

TEMMUZ 2019

Yüksek Lisans Tezi-Biyoloji

NURCAN ARSLAN

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİVİT OTU (*Isatis tinctoria* L.) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN
DOĞAL BOYANIN SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NURCAN ARSLAN

TEMMUZ 2019

**ÇİVİT OTU (*Isatis tinctoria* L.) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN DOĞAL
BOYANIN SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Nurcan ARSLAN

Temmuz 2019

© 2019 [Nurcan ARSLAN]

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı : Çivit Otu (*Isatis tinctoria* L.) Bitkisinden Elde Edilen
Doğal Boyanın Sitotoksik Aktivitesinin Araştırılması

Öğrencinin, Adı Soyadı: Nurcan ARSLAN

Tez Savunma Tarihi : 31.07.2019

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

FBE Müdürü
Prof. Dr. Necmeddin YAZICI

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Enstitü ABD Başkanı
Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Bu tez tarafımda (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmzası

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç. Dr. İbrahim H. KILIÇ

Dr. Öğr. Üyesi Tamer ÜSTÜNER

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Nurcan ARSLAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITIES OF NATURAL DYE OBTAINED FROM (*Isatis tinctoria* L.) INDIGO PLANT

ARSLAN, Nurcan

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

July, 2019

55 pages

There are a lot of ‘dye plants’ which contains painting materials that allow us to paint in Turkey. The blue color is derived from two major sources: Dyer’s woad *Indigofera tinctoria* and indigo plant *Isatis tinctoria* L. Blue almonds are widely produced in Mardin region, a remarkable source of income and it attracts the attention of local and foreign tourists. Manufacturers use roots of Lahore tree to color these almond candies which are called ghots, sugarless. In our research we detected this is indigo dye, synthetically produced and imported from abroad on the contrary of manufacturer’s iddaa. This dye is generally used in the textiles but has only been seen in produced blue almond candies as food dye. Therefore, the aim of this study is to show coloring almond candies can be used to natural *I. tinctoria* that whether it has a cytotoxic effect instead of using synthetic Dyer’s woad which is used in food colouring. For this purpose, cytotoxicity was investigated by *I. tinctoria* cell culture method. MTT vitality test was applied. While *I. tinctoria* leaf extract H1299 cells did not show cytotoxic effect on the viability ratio, in increased cell proliferation. On the HUVEC cells it made fluctuations and showed a partial cytotoxic effect *I. tinctoria* leaf extract was found to be non-cytotoxic on the H1299 line and on HUVEC cells.

Key Words: Cytotoxicity, MTT, *Isatis tinctoria*

ÖZET

ÇİVİT OTU (*Isatis tinctoria* L.) BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN DOĞAL BOYANIN SİTOTOKSİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

ARSLAN, Nurcan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Temmuz, 2019

55 Sayfa

Türkiye'de boya maddesi içeren ve boyama özelliğine sahip çok sayıda boya bitkisi bulunmaktadır. Mavi renk, çivit otu (*Isatis tinctoria* L.) ve indigo bitkisi (*Indigofera indica* Lam.) olmak üzere başlıca iki temel kaynaktan elde edilmektedir. Mardin yöresinde yaygın olarak üretilen yöre halkı için ciddi bir gelir kaynağı olan mavi bademler yerli ve yabancı turistlerin ilgisini çekmektedir. Üreticilerin hayalet şekersiz diye adlandırdıkları bu badem şekerlerini renklendirmek için lahor ağacının köklerinden elde edilerek yapıldığı ifade edilmektedir. Yapılan araştırmamızda üreticinin iddiasının aksine bunun çivit boyası olduğunu, sentetik olarak üretildiğini ve yurtdışından ithal edildiği saptanmıştır. Bu boyanın genel olarak tekstil boyası olarak kullanımının yaygın olduğu gıda boyası olarak sadece mavi badem şekeri üretiminde kullanıldığı görülmüştür. Bu nedenle gıda boyası olarak kullanılan sentetik çivit otu yerine doğal olan *I. tinctoria* 'nın badem şekerini renklendirmede kullanılabileceğini göstermek için sitotoksik bir etkiye sahip olup olmadığı araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *I. tinctoria* hücre kültür yöntemiyle sitotoksitesi araştırılmıştır. MTT canlılık testi uygulanmıştır. *I. tinctoria* yaprak özütünün H1299 hücreleri canlılık oranı üzerinde sitotoksik etki göstermeyip hücre sayısını arttırmıştır. *I. tinctoria* yaprak özütünün H1299 hattı üzerine ve HUVEC hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sitotoksikite, MTT, *Isatis tinctoria*



Kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde beni destekleyen, beni yönlendiren, tez çalışmalarımın her safhasında desteğini esirgemeyen, güler yüzüyle her zaman yanımda olan danışmanım Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN ve Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ hocama;

Tez çalışmalarımda bana laboratuvarını açan, her türlü materyal desteği sağlayan, yol gösteren Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e;

Bitkinin temin ve teşhis edilmesinde destek olan Arş. Gör. Fatih YAYLA'ya;

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Biyolog Başak SİMİTÇİOĞLU'na

Bütün öğrenim hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her zaman maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen, bana inanan ve güvenen ANNEM ve BABAM'a

Tez sürecinin tamamında desteğini en çok gördüğüm, beni destekleyen, yüreklendiren ve her şekilde yanımda olan eşim Ebubekir ARSLAN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLO LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
1.1 Çivit Otu' nun Biyolojik Özellikleri	1
1.1.1 Çivit Otu Bitkisinin Özellikleri	1
1.1.2 Çivit Otu Sınıflandırılması	3
1.1.3 Çivit Otu' nun Faydaları	4
1.2 Doğal Boyar Maddeler	4
1.2.1 Doğal Boyar Maddeler ve Önemi	4
1.3 Kanser	6
1.3.1 Kanserin Nedenleri	10
1.3.2 Akciğer Kanseri	11
1.3.3 Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi.....	11
1.3.4 Etiyolojisi.....	13

