92 \pm 0,190$
Troloks	$1,00 \pm 0,000$

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Uludağ Milli Parkı'ndan toplanan bitkiler kullanılarak antioksidan kapasite, sitotoksikite ve genotoksikite parametreleri araştırılmıştır. Tez konusuna benzer şekilde, önceki yıllarda dünyanın çeşitli bölgelerinde yerel, ulusal veya belli bir coğrafi bölgeye ait sınırlar kullanılarak bitkilerin antioksidatif veya sitotoksik özellikleri tarama çalışmalarıyla araştırılmıştır (Sathiyamoorthy ve ark. 1999, Rethy ve ark. 2007, Khalighi-Sigaroodi ve ark. 2012, Behzad ve ark. 2014). Coğrafi sınırlamaların dışında, geleneksel olarak kanser tedavisinde kullanılan bitkilerin derlendiği ve antikanser özelliklerinin araştırıldığı bir çalışma da mevcuttur (Talib ve Mahasneh 2010). Ayrıca, Macaristan'da gerçekleştirilen bir tarama çalışmasında da familya temelinde bir seçim yapılmış, Asteraceae familyasına ait bitki türlerinin antiproliferatif etkilerinin belirlenmesi kapsamında toplam 51 tür taranmıştır (Rethy ve ark. 2007, Csupor-Löffler ve ark. 2009a, Csupor-Löffler ve ark. 2009b). Elde edilen toplam 428 n-hekzan, kloroform ve metanol-su (1:1, v/v) ekstraktı, 3 kanser hücre soyunda MTT testi kullanılarak denenmiş ve 41 adedinin 10 µg/ml dozunda kayda değer (> %50 inhibisyon) bir sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Csupor-Löffler ve ark. 2009a, Csupor-Löffler ve ark. 2009b). Sathiyamoorthy ve ark. (1999) ise içinde *Achillea*, *Gypsophila* ve *Ephedra* cinslerine ait türlerin de bulunduğu 66 bitkinin su ekstraktını 500 µg/ml konsantrasyonda 1 melanom hücre soyunda ve sıtma etkenine karşı nötral kırmızı testiyle taramışlardır. *Gypsophila arabica* ve *Achillea fragrantissima* türlerinin melanom hücrelerinde yarattığı büyüme inhibisyonu % 97'nin üzerindedir, fakat bu çalışmada oldukça yüksek bir doz seçilmiştir (Sathiyamoorthy ve ark. 1999). Khalighi-Sigaroodi ve ark. (2012) bir *Astragalus* türünü de içeren 23 bitki türünün metanol ekstraktlarıyla gerçekleştirdiği tarama çalışmasında tuzlu su karidesleriyle sitotoksik aktiviteyi belirlemiş, etkili ekstraktların antioksidan özelliklerini araştırmıştır. En etkili olan *Taverniera sparteae* ekstraktında LC₅₀ değeri 0,34 µg/ml olarak belirlenmiştir (Khalighi-Sigaroodi ve ark. 2012). Burada söz konusu test bir hücre canlılık testinden ziyade, bir canlıda gerçekleştirilen toksisite (letalite) testidir ve farklı bir kategoride değerlendirilmelidir. İran'da gerçekleştirilen, 11 bitkinin 4 kanser hücre soyunda tarandığı bir çalışmada *Centaurea* ve *Tripleurospermum* türleri de yer almıştır (Behzad ve ark. 2014). En etkili olan *Primula auriculata* ekstraktının IC₅₀ değeri meme,

karaciğer ve kolon kanser hücre soylarında 25-50 µg/ml arasında değişmektedir (Behzad ve ark. 2014). Burada belirtilen tarama çalışmaları yakın coğrafyada bulunan, bitki çeşitliliği yüksek bölgelerde 11-66 arasında değişen bitki türüyle yürütülmüştür. Bitkilerden ekstrakt hazırlama yöntemleriyle birlikte, son noktada kullanılan hücre canlılık testleri de değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmalarda en etkin örneklerle bakıldığında daha düşük büyüme baskılayıcı özelliklere sahip ekstraktlar keşfedilmişse de bu çalışmadakine benzer IC₅₀ değerleriyle noktalan tarama çalışması da vardır. Bu tez çalışmasında ABD Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) 1955'ten bu yana tarama çalışmalarında kullandığı SRB testi tercih edilmiştir (Boyd 1997). Şu an klinik kullanımda olan paklitaksel gibi moleküllerin tarama çalışmaları aracılığıyla keşfedildiği dikkate alındığında tarama çalışmalarının bu anlamda bir potansiyel barındırdığı görülmektedir.

Tarama çalışmalarında kullanılan bitki ekstraktlarından özellikleri daha fazla araştırılmaya değer olanların seçilmesi önem arz eder. Burada, en yüksek büyüme baskılayıcı etkiye sahip 2 bitki seçilmiş ve hücre ölümüne nasıl yol açtığı ve genotoksik özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Göz önüne alınan önemli bir nokta, Boyd ve Paull (1995)'un belirttiği gibi çalışılan maddeler için “aktif” veya “inaktif” şeklinde belirli tanımlamalar yapmaktan kaçınıp üretilmiş verileri dikkate alarak sonraki adımların planlanmasıdır. Dolayısıyla, bir ön tarama testi olarak SRB yöntemi kullanılmış ve en etkin olan *A. sibthorpianus* ve *A. multifida* ekstraktlarından elde edilen sonuçları doğrulamak için daha hassas olan ATP testi uygulanmıştır. Sonuçları doğrulama ihtiyacı, MTT gibi bazı canlılık testlerinin özellikle de bitki kökenli örneklerde hücre canlılığını doğru yansıtmayışındandır (Boyd 1997, Ulukaya ve ark. 2008). ATP ve SRB canlılık testleri karşılaştırıldığında ATP testinde ortaya çıkan IC₅₀ değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Sonraki aşamalarda da bu değerler dikkate alınmıştır. Literatüre bakıldığında *Astragalus* türlerinin sahip olduğu zengin içerik ve bu içeriği oluşturan moleküllerin biyolojik aktiviteleri Yang ve ark. (2013) ve Li ve ark. (2014) tarafından yakın zamanda derlenmiştir. *Astragalus* türlerinden izole edilen birçok farklı molekül grubunda antikanser aktivite tespit edilmiştir. Bunlar içinde bu bitkilerden elde edilen saponin, triterpen bileşikler, lektin, flavonoid ve izoflavonoidler bulunmaktadır (Buhagiar ve ark. 2008, Yan ve ark. 2009, Lacaille-Dubois ve ark. 2011, Yalcin ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2012). Daha etkili *Astragalus* ekstraktlarında 10-15 µg/ml ve

altında IC₅₀ değerleri görülmüştür (Yan ve ark. 2009, Huang ve ark. 2012). Bunun yanında, IC₅₀ değerlerinin yaklaşık 0,5 mg/ml mertebelerinde olduğu yayınlar da mevcuttur (Arıcan ve ark. 2014). Bu çalışmada ise en yüksek sitotoksik etki, *A. sibthorpianus* ekstraktında MCF-7 hücrelerine karşıdır (IC₅₀ 30,41 µg/ml). Bu bitkinin ardından ise *A. multifida* gelmektedir. Literatürde farklı *Achillea* türlerinde antikanser aktivite gösteren ekstraktlara rastlanmaktadır. Bunlardan saflaştırılan bileşiklerin de oldukça etkili olduğu görülmüştür. *A. multifida* ekstraktı, literatürde sıklıkla kullanılan *A. millefolium* ekstraktıyla karşılaştırılabilir. Yedi hücre soyu içeren bir hücre panelinde (insan kolon, gastrik, hepatoselüler, akciğer ve meme kanseri, melanom ve normal fibroblast hücre soyları) *A. millefolium* ekstraktının IC₅₀ değerleri 22-66 µg/ml arasında değişmiştir (Ghavami ve ark. 2010). Ghavami ve ark. (2010) çalışmasında MCF-7 hücre soyundaki 64,05 µg/ml IC₅₀ değerine karşılık bu çalışmada elde edilen IC₅₀ değeri 69,34 µg/ml'dir. Buna karşılık, *Achillea fragrantissima* su ekstraktında olduğu gibi 2,43 mg/ml gibi yüksek IC₅₀ değerlerine de rastlanmıştır (Thoppil ve ark. 2013).