1.3.5 Patolojik sınıflama	14
1.3.5.1 Skuamöz Hücreli Karsinom	15
1.3.5.2 Adenokarsinom.....	16
1.3.5.3 Büyük Hücreli Karsinom.....	17
1.3.5.4 Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu	18
1.4 Hücre Hatları	19
1.4.1 Çalışmada Kullanılan H1299 Hücreleri.....	20
BÖLÜM 2.....	22
LİTERATÜR ÖZETLERİ	22
BÖLÜM 3.....	27
MATERYAL VE METOD.....	27
3.1 Materyal.....	27
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	27
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	28
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	28
3.2. Metod.....	28
3.2.1 <i>İ.tinctoria</i> 'nın Temini	28
3.2.2 <i>İ.tinctoria</i> 'nın Özütünün Elde Edilmesi.....	28
3.2.3 Hücre Kültürü	29
3.2.4 Hücre Kültürünün Kullanım Alanları	29
3.2.5 Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması	29
3.2.6 Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması.....	30
3.2.7 Hücre Soylarının Stoklanması	31
3.2.8 Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	31
3.2.9 Hemasitometre ile Hücrelerin Sayımı.....	31

3.2.10 MTT (Metiltiyazoltetrazolium) Canlılık Metodu	32
3.2.11 Mtt yöntemi.....	32
3.2.12 İstatistiksel Analiz % Canlılık Hesabı	34
BÖLÜM 4.....	35
BULGULAR.....	35
4.1 Sitotoksite Testi Bulguları.....	35
BÖLÜM 5.....	39
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR	42

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 Doğal Boya Eldesinde Kullanılan Bazı Bitkiler ve Elde Edilen Renkler..6

Tablo 1.2 Ülkelere Göre Bazı Akciğer Kanserlerinin Yaşa Göre Ölüm Oranları....13



ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Çivit Otu Türleri	2
Şekil 1.2 Çivit Otu Bitkisinin Türkiye’de Yayılış Alanı	3
Şekil 1.3 Aktif Kanser Kayıt Merkezleri.	8
Şekil 1.4 Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Dağılımı	9
Şekil 1.5 Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanserin Yaşa Göre Dağılımı	10
Şekil 1.6 ABD’de Erkeklerde akciğer kanseri ve sigara arasındaki korelasyon.....	12
Şekil 1.7. Ülkelere Göre Bazı Akciğer Kanserlerinin Yaşa Göre Ölüm Oranları	13
Şekil 1.8 Akciğer Kanserinden Alınan Sürüntü Örneği	14
Şekil 1.9 Akciğer Kanseri Türleri	15
Şekil 1.10 Skuamöz Hücreli Karsinom.....	16
Şekil 1.11 Adenokarsinom.....	17
Şekil 1.12 Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu	18
Şekil 1.13 Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Histopatolojik Görüntüsü	19
Şekil 1.14. Hücreler	20
Şekil 1.15 H1299 Hücrelerinin Mikroskopik Görünümü	20
Şekil 4.1: HUVEC Hücre Hattında MTT Sonrası Formazan Kristalleri	35
Şekil 4.2: H1299 Hücre Hattında MTT Sonrası Formazan Kristalleri	36
Şekil 4.3: HUVEC Hücre Hattında <i>I. tinctoria</i> L.’ nin % Canlılık Grafiği	37
Şekil 4.4: H1299 Hücre Hattında <i>I. tinctoria</i> L.’ nin % Canlılık Grafiği.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

KKM	:Kanser Kayıt Merkezleri
NSE	:Nöron Spesifik Enolaz
HUVEC	:İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücreleri
DMSO	:Dimetil sülfoksit
MTT	:3-(4,5-dimitiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrozolyum bromit
DMEM	:Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	:Fetal Bovine Serum
TBE	:Tris-Borik asit-EDTA
GC-MS	:Gas Chromatography Mass Spectrometry
PBS	:Fosfat tuz tamponu
EC	:Endotel Hücreler
CO₂	:Karbondioksit
CBMN	:Cytokine Blocked Micronucleus
SARS	:Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	:Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
NSE	:Nöron Spesifik Enolaz
EC	:Endotel Hücreler
CDKS	:Cyclin Dependent Kinases
DNA	:Deoksiribonükleik Asit

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Çivit Otu'nun Biyolojik Özellikleri

1.1.1 Çivit Otu Bitkisinin Özellikleri

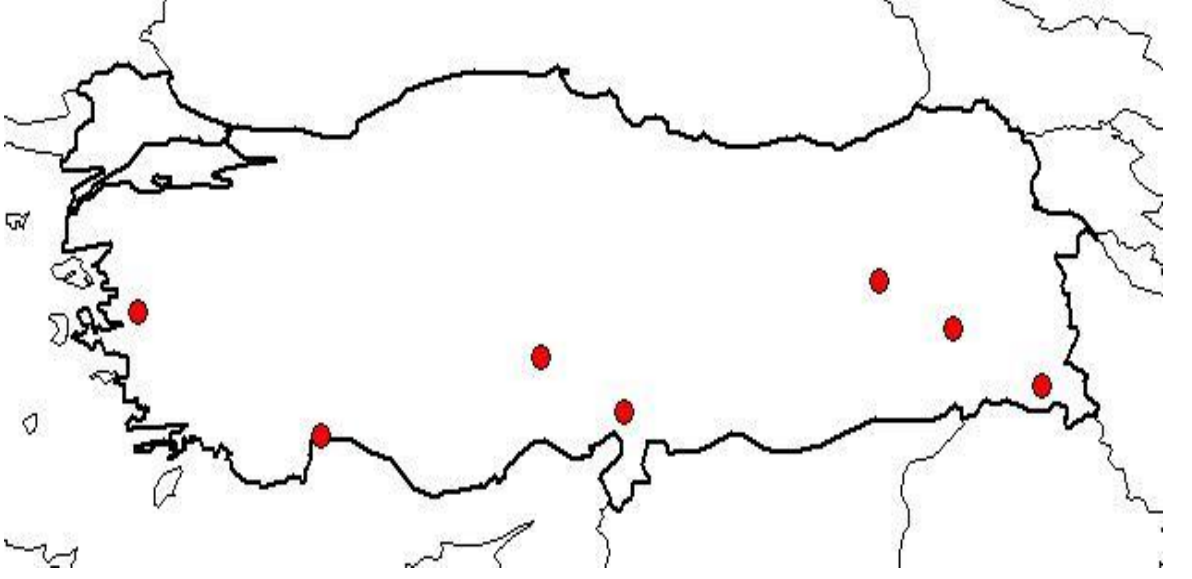
Isatis cinsine ait olan çivit otu Brassicaceae familyasındandır. Brassicaceae familyasına ait olan birçok bitki Türkiye'de boya bitkisi olup boya maddesi içeren ve boyama özelliğine sahiptir. İki veya çok yıllık bir türdür. Gövdesi yeşil bazen mordur, dip yaprakları köşeli, ters mızraksı, yeşil bazen mor renktedir. Gövde yaprakları tüylü veya tüysüz, oblong veya oblong-lanseolat olup kulakçıklıdır. Çiçek durumu bileşik salkım, tüysüz, çok nadir olarak tüylüdür. Meyve boyutları 12-15x2,5-4 mm uç ve taban kısmı ince ve yuvarlağımsıdır (Tezcan ve Suyunu, 1991). Türkiye'de Güney ve Doğu Anadolu bölgelerini tercih eden çivit otu il olarak incelendiğinde ise Osmaniye, Hakkari, Bitlis, Antalya, Bingöl, Manisa ve Niğde olduğunu görmekteyiz. Anadolu'da 25 tür *Isatis* cinsi bulunmaktadır (Baytop, 1984). Türkiye'de doğal olarak *Isatis tinctoria* bulunmakta yol kenarlarında bile yetişmektedir (Jones ve Davis, 1965). Subtropik bölgelerde daha kolay yetişmekte, kuzey ülkelerde ise kültürü zor olmaktadır (Buchanan, 1987). Eskiden beri Anadolu'da yetiştirilen ve ihraç edilen bu bitkinin sentetik olarak üretiminden sonra kültürüne son verilmiş; ancak son yıllarda bitkisel boyar maddelerin önem kazanması nedeniyle, yeniden bu bitki araştırılmaya başlanmıştır (Burns, 1995). *Isatis* türünün tüm türleri sarı renkteki çiçekleri ile tanınmakta ve boyamada kullanılmasının sebebi ise indican adı verilen maddeyi içermesinden kaynaklanmaktadır (Enez, 1987). Çivit otuna fermantasyon işlemi uygulandıktan sonra mavi renginin çeşitli tonları elde edilir. Elde edilen renk tonlarının farklı farklı olması boyanan maddenin boya banyosuna kaç defa batırıldığıyla alakalıdır. İlk boya banyosuna batırma işleminde lacivert, ikinci ve üçüncü boya banyosuna batırma işleminde ise mavi tonları elde edilir (Eyüboğlu vd.,1983) Boya maddesi içeren çiçek, yaprak, kabuk, kök gibi bitki kısımları boyama yapmak için kullanılmaktadır (Karadağ, 2007). Gıda renklendirmede, eczacılıkta, tekstil ve kozmetikte bu boya bitkilerinden yararlanılmaktadır (Piccaglia ve Venturi, 1998). Mavi renkte bu doğal boyamacılıkta kullanılan ender renklerden biridir. Mavi renk içeren başlıca iki temel kaynak çivit

otu (*Isatis tinctoria*) ve indigo bitkisi (*Indigofera tinctoria*) dir (Piccaglia ve Venturi, 1998).



Şekil 1.1 Çivit otu türleri

Çivit otu türlerinin çiçeklenme zamanı farklılık gösterdiğinden tür teşhisinin ayırımını yapmak oldukça güçtür. Mayıs ve ekim ayları arasında bitki çiçeklenme göstermektedir. Bitkinin yaprakları dip ve gövde yaprakları olarak iki kısma ayrılır. Dip kısımda bulunan yapraklar genellikle uzun ve rozetsizdir. Bitki çiçek açmaya başladığı andan itibaren dipte bulunan yapraklar dökülürler. Yapraklardaki tüy durumu karakteristik olmayıp tüylü veya tüysüz yapraklar olabilmektedir. Dalların uç kısımlarında açan çiçekler genellikle açık sarı renklidir. Bitkinin gövdesi türe göre 15-40 cm ile 125-175 cm'ye kadar uzayabilmekte ve yeşil renktedir. Çivit otu bitkisi otsu bitki olarak kayalık yamaç, çalılık ve boş araziye tercih ettiğini görürüz (Anonim, 1991).



Şekil 1.2 Çivit otu bitkisinin Türkiye’de yayılış alanı

1.1.2 Çivit Otu’ nun Sınıflandırılması

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Dilleniidae

Order: Capparales

Family: Brassicaceae

Genus: Isatis

Species: *Isatis tinctoria* L.

1.1.3 Çivit Otunun Faydaları

Çivitotu ishale iyi gelmektedir. Kuvvetli bir antioksidandır ve kanseri önleyici niteliktedir. Vücuttan zehirli maddelerin atılmasına yardımcı olmaktadır. Boğaz ağrılarına iyi geldiği bilinmektedir, Hepatit A'yı ve menenjiti önlemektedir. Grip olmaya karşı bağışıklık sistemini kuvvetlendirmektedir. Kızamık ve kabakulak oluşumunu engellemektedir. Farenjite iyi geldiği bilinmektedir.