A. multifida ekstraktının biyolojik etkinliği değerlendirildiğinde hücre soylarından bağımsız bir sitotoksik aktivite gösterdiği söylenebilir. Ekstraktın indüklediği hücre ölümü mikroskopik olarak incelendiğinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 50 µg/ml ve üzeri dozlarda piknotik nükleus ve PI pozitif boyanmayla karakterize ölüm modu olarak apoptozis temelinde sekonder nekrozis gerçekleştiği belirtilebilir. *A. multifida* ekstraktı bütün hücre soylarında DNA hasarını indüklemektedir. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde 4 ve 24 arasında GHİ yaklaşık 2 kat yükselmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise değişmemiştir. Bütün hücrelerde DNA hasarının indüklenmesi, *A. multifida* ekstraktı tarafından DNA hasar aracılı bir hücre ölümünün gerçekleştiğini telkin etmektedir. *A. multifida* ekstraktının genotoksik etkileri MN testiyle incelenmek istendiğinde gözlenen binükleer hücre sayısının oldukça düşük olmasından hareketle hücre soylarında mitotik indeks araştırılmıştır. Ancak, mitotik figürler incelenirken çok sayıda nükleus anomalisi göze çarpmıştır. Özellikle 12,5 µg/ml dozunda, MCF-10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde binükleer veya daha fazla nükleus içeren hücreler yaklaşık %20 gibi bir orana yükselmiştir. Oldukça çarpıcı olan bu bulgu *A. multifida* ekstraktının hücre ölümünü indüklemeyen dozlarında multinükleasyona yol açtığını göstermektedir. Bunun yanında, 12,5 µg/ml dozunda *A. multifida* uygulaması MDA-MB-231 hücrelerinde MN ve Nbud yüzdesini de yükseltmiştir. Bu durumu daha kapsamlı

açıklayabilmek için ilk olarak *A. multifida* veya farklı *Achillea* türlerinin içerik analizleri ve genotoksik etkilerinden faydalanılabilir. *A. multifida* bitkisinden antimikrobiyal aktivite gösteren seskiterpen laktonlar, flavonlar izole edilmiş ve esansiyel yağ içeriği analiz edildiğinde α -thujone (% 60,9), β -thujone (% 9,1) ve sabinen (% 4,1) moleküllerince zengin olduğu görülmüştür (Aljancic ve ark. 1999, Başer ve ark. 2002). Benzer içerik analiziyle *Achillea millefolium* esansiyel yağları belirlenmiş ve izole edilen esansiyel yağ karışımının 25 μ l/ml konsantrasyonda (% 0,7 v/w verim) anlamlı genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Sant'Anna ve ark. 2009). Bu bitki türünde tespit edilen esansiyel yağlar chamazulene (%42,15), sabinen (%19,72) ve terpin-4-ol (%5,22) molekülleridir. Yüksek oranda bulunan içerik *A. multifida* ile karşılaştırıldığında sadece sabinen molekülünün ortak olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, *A. multifida* ekstraktının *A. millefolium* esansiyel yağları ile benzer bir içeriği sahip olmadığı söylenebilir. Bununla birlikte, *A. millefolium* su ekstraktının 48 saatlik uygulamada mitotik indeksi anlamlı olarak yükselttiği gösterilmiştir, ancak kullanılan dozlar oldukça yüksektir (25-100 mg/ml) (Akyıl ve ark. 2012). Bu ekstrakt aynı deney koşullarında anafaz-telofaz anomalilerine ve binükleasyona yol açmaktadır (Akyıl ve ark. 2012). Bu etki de yüksek dozlarda ortaya çıktığı için ve multinükleasyonu (ikiden fazla nükleus içeren hücreleri) açıklamadığı için farklı literatürdeki farklı örnek çalışmalar da irdelenmiştir.

Genel olarak binükleasyon ve multinükleasyon birbirine benzer anomaliler olup bunların oluşumuna sebep olan olaylar da benzerdir. Binükleasyonun nedeni mitoz bölünmeyle ilişkiliyse mikrofilament halkanın oluşumundaki sorunlar, kromozomların ayrılmaması veya sorunlu telomer yapılarından dolayı hücre bölünmesinin problemlili bir şekilde işlemesinden kaynaklanan başarısız bir sitokinez söz konusudur (Bolognesi ve ark. 2013). Bunun dışında binükleasyon, sitoplazmanın bölünmeden nükleusun bölünmesi, hücre füzyonu veya amitotik nükleus bölünmesiyle gerçekleşebilir (Kusuzaki ve ark. 2001). Kusuzaki ve ark. (2001) bir çalışmalarında akridin oranjin kondrositlerde binükleer hücre frekansını 48 saatte yaklaşık 6 kat yükselttiğini görmüşlerdir. İncelenen preparatlarda üst üste örtüşen nükleusların durumu amitotik nükleus bölünmesi kökenli binükleasyona örnek olarak gösterilmiştir (Kusuzaki ve ark. 2001). Bunun yanında, mitoz bölünmedeki sorunlar multinükleasyonu uyarabilir. Örneğin, metafazda bazı etkenlerle çoklu iğ ipliği oluşumu, sitokinez safhasında

duraksama ve ardından multinükleasyon gözlenebilir (Zhou ve ark. 2003). Sitokinez safhasıyla ilgili bir örnekteyse, multinükleasyona yol açan *N*-hidroksisinnamid türevlerinin kolon adenokarsinom hücrelerinde Aurora A kinazı inhibe ettiği ve böylece sitokinezi bloklayabileceği belirtilmiştir (Liu ve ark. 2013). Zaten hücre bölünmesinde sitokinez aşamasında yakın zamanda potansiyel ilaç hedefi olarak ortaya çıkan proteinler polo-benzeri kinazlar (Plks) ve Aurora kinazlardır (Zhou ve ark. 2003, Liu ve ark. 2013). Binükleasyon veya multinükleasyonun indüklendiği çalışmalarda, binükleasyon için amitotik süreçler geçerli olsa da genellikle bu anomalilerin mitoz bölünme ve özellikle sitokinez yoluyla olduğu söylenebilir. *A. multifida* ekstraktının etkisiyle hem binükleer hem de daha fazla nükleusa sahip hücrelerin varlığı ve hücrelerin MN, Nbud gibi diğer anomalileri de sergilemeleri bu durumun daha çok mitozla ve belki de sitokinezle ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Bunun yanında, progesteronun hepatositlerde indüklediği gibi mitotik indeksin yükselmesi, binükleasyon ve mitotik anomalilerin oluşması eşzamanlı olarak gözlenebilen olgulardır (Boada ve ark. 2002). *A. multifida* ekstrakt (12,5 µg/ml) uygulamasında da meme kanser hücrelerinde mitotik indeks yükselmiştir. Ayrıca, yükselen dozlarda mitotik indeks düşmektedir. Buna paralel olarak da mitoz bölünmeye daha az hücre girdiği için multinükleasyon da azalma eğilimine girmektedir. Özetle, *A. multifida* ekstraktının düşük konsantrasyonlarda multinükleasyonu indüklemesi ve yüksek konsantrasyonlarda apoptotik hücre ölümüne yol açması açısından doza bağımlı olarak çift etki gösterdiği söylenebilir.

A. multifida türünün indüklediği multinükleasyon ile bir hücre ölüm modu olarak tanımlanan mitotik felaket arasında yakın bir ilişki vardır. Mitotik felaket yeni bir görüşe göre iki nedenden dolayı tercih edilebilecek bir hücre ölüm modudur. Birincisi, kanser hücrelerinde tetraploidi ve anöplodinin yaygın olması sebebiyle daha sık gerçekleşmesi muhtemel olan mitotik anomalilerdir (Vitale ve ark. 2011). İkinci olarak ise apoptozisi belli dozlarda tetikleyen çok sayıda kimyasalın düşük konsantrasyonlarında mitotik felaketi indükleyebilmesidir (Vitale ve ark. 2011). Eom ve ark. (2005) düşük doz doksorubisin uygulamasının hepatosellüler karsinom hücrelerini 6 günde multinükleasyon ve MN oluşumuyla birlikte mitotik felakete götürdüğünü, sonraki günlerde senesans benzeri bir süreçten sonra 9 günde büyük oranda hücre ölümünün gerçekleştiğini göstermişlerdir. Farklı bir örnek olarak, *Hyrtios* sp. deniz

süngerî ekstraktının multinükleasyon oluşumunu indükleyerek ve böylece mitotik felakete yol açarak kolorektal karsinom hücrelerini öldürmektedir (Lim ve ark. 2014). Bundan dolayı, multinükleasyon ve MN gibi oluşumlar mitotik felaket ile birlikte gerçekleşen hücre ölümlerinde karakteristiktir. *A. multifida* ekstraktı bu etkileri yarattığı konsantrasyonda yüksek oranda büyüme baskılayıcı etki göstermemiştir, ancak uygulama süresinin arttırılması halinde ortaya koyduğu etki büyüme baskılayıcı etki artabilir.

A. sibthorpianus ekstraktının biyolojik etkinliği değerlendirildiğinde kanser hücre soylarına karşı seçici sitotoksik olduğu, buna karşın malignan olmayan MCF-10A hücre soyunda daha yüksek konsantrasyonlarda hücre ölümünü indüklediği göze çarpmaktadır. MCF-10A hücrelerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden farklı olarak IC₅₀ dozunda dahi DNA hasar tamiri yaptığı komet testiyle belirlenmiştir. Dolayısıyla, hücre ölümünün DNA hasar aracılı olarak gerçekleştiği, sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerinin içsel olarak yüksek oksidatif stres ile karşı karşıya kalmaları ve DNA tamir mekanizmalarının kusurlu olması nedeniyle ekstraktın daha düşük dozlarda hücre ölümünü indükleyebildiği düşünülmektedir (Pelicano ve ark. 2004, Hanahan ve Weinberg 2011). Buna ek olarak, *Astragalus* türlerinin antioksidan kapasiteye sahip olduğu bilinmektedir (Yan ve ark. 2010). *A. sibthorpianus* türünün de antioksidan aktivite açısından yetkin olduğu bu çalışmada gösterilmiştir. Dolayısıyla, farklı *Astragalus* türleriyle ilgili yapılan çalışmalar göz önüne alındığında *Astragalus* izoflavonidlerinin özellikle ROS karşısında koruma sağladığı belirtilmiştir (Yu ve ark. 2005b). Önceki çalışmalarda farklı *Astragalus* ekstraktları kullanılarak yapılan uygulamalarda apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği ortaya konmuştur (Auyeung ve ark. 2010, Li ve ark. 2012). Mikroskopik incelemede de MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik dozlarda piknotik nükleus içeren bir hücre popülasyonunun varlığı ve aynı zamanda oldukça yüksek oranda gözlemlenen membran bütünlüğünü kaybetmiş (PI pozitif) apoptozisi işaret etmektedir. Buna karşın, MCF-10A hücrelerinde IC₅₀ dozu 100-200 µg/ml arasındadır ve bu dozlarda yapılan ikili boyamada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde görülen tabloya rastlanmamıştır. Mikroskopik alanda daha az sayıda hücre tespit edilmiş ve bunların diğer hücre soylarındaki gibi yüksek oranda PI pozitif olmadıkları saptanmıştır. Bu durum, MCF-10A hücrelerinde farklı bir ölüm şeklinin hâkim olduğunu göstermektedir. Farklı *Astragalus* türlerinin kromozom

hasarına yol açıp açmadığı incelenmiş ve sonuçta bu yönde bir etki göstermedikleri görülmüştür (Park ve ark. 2014). Ancak bu çalışmada, ilginç bir şekilde *A. sibthorpius* ekstraktı MCF-7 hücrelerinde MN frekansını değiştirmemiş, MDA-MB-231 hücrelerinde MN frekansını kısmen arttırmış, MCF-10A hücrelerinde ise MN frekansını anlamlı olarak yükseltmiştir. Bununla birlikte, MCF-10A hücrelerinde Nbud frekansı da anlamlı olarak artmıştır. Kullanılan dozlar hücre soylarında karşılık gelen IC₅₀ konsantrasyonları olduğu için hücre soyları arasında bir karşılaştırma yapılamaz ancak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkilerin görüldüğü dozların kromozom hasarına yol açmadığı söylenebilir. Buna karşılık, MCF-10A hücrelerinde sitotoksik konsantrasyonda aynı zamanda kromozom hasarını indüklediği görülmüştür. Bu veriler, komet testiyle karşılaştırıldığında, *A. sibthorpius* ekstraktının bütün hücre soylarında DNA hasarına yol açtığı (24 saat GHİ değerleri), fakat sadece MCF-10A hücrelerinde kromozom hasarını da indüklediği ortaya çıkmıştır. MCF-10A hücrelerinde kısmî olarak gerçekleşen DNA hasar tamirinin bu durumla bir ilişkisi olup olmadığı ise bilinmemektedir. MCF-10A hücrelerinde 4 ve 24 saatlik HHY ve GDİ değerleri dikkate alındığında sırasıyla % 56 ve % 16'lık azalma olduğu görülmektedir. HHY'ye kıyasla GDİ değerinin hesaplanmasında özellikle Tip 3 ve Tip 4 hücrelerin sayısı daha yüksek ölçüde katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, HHY değerindeki azalmanın daha yüksek olmasının nedeni aslında esas olarak DNA tamirinin Tip 1 ve Tip 2 hücrelerde gerçekleşmesidir. Görece ağır DNA hasarı olan hücrelerde (Tip 3 ve Tip 4) ise zamana bağlı olarak bir değişim meydana gelmemiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin komet testinde ortaya çıkan DNA hasarı karşılaştırıldığında hem kısa süreli hem de uzun süreli (4 ve 24 saat) uygulamalarda MDA-MB-231 hücrelerinin GDİ ve HHY değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Bunun sebeplerinden biri DNA hasar tamirinde önemli rol oynayan TP53 geninin MDA-MB-231 hücrelerinde mutasyon nedeniyle işlevsiz olması olabilir (Lacroix ve ark. 2006). Özetlenecek olursa, *A. sibthorpius* meme kanser hücrelerinde seçici olarak ve görece düşük dozlarda sitotoksik etkilidir. Normal hücre soyunda aynı dozlarda daha düşük sitotoksik aktivite göstermesi ise yüksek antioksidan kapasitesi nedeniyle kısmen de olsa DNA hasar tamirini sağlamasıyla ilişkilendirilmiştir.

Toplam 13 ekstraktın antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *A. sibthorpius* ekstraktının kayda değer bir antioksidan aktivitesi olduğu her iki test

sonucunda da görülmüştür. Diğer ekstraktların ise antioksidan kapasitelerinin oldukça sınırlı olduğu söylenebilir. *A. sibthorpianus* ekstraktının DPPH ve CUPRAC testlerine göre ve troloksa oranla antioksidan kapasitesi karşılaştırıldığında, sayılar arasında yaklaşık % 20'lik bir fark olduğu görülür. Farkın görece düşük olması, bu sonucun *A. sibthorpianus* ekstraktının antioksidan kapasitesini gerçekten de yaklaşık olarak yansıttığını telkin etmektedir. Çünkü çeşitli antioksidan kapasite tayin testleri arasında korelasyonların sıklıkla görüldüğü söylenemez. Örneğin, toplam fenolik içeriği veya başka bir deyişle bir örneğin toplam indirgeme kapasitesini ölçen Folin-Ciocalteu yöntemi ile TEAC (trolox eşdeğer antioksidan kapasite) ve DPPH testlerinin sıklıkla korele olduğu görülmüştür. Ancak standart maddelerin antioksidan kapasitelerinin ABTS, DPPH ve ORAC testleriyle ölçümlerinde bu testler arasında hiç bir zaman yüksek bir korelasyon söz konusu olmamıştır ($r^2 < 0,5$) (Tabart ve ark. 2009). Buna dayanarak CUPRAC testinde ortaya çıkan 0,43 troloks eşdeğerliğinin (g/g) DPPH testiyle doğrulandığı söylenebilir. Ancak genel olarak CUPRAC testinde belirlenen antioksidan kapasite DPPH testine göre daha düşüktür. Bunun nedeni, CUPRAC testinin daha çok flavonoid ve fenolik asitler gibi kısıtlı sayıda fenolik yapıya duyarlı olması olabilir (Apak ve ark. 2004, Sarıburun ve ark. 2010). Tez konusu diğer bitkilerin antioksidan aktivitelerine dair kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla beraber, aynı cinse mensup farklı türler için oldukça yüksek sayıda çalışma örnek gösterilebilir. *A. multifida* türünün antioksidan kapasitesi her iki testte de zayıf olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, DPPH radikali süpürücü aktivitesi IC_{50} değeri ile ifade edilen *Achillea biebersteinii*, *Achillea millefolium* ve *Achillea santolina* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri birbirine yakın olarak 45-55 $\mu\text{g/ml}$ aralığında (IC_{50}) bulunmuştur (Candan ve ark. 2003, Sökmen ve ark. 2004, Ardestani ve Yazdanparast 2007). Dolayısıyla diğer *Achillea* türlerinin antioksidan aktivitelerinin daha yüksek olduğu kanaatine varılabilir.

Bitkilerdeki saf madde kompozisyonu sadece antioksidan özellikleri değil, potansiyel sitotoksik ve antigenotoksik/genotoksik karakterleri de etkiler. Ekstraksiyon parametrelerine göre fenolik içeriğin yani antioksidan aktivitenin değiştiği bilinmektedir (Mao ve ark. 2006). Aynı zamanda, bitkilerin toplandığı zaman, bitkinin yaşı ve bölge elde edilen ekstrakt içeriğinin belirleyicilerindendir. Buna örnek olarak, farklı bölgelerden toplanmış ve izoflavonoid ve astragalosid içerikleri belirlenmiş *Astragalus*