1.2 Doğal Boyar Maddeler

1.2.1 Doğal Boyar Maddeler ve Önemi

Doğal boyarmaddeler, doğada bazı bitkiler, hayvanlar tarafından (Karadağ, 1997), likenler ve mantarların sentezleyebildiği maddelerdir (Cardon, 2007). Doğal boyarmaddeler ve doğal boyamacılık tarihi de en az tekstil tarihi kadar eskiye dayanmaktadır (Pawlak vd., 2006). Doğal boyamacılığın tekstilde kullanımına başladığı tarih Hindistan ve Mezopotamya'da MÖ. 4000'li yıllarda olduğu bilinmektedir (Karadağ, 2007).

Anadolu da bitkisel boyamacılıkta kullanılan bitkiler yüzlerce yıllık geçmişe sahiptir. Türkiye'nin coğrafi yapısından ötürü kullanılan birçok bitkisel boya bitkilerin çeşitlilik göstermesinden dolayı bu boyalar doğal olarak bitkilerden elde edilebilmektedir (Öztürk,1999).

Bitkisel ve hayvansal boyarmaddeler çok uzun yıllar kullanılmış olmasına rağmen sentetik boyaların ortaya çıkmasıyla kullanımları giderek azalmış hatta yok olma derecesine gelmiştir. Sentetik boyalar toksik, kanserojen ve atıklarının çevreye verdiği zararların anlaşılması ile tekrar doğal boyar maddeler gündeme gelmiştir (Karadağ, 2007; Ali vd., 2007). Bir yıllık veya iki yıllık olan doğal boyarmadde bitkileri çevre kirliliği oluşturmayan, toksik ve kanserojen olmayan bitkilerdir (Nagar vd., 2005). Çevreye verilen önemden ve teknolojinin kolay olmasından dolayı bitkisel boyarmaddeler hayvansal kökenli olanlara göre daha çok tercih edilmiştir (Karadağ, 2007).

Doğal boyamacılıkta kullanılan boyalar bitkisel, hayvansal ve madensel kökenli boyarmaddeler olmak üzere üç başlık altında incelenmektedir. Bitkisel kökenli

olanlar bitkilerinin çiçeklerinden, yapraklarından, köklerinden, meyvelerinden veya testasından elde edilmektedir (Arlı, 1982) .

Boyacılıkta faydanılan boya bitkilerinden bazıları Anadolu'nun hemen her tarafında doğal olarak bulunur. *Alnus glutinosa* (kızılağaç), *Punica granatum* (nar), *Juglans regia* (ceviz), *Alkanna tinctoria* (havacıva), *Rhus ccoriaria* (derici sumacı), *Quercus infectoria* (mazi meşesi), *Continus coggygria* (boyacı sumacı), *Euphorbia tinctoria* (sütleğen), *Quercus aegilops* (palamut meşesi), *Allium cepa* (soğan) bunlardan bir kaçıdır (Harmacıoğlu, 1955). Anadolu'da yetişen diğer bitkileri kökboya, cehri, ceviz, havacıva, nar, boyacı sumacı, soğan, aspir, muhabbet çiçeği ve safran, çivit otu sayılabilir (Korur, 1937).

Tablo 1.1 Doğal Boya Eldesinde kullanılan bazı bitkiler ve elde edilen renkler

Bitki Adı	Yöresel Adı	Familiyası	Elded Edilen Renk	Etken Maddesi	Kaynak
<i>Cotinus coggygia</i> L.	Sarı sumak	Anacardiaceae	Gövde ve yapraklarından sarı, kahve renkleri	Fisetin	(Enes, 1987)
<i>Pistacia palaestina</i> Boiss	Menengiç	Anacardiaceae	Yaprak ve dallarından açık sarı	Quercetin	(Eyüboğlu, 1983)
<i>Imula viscosa</i> L.	Andız otu	Asteraceae	Yaprakları sarı renk	Quercetin	(Enes, 1987)
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Mayıs papatyası	Asteraceae	Çiçeklerinden sarı renk	Apigenin	(Enes, 1987)
<i>Datisca cannabina</i> L.	Gence	Datisaceae	Bitkinin tümünden parlak sarı renk	Deiscetin	(Enes, 1987)
<i>Rexeda luteola</i> L.	Mulhabbet çiçeği	Ressedaceae	Yaprakları Sarı renk verir	Apigenin-Luteolin	(Kızı, 2005)
<i>Rubia tinctorum</i> L.	Kök Boya	Rubiaceae	Köklerinden kırmızı Boya	Alizarin-Parparin	(Yılmaz, 2001)
<i>Juglans regia</i> L.	Ceviz	Juglandaceae	Meyveleri Yeşil - Kahve	Juglon	(Eşberk, 1952)
<i>Senecio jacobaea</i> L.	Kanarya otu	Asteraceae	Çiçeklerinden sarı ve yeşil renk	Apigenin	(Enes, 1987)
<i>Indigofera tinctoria</i> L.	Çivit Ağacı	Fabaceae	Yapraklarından mavi renk	İndigo	(Tüzmen, 1996)
<i>Isatis tinctoria</i> L.	Çivit otu	Brassicaceae	Yapraklarından mavi renk	İndigo	(Kızı, 2000)

Çizelge 1.1. Doğal boya eldesinde kullanılan bazı bitkiler ve elde edilen renkler

Tekstil boyamacılığında ve duvar resimleri gibi sanat alanlarında çivit otundan elde edilen boyarmadde kullanılmıştır. Bu boya günümüzde resim ve kumaş boyamada kullanılır. (Delammare ve Guineau, 2007).

1.3 Kanser

Kanser hastalığı, vücudumuzda birçok organı etkileyebilen, günümüzde ölüm nedenlerinin başında gelen bir faktördür. Kanserin çok çeşitinin olması, tedavisi ve seyri, ilaçlara karşı olan direnci, hastalığın olduğu organ, hastalığın süresi gibi pek çok değişken tarafından etkilenir. Kanserin ve moleküler mekanizmasının izlenmesinde önemli bir rol olan gen ve proteinler arasındaki ağıdır (Wu vd., 2012).