kök örnekleri verilebilir (Huang ve ark. 2009). Toplam izoflavonoid miktarlarının ve kompozisyonların belirgin şekilde farklı olduğu 16 örnekte, antioksidatif kalitenin 1-7 yıllık bitki örnekleri içinde en düşük 1 yıllık örneklerde, en yüksek ise 3 yıllık örneklerde olduğu görülmüştür (Huang ve ark. 2009). Bu bilgiye dayanarak bitki ekstrakt çalışmalarında tekrarlanabilirliği düşük veriler üretileceği öngörülebilir. Dolayısıyla, çalışılan bitki ekstraktları üzerinden yapılacak antioksidatif aktivite tayininin yanı sıra diğer bütün test sistemleri için de benzer bir durum söz konusudur. Sonuç olarak, bu tarama çalışmasından ileri analiz yapmaya değer veriler edilmiştir. İlk olarak elde edilen veriler ışığında özgün sitotoksik aktivite anlamında hangi bitkilere yönelmenin daha isabetli olacağı tesbit edilmiştir. Ardından *A. sibthorpianus* ve *A. multifida* türlerinin sahip olduğu bu özelliklere genel bir çerçeve çizilmeye çalışılmıştır. Tezin konusu bir tarama çalışması yapmak olduğundan moleküler temelli analizler veya bitki ekstraktında bulunan saf maddelerin izolasyonu ve karakterizasyonu gibi konular tezin kapsamı dışında kalmaktadır. Bununla beraber, bahsedilen yönlerde çalışmalar yapılması her iki bitki türünde de yeni ve potansiyel sahibi moleküllerin keşfine yol açabilir. Nihai olarak, *A. sibthorpianus* ve *A. multifida* ekstraktlarında tez kapsamında ortaya konan farklı özelliklere dayanarak bu türlerin üzerinde ileri çalışmalar yapıldığı takdirde antikanser etkiye sahip olabilecek molekülleri içeren bir potansiyel bulunduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akpınar, K., Yıldırım, N., Üçüncü, O., Yaylı, N., Terzioğlu, S. 2009.** Volatile constituents of the flowers and leaves-stems of three *Doronicum* taxa from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 21(2): 1225-1229.
- Akyıl, D., Oktay, S., Liman, R., Eren, Y., Konuk, M. 2012.** Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Achillea teretifolia*. *Turkish Journal of Biology*, 36(4): 441-448.
- Aljancic, I., Vajs, V., Menkovic, N., Karadzic, I., Juranic, N., Milosavljevic, S., Macura, S. 1999.** Flavones and Sesquiterpene Lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial activity. *Journal of Natural Products*, 62(6): 909-911.
- Anderson, D.Y.T.W., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P. 1994.** The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1): 261-271.
- Andreotti, P. E., Cree, I. A., Kurbacher, C. M., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., Sartori, C. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.
- Anonim, 2008.** Ulusal Biyolojik Çeşitlilik Stratejisi ve Eylem Planı 2007. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara.
- Anonim, 2013.** GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (Erişim tarihi: 02.06.2014).
- Anonim, 2015.** History of The National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/about-nci/overview/history> (Erişim tarihi: 03.05.2015).
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Celik, S. E. 2008.** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4): 413-419.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7970-7981.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007.** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104(1): 21-29.

Arıcan, G.O., Çakır, O., Arıcan, E., Kara, T., Dağdeviren, O., Arı, S. 2014. Effects of Geven root extract on proliferation of HeLa cells and bcl-2 gene expressions. *African Journal of Biotechnology*, 11(18): 4296-4304.

Arslan, I., Celik, A., Chol, J. H. 2012. A cytotoxic triterpenoid saponin from underground parts of *Gypsophila pilulifera* Boiss. Heldr. *Fitoterapia*, 83(4): 699-703.

Arslan, I., Çelik, A. 2013. Saponin rich fractions (SRPs) from soapwort show antioxidant and hemolytic activity. *APCBEE Procedia*, 7: 103-108.

Arslan, I., Ili, P. 2015. Genotoxicological Assessment of Nebuloside-A a Triterpenoid Saponin Compound on Whole Blood DNA. *International Journal of Food Properties*, 18(11): 2374-2379.

Auyeung, K. K., Law, P. C., Ko, J. K. 2014. Combined therapeutic effects of vinblastine and astragalus saponins in human colon cancer cells and tumor xenograft via inhibition of tumor growth and proangiogenic factors. *Nutrition and Cancer*, 66(4): 662-674.

Avwioro, G. 2011. Histochemical uses of haematoxylin—a review. *JPCS*, 1: 24-34.

Bachran, D., Schneider, S., Bachran, C., Weng, A., Melzig, M. F., Fuchs, H. 2011. The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting *Gypsophila* saponins. *Molecular Pharmaceutics*, 8(6): 2262-2272.

Bandyopadhyay, S., Ganguly, S., Mandal, G., Sen, R., Saha, P., Ghosh, M. K., Chatterjee, M. 2009. Cytotoxicity of Senecio in macrophages is mediated via its induction of oxidative stress. *Research in Veterinary Science*, 87(1): 85-90.

Başer, K.H.C., Demirci, B., Demirci, F., Kocak, S., Akinci, C., Malyer, H., Guleryuz, G. 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta Medica*, 68(10): 941-943.

Behzad, S., Pirani, A. 2014. Cytotoxic activity of some medicinal plants from Hamedan district of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13: 199-205.

Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M. 2013. Secondary metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and their chemotaxonomic significance. *Rec. Nat. Prod.*, 7(2): 105-113.

Bessada, S. M., Barreira, J. C., Oliveira, M. B. P. 2015. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: a review. *Industrial Crops and Products*, 76: 604-615.

Boada, L.D., Zumbado, M., Del Río, I., Blanco, A., Torres, S., Monterde, J.G., Díaz-Chico, B.N. 2002. Steroid hormone progesterone induces cell proliferation and abnormal mitotic processes in rat liver. *Archives of Toxicology*, 75(11-12): 707-716.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltseve, Y. V., Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85(6): 803-815.

Boldin, M. P., Mett, I. L., Varfolomeev, E. E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J. H., Wallach, D. 1995. Self-association of the death domains of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *Journal of Biological Chemistry*, 270(1): 387-391.

Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., Fenech, M. 2013. The HUMN_{xl} scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytochrome assay—An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2): 100-113.

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. S., Holland, N., Bigatti, M. P. 2001. Human micronucleus project. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37(1): 31-45.

Boyd, M.R. 1997. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. *Anticancer Drug Development Guide*, Humana Press, New York, ABD, 23-42 pp.

Boyd, M.R., Paull, K.D. 1995. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, 34(2): 91-109.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.

Brenner, R. M., Slayden, O. D., Rodgers, W. H., Critchley, H. O., Carroll, R., Nie, X. J., Mah, K. 2003. Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Human Reproduction*, 18(6): 1185-1193.

Brown, M., Tsodikov, A., Bauer, K. R., Parise, C. A., Caggiano, V. 2008. The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative, invasive breast cancer: The California Cancer Registry, 1999–2004. *Cancer*, 112(4): 737-747.

Buhagiar, J. A., Bertoli, A., Camilleri-Podestac, M. T., Pistelli, L. 2008. In vitro Apoptotic Bioactivity of Flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris. *Natural Product Communications*, 3(12): 2007-2012.

Burgoyne, L. A. 1999. The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Experimental Cell Research*, 248(1): 214-222.

Campbell, J. B. 2002. Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review. *Breast Cancer Research and treatment*, 74(2): 187-192.

Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H. A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 87(2): 215-220.

Cao, Y., Ruan, Y., Shen, T., Huang, X., Li, M., Yu, W., Li, J. 2014. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways. *Oxidative Medicine and cellular longevity*, 2014.

Ćavar Zeljković, S., Ayaz, F. A., Inceer, H., Hayirlioglu-Ayaz, S., Colak, N. 2015. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of *Tripleurospermum insularum*, a new species from Turkey. *Natural Product Research*, 29(3): 293-296.

Cepeda, V., Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Pérez, J. M. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 7(1): 3-18.

Chaabane, F., Boubaker, J., Loussaif, A., Neffati, A., Kilani-Jaziri, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2012. Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1): 153.

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3): 323-333.

Chen, R. Z., Tan, L., Jin, C. G., Lu, J., Tian, L., Chang, Q. Q., Wang, K. 2015. Extraction, isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Industrial Crops and Products*, 77: 434-443.

Chen, Y., Qin, M. Y., Wang, L., Chao, H., Ji, L. N., Xu, A. L. 2013. A ruthenium (II) b-carboline complex induced p53-mediated apoptosis in cancer cells. *Biochimie*, 95: 2050-2059.

Cho, W. C., Leung, K. N. 2007. In vitro and in vivo anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Letters*, 252(1): 43-54.

Choudhary, M. I., Jan, S., Abbaskhan, A., Musharraf, S. G., Sattar, S. A. 2008. Cycloartane triterpenoids from *Astragalus bicuspidatus*. *Journal of natural Products*, 71(9): 1557-1560.

Circu, M. L., Aw, T. Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(6): 749-762.

Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3): 249-261.

Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G., Menichini, F. 2006. Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extract and fractions from *Senecio gibbosus* subsp. *gibbosus* (GUSS) DC. *Natural Product Research*, 20(9): 805-812.

Coruh, N., Celep, A. S., Özgökçe, F. 2007. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chemistry*, 100(3): 1237-1242.

Cox, P. A. 2000. Will tribal knowledge survive the millennium? *Science*, 287(5450): 44-45.

Cragg, G. M., Newman, D. J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1): 7-24.

Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., Fletcher, J. 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, 160(1): 81-88.

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Réthy, B., Zupkó, I., Máthé, I., Rédei, T., Hohmann, J. 2009b. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research*, 23(8): 1109-1115.

Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J. 2009a. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. *Phytotherapy Research*, 23(5): 672-676.

Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., Salvemini, D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Reviews*, 53(1): 135-159.

Çelikler Kasımoğulları, S., Oran, S., Ari, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarimahmut, M., Öztürk, Ş. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 38(6): 940-947.

Davis, P.H. 1965. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 1: 567 pp.

Davis, P.H. 1967. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 2: 156 p.

Davis, P.H. 1970. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 3: 220-221 pp.

Davis, P.H. 1972. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 4: 657 pp.

Davis, P.H. 1975. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 5: 890 pp.

Davis, P.H. 1982. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, 7: 524-525 pp.

de Bruin, E. C., Medema, J. P. 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews*, 34(8): 737-749.

DeBono, A. J., Mistry, S. J., Xie, J., Muthiah, D., Phillips, J., Ventura, S., Scammells, P. J. 2014. The synthesis and biological evaluation of multifunctionalised derivatives of noscapine as cytotoxic agents. *ChemMedChem*, 9(2): 399-410.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Reed, J. C. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *The EMBO Journal*, 17(8): 2215-2223.