Kanser, çok etmenli bir hastalık olup; bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallar kanser oluşumuna sebep olan etkenler arasında sayılabilir (Yokuş ve Çakır, 2012). Çevresel faktörler kanserin meydana gelmesinde kalıtım yoluyla meydana gelmesinden daha yüksek bir orandadır. Birlikte aktarılan hasarlı genlere kanserojenik çevresel faktörler de eklenince kanserleşme riski artmaktadır. Vücutta bulunan serbest radikallere bağlı oluşan DNA hasarları da kanserleşme sürecinde önemli rol oynamakta. Tümör baskılayıcı genlerin, onkogen aktivasyonunu, serbest radikaller sinyal iletimini inaktive ederek tümör oluşumu ve gelişimini hızlandırmaktadır. Çevresel faktörlerin kanser için hızlandırıcı bir rolü olsada kanserden korunmada beslenme alışkanlıkları ile birlikte çevresel faktörler olumlu yönde etki gösterebilmekte. Yapılan bazı çalışmalarda sebze ve meyve tüketimi ile düşük oranda yağ ve yüksek oranda lif içeren tam tahıllı ürünlerin tüketilmesi meme, akciğer, kolon ve prostat gibi birçok kanser türüne yakalanma riskini azalttığı görülmüştür (Beliveau ve Gingras 2007; Guha, 2009).

Radyasyon, ısı, güneş ışığı, mekanik darbeler kansere sebep olan fiziksel etkenler arasında sayılabilir (Heynick vd., 2003). Radyasyon gibi iyonize ışınlar, (nükleer emisyonlar, x, Ultra viole ışınları, gama ışınları vb.) biyolojik makro moleküllere direkt etki edebilecek yeterli quantum enerjiye sahiptirler (Yokuş ve Mete, 2012).

Bu ise baz yada şekerde; DNA’da ise tek ve çift zincir kırıkları modifikasyonlarına sebep olur. DNA üzerinde hasar oluşturduğuna dair çalışmaların bir diğeri de son yıllarda elektrikli ev aletlerinden yayılan, düşük ve yüksek frekanslı manyetik alanların (noniyonize ışınlar) ışınlarıdır (Yokuş ve Mete, 2003). (JAJTE vd., 2001).

Meyve ve sebze tüketiminin bazı kanserleri (kalın bağırsak, gırtlak, akciğer, mide, meme, pankreas, ve yemek borusu) önlediğine dair pek çok bilimsel bulgu vardır. Meyve ve sebzelerin içermiş olduğu antioksidanlar ve posaları sayesinde kansere karşı korunmada etkili olduğu saptanmıştır (Devereux vd., 1999).

Sağlık Bakanlığı tarafından 1992 yılında “Kanser kayıt ve İnsidansı” projesi başlatılmış olup bu projenin amacı kansere karşı kontrol programlarının verilerinin oluşturulabilmesi ve Türkiye’de kanser istatistiklerinin güvenilir bir şekilde temin

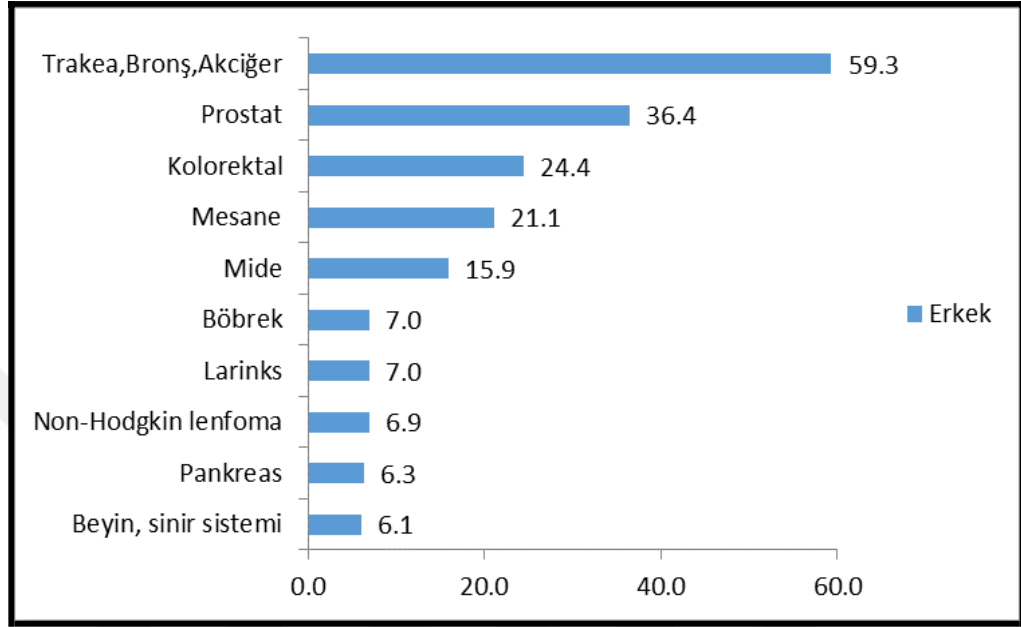
edilmesidir. Bu amaçla 14 ilde KKM (Kanser Kayıt Merkezleri) kurulmuş. Bu illerde görülen kanser vakaları da bu merkezlerce aktif sistemle kayıt altına alınmaya başlamıştır (Condursa vd., 2006).