Dhawan, A., Kayani, M. A., Parry, J. M., Parry, E., Anderson, D. 2003. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 18(6): 487-490.

Dincel, D., Hatipoglu, S. D., Goren, A.C., Topcu, G. 2013. Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. *Turkish Journal of Chemistry*, 37(4): 675-683.

Dombernowsky, P., Brincker, H., Hansen, M., Mouridsen, H. T., Overgaard, M., Panduro, J., Andersen, K. W. 1988. Adjuvant therapy of premenopausal and menopausal high-risk breast cancer patients: present status of the Danish Breast Cancer Cooperative Group Trials 77-B and 82-B. *Acta Oncologica*, 27(6): 691-697.

Duthie, S. J., Dobson, V. L. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *European Journal of Nutrition*, 38(1): 28-34.

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U., Kimchi, A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differentiation*, 16(7): 966-975.

Eom, Y. W., Kim, M. A., Park, S. S., Goo, M. J., Kwon, H. J., Sohn, S., Choi, K. S. 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, 24(30): 4765-4777.

Erhan, E.H., Hamzaoglu, E., Aksoy, A., Budak, Ü., Albayrak, S. 2009. Genotoxic Potential of *Senecio trapezuntinus* in Cultured Human Lymphocytes. *Caryologia*, 62(4): 303-308.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1): 37-59.

Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1): 81-95.

Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5): 1084-1104.

Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1): 65-75.

Fenech, M., Morley, A. A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2): 29-36.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5): E359-E386.

Firuzi, O., Asadollahi, M., Gholami, M., Javidnia, K. 2010. Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, 122(1): 117-122.

Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., Rubinsztein, D. C. 2011. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 7(1): 9-17.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Gottlieb, E. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differentiation*, 19(1): 107-120.

Gao, Y., Liu, Y., Wang, Z. G., Zhang, H. L. 2014. Chemical constituents of *Heracleum dissectum* and their cytotoxic activity. *PhytoChemistry Letters*, 10: 276-280.

Gateva, S., Jovtchev, G., Stankov, A., Gregan, F. 2014. Antigenotoxic capacity of papaver rhoeas L. extract. *Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, 6(1): 717-723.

Ghantous, A., Tayyoun, A.A., Lteif, G.A., Saliba, N.A., Gali-Muhtasib, H., El-Sabban, M., Darwiche, N. 2008. Purified Salograviolide A isolated from *Centaurea ainetensis* causes growth inhibition and apoptosis in neoplastic epidermal cells. *International Journal of Oncology*, 32(4): 841-849.

Gharibi, S., Tabatabaei, B.E.S., Saeidi, G. 2015. Comparison of Essential Oil Composition, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Eight *Achillea* Species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6): 1382-1394.

Ghavami, G., Sardari, S., Shokrgozar, M.A. 2010. Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines. *J. Med. Plants Res*, 4(22): 2411-2417.

Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.

Goldenberg, M.M. 1999. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clinical Therapeutics*, 21(2): 309-318.

Gotti, R. 2011. Capillary electrophoresis of phytochemical substances in herbal drugs and medicinal plants. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55(4): 775-801.

Gozuacik, D., Kimchi, A. 2007. Autophagy and cell death. *Current topics in developmental Biology*, 78: 217-245.

Guo, L., Bai, S.P., Zhao, L., Wang, X.H. 2012. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer: effects on quality of life and survival. *Medical Oncology*, 29(3): 1656-1662.

Gupta, D., Bleakley, B., Gupta, R.K. 2011. Phytochemical analysis and antioxidant activity of herbal plant *Doronicum hookeri* Hook f.(Asteraceae). *J Med Plants Res*, 5: 2736-2742.

Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1): 1-93.

Gülcemal, D., Alankuş-Çalışkan, Ö., Perrone, A., Özgökçe, F., Piacente, S., Bedir, E. 2011. Cycloartane glycosides from *Astragalus aureus*. *PhytoChemistry*, 72(8): 761-768.

Güleryüz, G., Arslan, H. 1998. *Astragalus sibthorpianus* Boiss., *The Karaca Arboretum Magazine* 4(3).

Güleryüz G., Malyer H., Kaynak G., Özhatay N. 2005. Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı: Uludağ A2 (A) Bursa, Editörler: Özhatay, N., Byfield, A., Atay, S., WWF Türkiye, İstanbul, 81-83 s.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1): 45-51.

Haselsberger, K., Peterson, D.C., Thomas, D.G.T., Darling, J.L. 1996. Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anti-Cancer drugs*, 7(3): 331-338.

Hasplova, K., Hudecova, A., Miadokova, E., Magdolenova, Z., Galova, E., Vaculikova, L., Dusinska, M. 2010. Biological activity of plant extract isolated from *Papaver rhoeas* on human lymphoblastoid cell line. *Neoplasma*, 58(5): 386-391.

Hayashi, M., Sofuni, T., Ishidate, M. 1983. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research Letters*, 120(4): 241-247.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., Wang, X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*, 137(6): 1100-1111.

Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805): 770-776.

Hernández, I., Chacón, O., Rodriguez, R., Portieles, R., López, Y., Pujol, M., Borrás-Hidalgo, O. 2009. Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase. *BioChemical and biophysical Research communications*, 387(2): 300-304.

Hong, J.Y., Nam, J. W., Seo, E.K., Lee, S.K. 2010. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(2): 234-237.

Horobin, R.W., Kiernan, J.A. 2002. Conn's Biological Stains 10th ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, 417 pp.

Hortobagyi, G.N. 1998. Treatment of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 339(14): 974-984.

Hu, Q.F., Mu, H.X., Huang, H.T., Lu, H.Y., Li, S.L., Tu, P.F., Li, G.P. 2011. Secolignans, neolignans and phenylpropanoids from *Daphne feddei* and their biological activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(11): 1421-1424.

Hu, Y.W., Liu, C.Y., Du, C.M., Zhang, J., Wu, W.Q., Gu, Z.L. 2009. Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by flavonoids from *Astragalus complanatus*. *Journal of ethnopharmacology*, 123(2): 293-301.

Huang, L.H., Yan, Q.J., Kopparapu, N.K., Jiang, Z.Q., Sun, Y. 2012. *Astragalus membranaceus* lectin (AML) induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia cells. *Cell proliferation*, 45(1): 15-21.

Huang, S.Z., Zhang, X.J., Li, X.Y., Kong, L.M., Jiang, H.Z., Ma, Q.Y., Zhou, J. 2012. Daphnane-type diterpene esters with cytotoxic and anti-HIV-1 activities from *Daphne acutiloba* Rehd. *PhytoChemistry*, 75: 99-107.

Huang, X., Liu, Y., Song, F., Liu, Z., Liu, S. 2009. Studies on principal components and antioxidant activity of different *Radix Astragali* samples using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry. *Talanta*, 78(3): 1090-1101.

Huang, X.Y., Zhang, S.Z., Wang, W.X. 2013. Enhanced antitumor efficacy with combined administration of astragalus and pterostilbene for melanoma. *Asian Pacific Journal of Cancer prevention: APJCP*, 15(3): 1163-1169.

Ibrahim, L.F., Marzouk, M.M., Hussein, S.R., Kawashty, S.A., Mahmoud, K., Saleh, N.A. 2013. Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss. *Natural Product Research*, 27(4-5): 386-393.

Jacobson, J. A., Danforth, D.N., Cowan, K.H., d'Angelo, T., Steinberg, S.M., Pierce, L., Okunieff, P. 1995. Ten-year results of a comparison of conservation with mastectomy in the treatment of stage I and II breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 332(14): 907-911.

Karadeniz, A., Çinbilgel, I., Gün, S.Ş., Çetin, A. 2015. Antioxidant activity of some Turkish medicinal plants. *Natural Product Research*, 29(24): 2308-2312.

Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S., Khan, I.A. 2007. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. *Phytotherapy Research*, 21(5): 488-491.

Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4): 550-557.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4): 239.

Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Hadjiakhoondi, A., Taghizadeh, M., Yazdani, D., Khalighi-Sigaroodi, S., Bidel, S. 2011. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1): 295-302.

Klionsky, D.J., Emr, S.D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497):1717-1721.

Klionsky, D.J., Lane, J.D. 2010. Alternative macroautophagy. *Autophagy*, 6(2): 201-201.

Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., Kondo, S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Reviews Cancer*, 5(9): 726-734.

Kostic, D.A., Mitic, S.S., Mitic, M.N., Zarubica, A.R., Velickovic, J.M., Dordevic, A.S., Randelovic, S.S. 2010. Phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activity of *Papaver rhoeas* L. extracts from Southeast Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(17): 1727-1732.

Krasteva, I., Platikanov, S., Momekov, G., Konstantinov, S., Nikolov, S. 2008. Phytochemical analysis and in vitro cytotoxic activity of volatiles from *Astragalus corniculatus*. *Natural Product Research*, 22(11): 969-974.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3): 217-233.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1): 99-163.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E. H., Hengartner, M. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differentiation*, 16(1): 3-11.

Kusuzaki, K., Takeshita, H., Murata, H., Hashiguchi, S., Nozaki, T., Emoto, K., Hirasawa, Y. 2001. Acridine orange induces binucleation in chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9(2): 147-151.

Lacaille-Dubois, M.A., Pegnyemb, D.E., Noté, O. P., Mitaine-Offer, A.C. 2011. A review of acacic acid-type saponins from Leguminosae-Mimosoideae as potent cytotoxic and apoptosis inducing agents. *PhytoChemistry Reviews*, 10(4): 565-584.

Lacroix, M., Leclercq, G. 2004. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and treatment*, 83(3): 249-289.

Lacroix, M., Toillon, R. A., Leclercq, G. 2006. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related Cancer*, 13(2): 293-325.

Li, L.K., Kuang, W.J., Huang, Y.F., Xie, H.H., Chen, G., Zhou, Q.C., Wan, L.H. 2012. Anti-tumor effects of Astragalus on hepatocellular carcinoma in vivo. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1): 78.

Li, X., Qu, L., Dong, Y., Han, L., Liu, E., Fang, S., Wang, T. 2014. A review of recent research progress on the astragalus genus. *Molecules*, 19(11): 18850-18880.

Lim, H.K., Bae, W., Lee, H.S., Jung, J. 2014. Anticancer activity of marine sponge Hyrtios sp. extract in human colorectal carcinoma RKO cells with different p53 status. *BioMed Research International*, 2014.

Lin, L.T., Liu, L.T., Chiang, L.C., Lin, C.C. 2002. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research*, 16(5): 440-444.

Linnek, J., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Avunduk, S., Lacaille-Dubois, M.A. 2011. Cycloartane glycosides from three species of Astragalus (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 94(2): 230-237.

Liu, L.Y., Huang, W.J., Lin, R.J., Lin, S.Y., Liang, Y.C. (2013). N-Hydroxycinnamide derivatives of osthole presenting genotoxicity and cytotoxicity against human colon adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 26(11): 1683-1691.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Statti, G. A., Menichini, F., Houghton, P. J. 2005. In-vitro antiproliferative effects on human tumour cell lines of extracts and jacaranone from Senecio leucanthemifolius Poir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(7): 897-901.

Lone, S.H., Bhat, K.A., Bhat, H.M., Majeed, R., Anand, R., Hamid, A., Khuroo, M.A. 2014. Essential oil composition of Senecio graciliflorus DC: Comparative analysis of different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Phytomedicine*, 21(6): 919-925.

Lu, Y., Li, X., Mu, H., Huang, H., Li, G.P., Hu, Q. 2012. Bioactive phenylpropanoids from Daphne feddei. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4): 656-660.

Mao, L.C., Pan, X., Que, F., Fang, X.H. 2006. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222(3-4): 236-241.

Mates, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8): 595-603.

Maughan, K.L., Lutterbie, M.A., Ham, P.S. 2010. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81(11): 1339-1346.

McCulloch, M., See, C., Shu, X.J., Broffman, M., Kramer, A., Fan, W.Y., Colford, J.M. 2006. Astragalus-based Chinese herbs and platinum-based chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: meta-analysis of randomized trials. *Journal of Clinical Oncology*, 24(3): 419-430.

McPherson, K., Steel, C., Dixon, J. M. 2000. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*, 321(7261): 624-628.

Mehlen, P., Bredesen, D.E. 2011. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science signaling*, 4(157): mr2-mr2.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Ohsumi, Y. 1998. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395(6700): 395-398.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2): 211-219.

Morrow, P. K. H., Zambrana, F., Esteva, F. J. 2009. Advances in systemic therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11(4): 207-216.

Naghibi, F., Khalaj, A., Mosaddegh, M., Malekmohamadi, M., Hamzeloo-Moghadam, M. 2014. Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cancer and related disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1): 230-239.

Nam, N.H., Lee, C.W., Hong, D.H., Kim, H.M., Bae, K.H., Ahn, B.Z. 2003. Antiinvasive, antiangiogenic and antitumour activity of Ephedra sinica extract. *Phytotherapy Research*, 17(1): 70-76.

Nehir El, S., Karakaya, S. 2004. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(1): 67-74.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Speed, T. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6): 515-527.

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural Products*, 75(3): 311-335.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12): 3448-3459.

Niles, A.L., Moravec, R.A., Riss, T.L. 2008. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert opinion on drug discovery*, 3(6): 655-669.

Noudeh, G.D., Sharififar, F., Noodeh, A.D., Moshafi, M.H., Afzadi, M.A., Behravan, E., Sakhtianchi, R. 2010. Antitumor and antibacterial activity of four fractions from *Heracleum persicum* Desf. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *J Med Plants Res*, 4: 2176-2180.

Oberhammer, F.A., Hochegger, K., Fröschl, G., Tiefenbacher, R., Pavelka, M. 1994. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+ B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *The Journal of Cell Biology*, 126(4): 827-837.

Olive, P.L., Banáth, J.P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols Electronic Edition*, 1(1): 23.

Ostling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1): 291-298.

Park, K.J., Yang, S., Eun, Y.A., Kim, S.Y., Lee, H.H., Kang, H. 2002. Cytotoxic effects of Korean medicinal herbs determined with hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology*, 40(3): 189-195.

Park, Y.C., Kim, M.H., Kim, J.W., Kim, J.B., Lee, J.G., Yu, C.Y., Lim, J.D. 2014. Genotoxicity Study of Polysaccharide Fraction from *Astragalus membranaceus*'s Aerial Parts. *Toxicological Research*, 30(2): 131.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Levine, B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6): 927-939.

Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2): 97-110.

Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M., Hamilton, T. C. 1993. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 29(3): 395-399.

Podlech, D. 2008. The genus *Astragalus* L.(Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union. *Feddes Repertorium*, 119(5-6): 310-387.

Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B.Y., Cui, X. 2015. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PloS one*, 10(7): e0131285.

Radaković, M., Đelić, N., Stanimirović, Z., Plećaš-Solarović, B., Spremo-Potparević, B., Živković, L., Bajić, V. 2011. Evaluation of the effects of ephedrine on human lymphocytes in the comet assay. *Acta veterinaria*, 61(4): 363-371.

Radogna, F., Dicato, M., Diederich, M. 2015. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *BioChemical Pharmacology*, 94(1): 1-11.

Ramawat, K.G., Dass, S., Mathur, M. 2010. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants: Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine, Ed: Ramawat K.G., Springer-Verlag, Heidelberg, pp: 7-32.

Réthy, B., Csupor-Löffler, B., Zupkó, I., Hajdú, Z., Máthé, I., Hohmann, J., Falkay, G. 2007. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phytotherapy Research*, 21(12): 1200-1208.

Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer Jr, C.E., Davidson, N.E., Swain, S.M. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(16): 1673-1684.

Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Skehan, P., Boyd, M.R. 1990. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13): 1113-1117.

Rustaiyan, A., Javidnia, K., Farjam, M.H., Aboee-Mehrizi, F., Ezzatzadeh, E. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of the Ephedra sarcocarpa growing in Iran. *J. Med. Plants Res*, 5: 4251-4255.

Salla, M., Fakhoury, I., Saliba, N., Darwiche, N., Gali-Muhtasib, H. 2013. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanapartholide. *Journal of natural medicines*, 67(3): 468-479.

Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., Huuskonen, J. 2008. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19): 2979-2999.

Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., Sánchez-Sellero, I., Méndez-Álvarez, E. 2011. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 63(2): 209-215.

Sant'Anna, J.R.D., Franco, C.C.D.S., Miyamoto, C.T., Cunico, M.M., Miguel, O.G., Côcco, L.C., Castro-Prado, M.A.A.D. 2009. Genotoxicity of Achillea millefolium essential oil in diploid cells of Aspergillus nidulans. *Phytotherapy Research*, 23(2): 231-235.

Santos-Mello, R., Deimling, L.I., Júnior, C.L., Almeida, A. 2002. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from Senecio brasiliensis and stored for 23 years. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516(1): 23-28.

Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., Uylaşer, V. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. *Journal of food Science*, 75(4): C328-C335.

Sathiyamoorthy, P., Lugasi-Evgi, H., Schlesinger, P., Kedar, I., Gopas, J., Pollack, Y., Golan-Goldhirsh, A. 1999. Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products. *Pharmaceutical Biology*, 37(3):188-195.

Savage, J.R. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and Molecular mutagenesis*, 22(4): 198-207.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of BioChemistry*, 254(3): 439-459.

Schütze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. 2008. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8): 655-662.

Scott, E., Steward, W.P., Gescher, A.J., Brown, K. 2012. Resveratrol in human cancer chemoprevention—choosing the ‘right’ dose. *Molecular nutrition food Research*, 56(1): 7-13.

Selen Isbilir, S., Sagiroglu, A. 2012. An assessment of in vitro antioxidant activities of different extracts from Papaver rhoeas L. leaves. *International Journal of Food Properties*, 15(6): 1300-1308.

Sharma, O.P., Bhat, T.K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4): 1202-1205.

Shintani, T., Klionsky, D.J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698): 990-995.

Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S.M., Celik, S., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S.D. 2007. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of Centaurea gigantea (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines*, 61(2): 164-169.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(1): 5-29.

Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Krasteva, I., Manov, V., Mitcheva, M. 2014. Protective effects of the apigenin-O/C-diglucoside saponarin from *Gypsophila trichotoma* on carbone tetrachloride-induced hepatotoxicity in vitro/in vivo in rats. *Phytomedicine*, 21(2): 148-154.