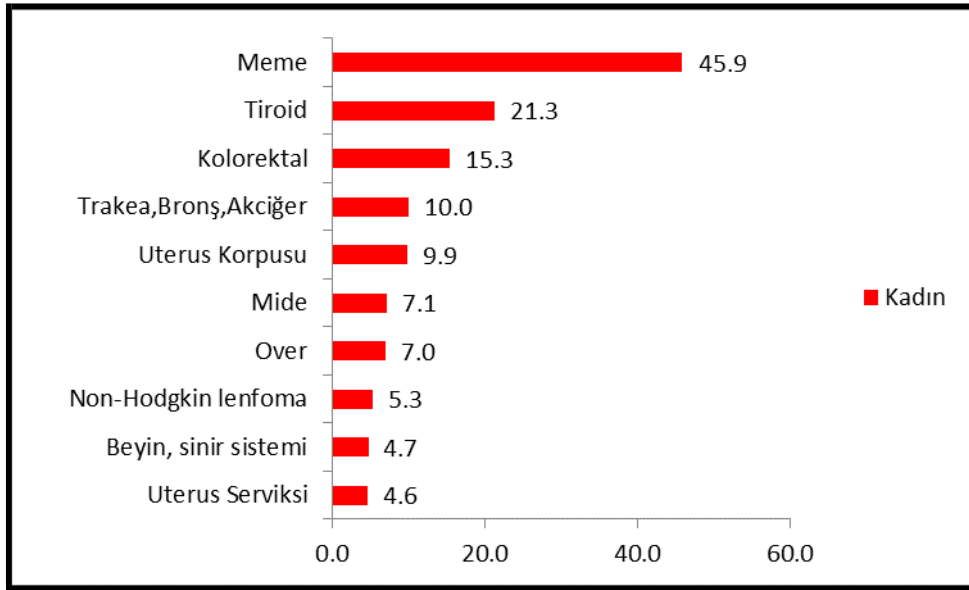
Şekil 1.3 Aktif kanser kayıt merkezleri

Ülkemizde kanserin profilinin belirlenmesi için 1983 yılında Kanserle Savaş Daire Başkanlığı kurulmuştur. Bu yıllarda kanser hastalığının bildirimi mecburi olup kanserin ne sıklıkla ortaya çıktığı konusunda çalışmalar yapılmış. Bir diğer çalışma da kanserin hangi organlarda ve sayıları hakkında bilgi edinilmiştir (Kayaalp, 1998; Yokuş ve Çakır, 2012)

Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları, (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)



Şekil 1.4 Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre dağılımı



Şekil 1.5 Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre dağılımı

Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları, (Anonim, 2013) (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide)

1.3.1 Kanser'in Nedenleri

Kansere neden olan üç ana faktör; sigara, beslenme faktörleri ve mesleki etkilendirmelerdir. İnsanlardaki kanserlerin yaklaşık üçte biri sigara nedeniyle, üçte biri de besinlerin tüketilmesi ve hazırlanması sırasında yapılan hatalardan dolayı meydana gelir. Yaklaşık %5 kadarlık bir bölümün nedeni de mesleki faktörlerdir. Kanserlerin üçte ikilik bir kısmında korunma sağlamak için bu üç faktörü dikkate almak gereklidir (Ereke, 1995). Bu sebeple, tüm bireylerin kanserden korunabilmesi için, erken tanı ve tedavi konularında bilgi edinmeleri sağlanmalıdır.

Günümüzde kanser hastaları gelişen tedavi yöntemleriyle daha uzun süre yaşayabilmektedir. Fakat kanser hastalığının ismi, isminin verdiği korku, gelecek endişesi, hastalığın tedavi sürecinde yaşayabilecekleri stres hastayı olumsuz etkileyen bazı unsurlar arasında sayılabilir (Babaoğlu, 2003). Kanser gibi yaşamı tehdit eden bir hastalığa yakalanmış olmak bireylerde ciddi bir psikolojik rahatsızlık yaratmakla birlikte yapılan araştırmalar da kanser hastalarının önemli bir kısmında normal reaksiyonların ötesinde psikiyatrik bozukluk olarak nitelendirilebilecek bulgular olduğunu ortaya koymaktadır (Millan vd., 2006; Pitceathly ve Maguire, 2003).

1.3.2 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken günümüzde en sık görülen kanser vakalarından biridir ve erkeklerde ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütünün 2008 de ki raporuna göre kanser ölümlerinin erkeklerde % 29.3' ü, kadınlarda % 11' i akciğer kanseri nedeniyle olmaktadır (Ferlay vd., 2010).

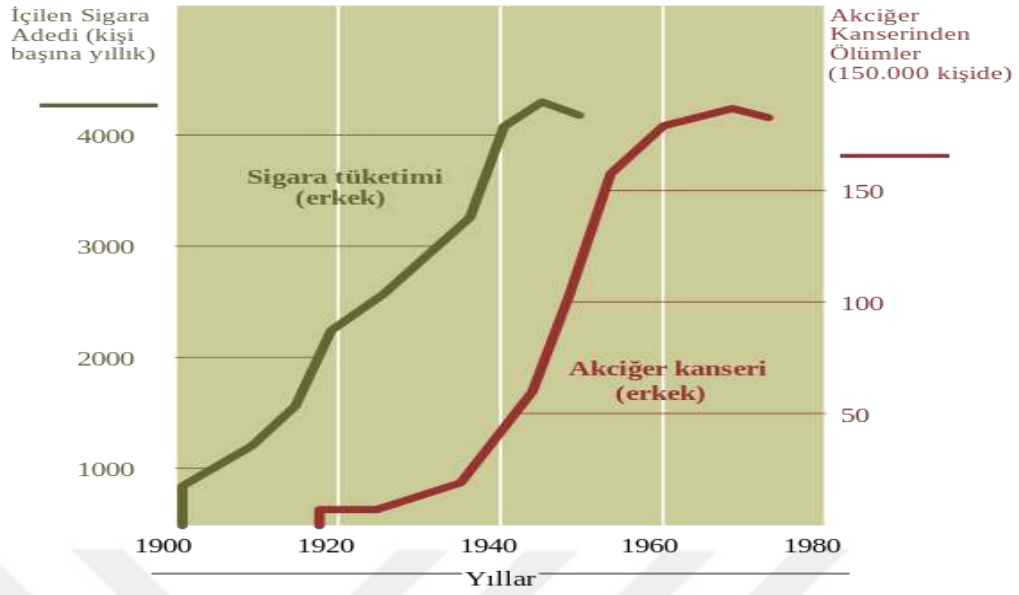
Ülkemizde 1980'den bu yana sigara tüketiminin kadınlarda artış göstermesiyle akciğer kanseri ölümleri kadınlarda artarken erkeklerde bu oran çok değişkenlik göstermemektedir (Coşkunpınar, 2013; Kiyohara ve Ohno, 2010; Kligerman ve White, 2011; Köktürk vd., 2004; Rayet ve Gelinas, 1999).