Simeonova, R., Vitcheva, V., Kondeva-Burdina, M., Krasteva, I., Manov, V., Mitcheva, M. 2013. Hepatoprotective and antioxidant effects of saponarin, isolated from *Gypsophila trichotoma* wend. on paracetamol-induced liver damage in rats. *BioMed Research International*, 2013.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Boyd, M.R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13): 1107-1112.

Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., Li, H.B. 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6): 2362-2372.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Thorsen, T. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19): 10869-10874.

Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Brenz, R., McGrath, C.M., Brooks, S.C. 1990. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*, 50(18): 6075-6086.

Souri, E., Sarkhail, P., Kaymanesh, P., Amini, M., Farsam, H. 2005. Antioxidant Activity of Extract and a New Isolated Dioxaspiran Derivative of *Tripleurospermum disciforme*. *Pharmaceutical Biology*, 43(7): 620-623.

Sousa, S.M., Viccini, L. F. 2011. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* L., Asteraceae, aqueous extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1): 98-104.

Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Ünlü, M., Akpulat, H.A. 2004. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan.(Asteraceae). *Phytotherapy Research*, 18(6): 451-456.

Sparg, S., Light, M.E., Van Staden, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2): 219-243.

Su, J., Wu, Z.J., Zhang, W.D., Zhang, C., Li, H.L., Liu, R.H., Shen, Y.H. 2008. Two new bis-coumarin glycosides from *Daphne giraldii* NITSCHKE. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(4): 589-591.

Süntar, I., Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S., Baykal, T. 2014. *Daphne oleoides* Schreber ssp. *oleoides* Exhibits Potent Wound Healing Effect: Isolation of the Active Components and Elucidation of the Activity Mechanism. *Records of Natural Products*, 8(2): 93-109.

Süntar, I., Akkol, E.K., Keles, H., Yesilada, E., Sarker, S.D., Arroo, R., Baykal, T. 2012. Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *Journal of ethnopharmacology*, 141(3): 1058-1070.

Szabo, N.J. 2014. Dietary safety of cycloastragenol from *Astragalus* spp.: Subchronic toxicity and genotoxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 64: 322-334.

Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113(4): 1226-1233.

Tadaki, S., Yamada, S., Miyazawa, N., Nozaka, T., Tanaka, A. 1995. Clastogenicity of *Eucommiae cortex* and *Astragali radix*. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, 41(6): 463-469.

Talib, W.H., Mahasneh, A.M. 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica*, 78(1): 33.

Taninaka, H., Takaishi, Y., Honda, G., Imakura, Y., Sezik, E., Yesilada, E. 1999. Terpenoids and aromatic compounds from *Daphne oleoides* ssp. *oleoides*. *PhytoChemistry*, 52(8): 1525-1529.

Tassone, P., Tagliaferri, P., Perricelli, A., Blotta, S., Quaresima, B., Martelli, M.L., Venuta, S. 2003. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 88(8): 1285-1291.

Teyeb, H., Zanina, N., Neffati, M., Douki, W., Najjar, M. F. 2012. Cytotoxic and antibacterial activities of leaf extracts of *Astragalus gombiformis* Pomel (Fabaceae) growing wild in Tunisia. *Turkish Journal of Biology*, 36(1): 53-58.

Thompson, E.W., Paik, S., Brünner, N., Sommers, C. L., Zugmaier, G., Clarke, R., Martin, G.R. 1992. Association of increased basement membrane invasiveness with

absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal of cellular physiology*, 150(3): 534-544.

Thoppil, R.J., Harlev, E., Mandal, A., Nevo, E., Bishayee, A. 2013. Antitumor activities of extracts from selected desert plants against HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Pharmaceutical Biology*, 51(5): 668-674.

Tian, Q.E., De Li, H., Yan, M., Cai, H.L., Tan, Q.Y., Zhang, W.Y. 2012. Effects of Astragalus polysaccharides on P-glycoprotein efflux pump function and protein expression in H22 hepatoma cells in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1): 94.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular mutagenesis*, 35(3): 206-221.

Tin, M.M., Cho, C.H., Chan, K., James, A.E., Ko, J.K. 2007. Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft. *Carcinogenesis*, 28(6): 1347-1355.

Tofighi, Z., Molazem, M., Doostdar, B., Taban, P., Shahverdi, A.R., Samadi, N., Yassa, N. 2015. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavonoids of tripleurospermum disciforme. *Iranian Journal of pharmaceutical Research: IJPR*, 14(1): 225.

Toğar, B., Türkez, H., Geyikoğlu, F., Hacimüftüoğlu, A., Tatar, A. 2014. Antiproliferative, genotoxic and oxidant activities of cyclosativene in rat neuron and neuroblastoma cell lines. *Archives of Biological Sciences*, 66(3): 1171-1177.

Tohme, R., Al Aaraj, L., Ghaddar, T., Gali-Muhtasib, H., Saliba, N.A., Darwiche, N. 2013. Differential growth inhibitory effects of highly oxygenated guaianolides isolated from the Middle Eastern indigenous plant *Achillea falcata* in HCT-116 colorectal cancer cells. *Molecules*, 18(7): 8275-8288.

Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Menichini, F., Dodaro, D., Passalacqua, N.G., Menichini, F. 2009. In vitro cytotoxic effects of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) on human cancer cell lines. *Natural Product Research*, 23(18): 1707-1718.

Ullah, N., Ahmed, S., Mohammad, P., Rabnawaz, H., Malik, A. 1999. Chemical constituents of *Daphne oleoides*. *Fitoterapia*, 70(2): 214-215.

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A.Y., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in vitro*, 22(1): 232-239.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differentiation*, 15(7): 1153-1162.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Berghe, T.V., Kroemer, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10): 700-714.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Vandenabeele, P. 1998a. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *The Journal of experimental Medicine*, 187(9): 1477-1485.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. 1998b. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *The Journal of experimental Medicine*, 188(5): 919-930.

Vichai, V., Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, 1(3): 1112-1116.

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., Kroemer, G. 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(6): 385-392.

Vitcheva, V., Simeonova, R., Krasteva, I., Yotova, M., Nikolov, S., Mitcheva, M. 2011. Hepatoprotective effects of saponarin, isolated from *Gypsophila trichotoma* Wend. on cocaine-induced oxidative stress in rats. *Redox Report*, 16(2): 56-61.

Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Shak, S. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3): 719-726.

Voutquenne-Nazabadioko, L., Gevrenova, R., Borie, N., Harakat, D., Sayagh, C., Weng, A., Henry, M. 2013. Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender. *PhytoChemistry*, 90: 114-127.

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296(5573): 1635-1636.

Wang, C.W., Klionsky, D.J. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Molecular Medicine* 9(3/4): 65-76.

Wang, T., Xuan, X., Li, M., Gao, P., Zheng, Y., Zang, W., Zhao, G. 2013. Astragalus saponins affect proliferation, invasion and apoptosis of gastric cancer BGC-823 cells. *Diagn Pathol*, 8(1): 179.

Watson, J. 2013. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology*, 3(1): 120144.

Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in Plant Biology*, 5(3): 218-223.

Wirawan, E., Berghe, T.V., Lippens, S., Agostinis, P., Vandenabeele, P. 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research*, 22(1): 43-61.

Yalçın, F.N., Piacente, S., Perrone, A., Capasso, A., Duman, H., Çalış, İ. 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm. *PhytoChemistry*, 73: 119-126.

Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z., Sun, Y., Zhu, L., Ding, Z. 2009. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. *Phytomedicine*, 16(6): 586-593.

Yan, H., Xie, Y.P., Sun, S.G., Sun, X.D., Ren, F.X., Shi, Q.R., Wang, S.H., Zhang, W.D., Li, X.M., Zhang, J. 2010. Chemical analysis of *Astragalus mongholicus* polysaccharides and antioxidant activity of the polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 82(3): 636-640.

Yang, B., Xiao, B., Sun, T. 2013. Antitumor and immunomodulatory activity of *Astragalus membranaceus* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62: 287-290.

Yang, L.P., Shen, J.G., Xu, W.C., Li, J., Jiang, J.Q. 2013. Secondary Metabolites of the Genus *Astragalus*: Structure and Biological-Activity Update. *Chemistry & Biodiversity*, 10(6): 1004-1054.

Yeşilada, E., Taninaka, H., Takaishi, Y., Honda, G., Sezik, E., Momota, H., Taki, T. 2001. In vitro inhibitory effects of *Daphne oleoides* ssp. *oleoides* on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. *Cytokine*, 13(6): 359-364.

Yotova, M., Krasteva, I., Jenett-Siems, K., Zdraveva, P., Nikolov, S. 2012. Triterpenoids in *Gypsophila trichotoma* Wend. *PhytoChemistry Letters*, 5(4): 752-755.

Yu, D., Bao, Y., Wei, C., An, L. 2005a. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from *Astragalus mongholicus* Bunge. *Biomedical and Environmental Sciences*, 18(5): 297.

Yu, D., Duan, Y., Bao, Y., Wei, C., An, L. 2005b. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1): 89-94.

Zengin, G., Aktumsek, A., Guler, G.O., Cakmak, Y.S., Kan, Y. 2012. Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey. *Natural Product Research*, 26(1): 1-10.

Zhan, Z.J., Fan, C.Q., Ding, J., Yue, J.M. 2005. Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(3): 645-655.