1.3.3 Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Kadınlarda akciğer kanseri görülme sıklığı, 1960 yılında 6/100000 iken, 1990 yılında bu oran 40/100000 olarak bildirilmiştir (Rivera ve Stover, 2008). ABD' de halen kadınlarda en önemli kanser ölümü nedeni akciğer kanseridir (Wu vd., 2012). Önümüzdeki yıllarda akciğer kanserinin ülkemizde de giderek artabileceği öngörülmektedir (Çelik, 2001). Akciğer kanserine sebep olan en büyük etken sigaradır. Tüm akciğer kanserlerinin %80-90' ı tek başına sigaraya bağlıdır (Öz, 2001; İtil, 2000; Spiro ve Porter, 2002). Ülkemizde resmi rakamlara göre her yıl 20.000-25.000 yeni akciğer kanseri hastası ortaya çıkmakta ve bu rakamın artarak 30.000-40.000'e kadar ulaşabileceği düşünülmektedir (Spiro ve Porter, 2002).

ABD'de erkeklerde akciğer kanseri ve sigara arasındaki kolerasyon grafik, 20 yıllık süre aralığında artan sigara içme oranları ve artan akciğer kanseri insidansını gösteriyor.

Sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasındaki 20 yıllık boşluk



Şekil 1.6 ABD’de erkeklerde akciğer kanseri ve sigara arasındaki korelasyon

Akciğer kanseri olan hastalarda hastalarının yaklaşık %90’ı sigara kullanmaktadır (Metintaş, 2010). Türkiye’deki akciğer kanseri hastaların %88,7’sinin sigara kullanmış olduğu saptanmıştır. Sigara içimi akciğer kanseri ile direkt ilişkili olup kadınlarda %90, erkeklerde %79 oranında olduğu tespit edilmiştir (Bilello vd., 2002). Sigara içenlerde akciğer kanserinin meydana gelişme riski sigara içmeyenlere göre 24-36 kat daha fazladır (Müsellim, 2007). Pasif sigara içiminde ise bu risk %3,5’dur (Halilçolar vd., 1999).

Ülkemizde her yıl 8.750 kişinin pasif içicilikten yüzünden öldüğü tespit edilmiştir (Smith vd., 2012).



Şekil 1.7 Ülkelere göre bazı akciğer kanserlerinin yaşa göre ölüm oranları (her 100.000 kişi başına,).

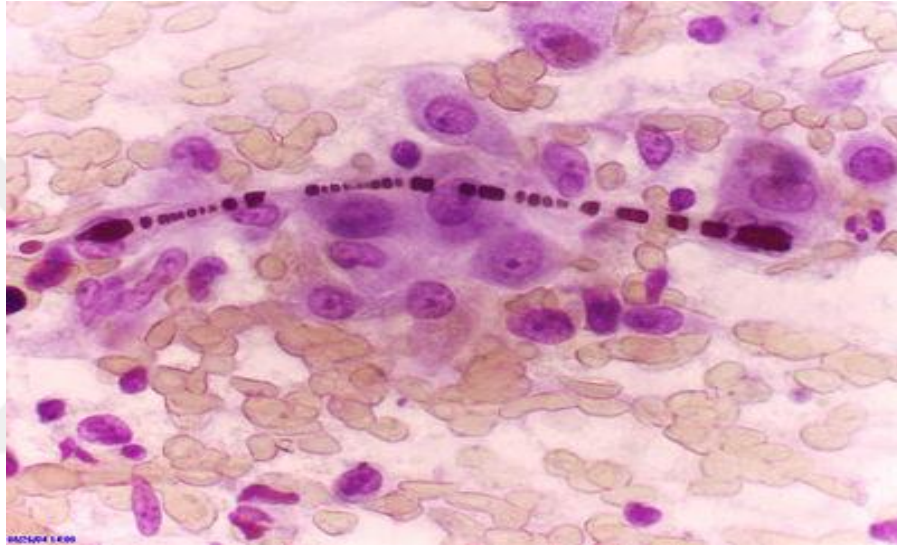
Tablo 1.2 Ülkelere göre bazı akciğer kanserlerinin yaşa göre ölüm oranları

veri yok	
≤ 5	30-35
5-10	40-45
10-15	45-50
15-20	50-55
20-25	
25-35	

1.3.4 Etiyolojisi

Akciğer kanseri hastalığına neden olan birçok faktör vardır. Bunlardan en etkili olanları; sigara, mesleki karsinogenler ve çevresel faktörlerdir. Hava kirliliği,

geçirilmiş akciğer hastalıkları, diyet, viral enfeksiyonlar, ve immünolojik faktörler de diğer etkenler arasındadır (Tdamç, 2006). Akciğer kanseri olgularının %90'ından sorumlu olan en önemli faktör sigaradır. Yüzyıllardır tütün ürünlerini kullanmamıza rağmen sigaranın ticari olarak piyasaya sürülmesinden sonra akciğer kanseri birçok ülkede ortaya çıkmıştır (Alberg ve Samet, 2003). Bazı inorganik ve organik maddelerin etkileşimi ile akciğer kanseri riskinin arttığı bilinmektedir. Bu maddeler arasında, arsenik, nikel, kadmiyum, krom, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, klorometil ether ve klorometil metil eter, radyasyon, demir-çelik, asbest, formaldehid gibi kimyasallar sayılabilir (Tdamç, 2006).