Zhang, D., Zhuang, Y., Pan, J., Wang, H., Li, H., Yu, Y., Wang, D. 2012. Investigation of effects and mechanisms of total flavonoids of *Astragalus* and calycosin on human erythroleukemia cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.

Zhang, W., Zhang, W.D., Liu, R.H., Shen, Y.H., Zhang, C., Cheng, H.S., Shan, L. 2006. Two new chemical constituents from *Daphne odora* Thunb. var. *marginata*. *Natural Product Research*, 20(14): 1290-1294.

Zhou, T., Aumais, J.P., Liu, X., Yu-Lee, L.Y., Erikson, R.L. 2003. A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Developmental Cell*, 5(1): 127-138.

Zidorn, C. 2008. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. *PhytoChemistry*, 69(12): 2270-2296.

EKLER

EK 1

Sarf Malzemeler

- 0,2 µm filtre, CA, Orange Scientific, 1920012
- 0,2 µm filtre, PES, TPP, 99722
- 15 ml falkon tüp, Axygen, SCT-15ML
- 200 µl sarı pipet ucu, Expell, 4130075
- 25 cm² hücre kültür kabı, Thermo Scientific, 130189
- 5 ml enjektör Set inject, 5S2052232
- 50 ml falkon tüp, Sarstedt, 62.547.254
- 6-kuyucuklu mikrolaka, Corning, 3516
- 75 cm² hücre kültür kabı, Thermo Scientific, 130190
- 96-kuyucuklu mikrolaka, düz tabanlı, Orange Scientific, 5530100
- 96-kuyucuklu beyaz mikrolaka düz tabanlı, Thermo Microfluor, 27905
- Amonyum asetat, 1 kg, Santa Cruz, sc-203818
- Asetik asit, 1 l, Scharlau, AC0342
- Askorbik asit, 100 g, A7506
- ATP bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma, FLASC-1KT
- Bakır(II) klorür dihidrat 100 g, Santa Cruz, sc-211132
- Bijou, 7 ml, Grenier, 189171
- Cryovial, Nunc, 377267
- DMSO, 1 l, Merck, 8029121000
- DMSO, 5x10 ml ampul, Sigma, D2650
- DPPH, 50 mg, Santa Cruz, sc-202591
- Düşük erime noktalı agar, 5 g, Sigma, A9414
- Eppendorf tüpü, 1,5 ml, Axygen, 301-22-051
- Etanol absolu, 2,5 l, Merck, 100983
- Etidyum bromür çözeltisi, 500 ug/ml, Sigma, E1385
- FBS, 500 ml, Lonza, DE14-802F
- Gallik asit, 250 g, Sigma, G7384
- Giemsa, 500 ml, Merck, 9204
- H₂O, saf, 1 l, Lonza, BE51200
- Heat Inactivated FBS, Gibco, 10500
- Hematoksilen, 2,5 l, BDH, 351946T
- Hoechst 33342, Thermo, 62249
- Kloroform, 2,5 l, Merck, 107024
- L-Glutamine (100X), 100 ml, Gibco, 25030
- Metanol, 2,5 l, Fluka, 34860
- Na₂EDTA, 1 kg, Merck 1.084.181.000
- NaCl, 1 kg, Merck, 1.064.041.000
- Neokuprin, 1 g, Sigma, N1501
- n-hekzan, 2,5 l, Merck, 104373
- Normal erime noktalı agar, 100 g, Sigma, A9539
- Pastör pipeti, Heinz Herenz, 1100802
- PBS (10X), w/o Ca & Mg, 500 ml, Gibco, 14200-067

- Penisilin/Streptomisin (100X), 100 ml, Gibco, 15140-122
- Propidyum iyodür, Sigma, P-4170
- RPMI 1640 w/o phenol red, w/o L-Glutamine, 500 ml, Lonza, BE12-918F
- Serolojik pipet, 10 ml, Orange Scientific, PN10E1
- Serolojik pipet, 25 ml, Corning, 4489
- Sulforhodamine B, 5 g, Santa Cruz, sc253615A
- Trikloroasetik asit, 1 kg, Merck, 100810
- Tripan mavi, % 0,5, 100 ml, Biological Industries, 03-102-1B
- Tris baz, 500 g, Scharlau, TR0423
- Triton-X100, 1 l, Merck, 1.086.031.000
- Troloks, 500 mg, Santa Cruz, sc-200810
- Tripsin – EDTA % 0,05 (1X), 100 ml, Hyclone, SH30236.01

EK 2

Cihazlar

- 0,5-5 ml pipet, Brand, Almanya
- 10 ml pipet, Eppendorf, Hamburg, Almanya
- 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Orange Scientific, Belçika
- 1-100 ml otomatik şarjlı pipetör, ISOfill
- -20 °C derin dondurucu, Arçelik, Türkiye
- 20-200µl çok kanallı Transferpipet, Brand, Almanya
- 5-50 µl çok kanallı Transferpipet, Thermo Scientific, ABD
- -80 °C derin dondurucu, Thermo, A.B.D.
- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- CO₂ inkübatörü, Sanyo, Japonya
- Floresans ataçmanlı faz kontrast mikroskop, Novel N-800M, Çin
- Floresans ataçmanlı invert faz kontrast mikroskop, Olympus CKX41, Japonya
- Hassas terazi, Shimadzu, AUW220D, Japonya
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-Mag M420, Türkiye
- Liyofilizatör, Christ Alpha 2-4 LD Plus, Osterode am Harz, Almanya
- Luminometre, FL×800 Mikroplaka Floresans Okuyucu
- Mikroplaka inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph, Almanya
- Multipipet cihazı, Eppendorf Multipette, Hamburg, Almanya
- Rotary vakum evaporatör, Bibby Scientific RE 100B, Staffordshire, Birleşik Krallık
- Santrifüj, Hettich Rotina 35R, Almanya
- Spektrofotometre, FLASHScan S12, Analytik Jena, Almanya
- Soxhlet cihazı, Behr Labor Technik, Düsseldorf, Almanya)
- Steril sınıf II kabin, ESCO, Singapur

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Sarimahmut
Doğum Yeri ve Tarihi : Nev York, A.B.D.
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Gazi Anadolu Lisesi
Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek Lisans : Illinois Institute of Technology Biyomühendislik Bölümü

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Nanoprobe, Inc., 2009
Sanofi, 2010
Uludağ Üniversitesi, 2010-2016

İletişim (e-posta) : mehmet_sarimahmut@yahoo.com

Yayınları:

Ari, F., Sarimahmut, M., Ulukaya, E. 2012. Peripherally Located A431 Cells are More Sensitive to Cell Death Induced by Exogenous Oxidative Stress. *Current Signal Transduction Therapy*, 7(3): 202-208.

Ari, F., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Yilmaz, V.T. 2013. Palladium (II) saccharinate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(11): 3016-3021.

Cevatemre, B., Ari, F., Sarimahmut, M., Oral, A.Y., Dere, E., Kacar, O., Ulukaya, E. 2013. Combination of fenretinide and indole-3-carbinol results in synergistic cytotoxic activity inducing apoptosis against human breast cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 24(6): 577-586.

Cevatemre, B., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Oral, A.Y., Frame, F.M. 2015. The M30 assay does not detect apoptosis in epithelial-derived cancer cells expressing low levels of cytokeratin 18. *Tumor Biology*, 36(9): 6857-6865.

Coskun, M.D., Ari, F., Oral, A.Y., Sarimahmut, M., Kutlu, H.M., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2013. Promising anti-growth effects of palladium (II) saccharinate complex of terpyridine by inducing apoptosis on transformed fibroblasts in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(15): 4698-4705.

Icel, C., Yilmaz, V.T., Kaya, Y., Durmus, S., Sarimahmut, M., Buyukgungor, O., Ulukaya, E. 2015. Cationic Pd (II)/Pt (II) 5, 5-diethylbarbiturate complexes with bis (2-pyridylmethyl) amine and terpyridine: Synthesis, structures, DNA/BSA interactions, intracellular distribution, cytotoxic activity and induction of apoptosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152: 38-52.

Kasimogullari, S.Ç., Oran, S., Ari, F., Ulukaya, E., Aztopal, N., Sarimahmut, M., Öztürk, Ş. 2014. Genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects of crude extract of *Usnea filipendula* Stirt. in vitro. *Turkish Journal of Biology*, 38(6): 940-947.

Oral, A.Y., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Icsel, C., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2015. Anti-growth effect of a novel trans-dichloridobis [2-(2-hydroxyethyl) pyridine] platinum (II) complex via induction of apoptosis on breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15): 4303-4310.

Sarimahmut, M., Balikci, N., Celikler, S., Ari, F., Ulukaya, E., Guleryuz, G., Ozel, M. Z. 2016. Evaluation of genotoxic and apoptotic potential of *Hypericum adenotrichum* Spach. in vitro. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 74: 137-146.

Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney, E., Sakellaridis, N., Yilmaz, V.T. 2011. Cell death-inducing effect of novel palladium (II) and platinum (II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(10): 1425-1434.

Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Cevatemre, B., Ari, F., Yerlikaya, A., Dimas, K. 2014. Additive enhancement of apoptosis by TRAIL and fenretinide in metastatic breast cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(4): 477-482.