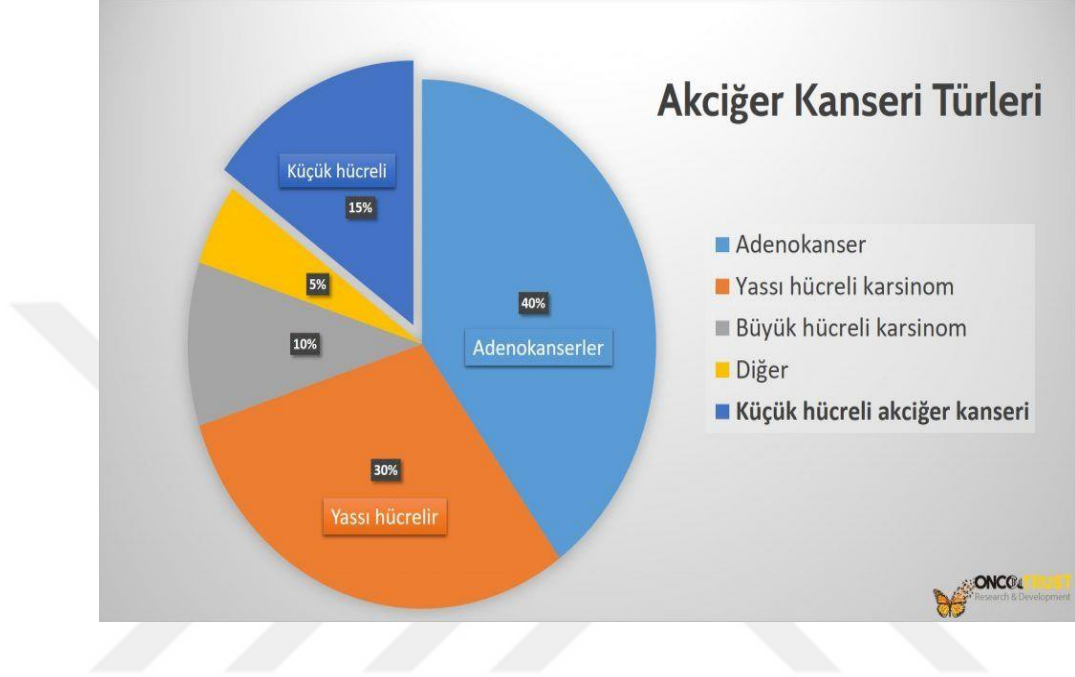
Şekil 1.8 Akciğer kanserinden alınan sürüntü örneği

E, A vitamini ve betakaroten yönünden zengin beslenmek akciğer kanseri riskini azaltır (Alberg ve Samet, 2003). Akciğer de skar gelişimine yol açan tüberküloz, akciğer hastalığı, bronşektazi, pnömoni ve abse gibi hastalıklar da akciğer kanserinin gelişme riskini arttırmırlar (Osann, 1991). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı varlığında da bu risk yükselmektedir (Kreuzer vd., 2002).

1.3.5 Patolojik Sınıflama

Akciğer tümörlerinin oluştuğu yerler %95 oranında bronş epitelidir. Tümörlerin %5' lik kısmını ise bronşiyal karsinoidler, mezenkimal tümörler, lenfomalar, mezotelyomalar, bronşiyal bez neoplazmları ve bazı benign lezyonlar oluşturmaktadır (Robbins, 1995).

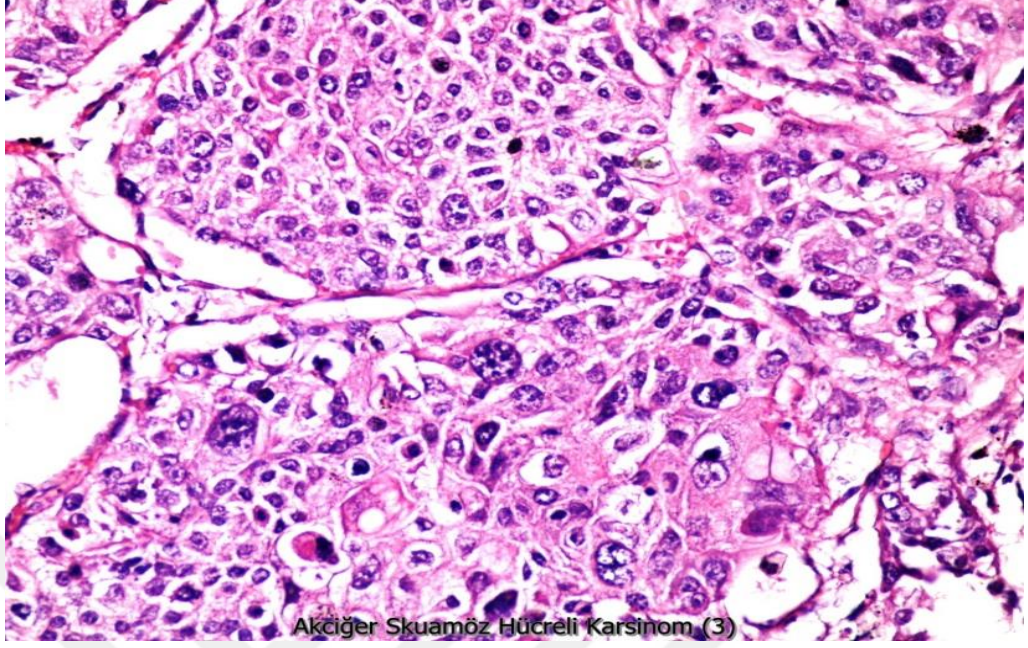
Histolojik tipte akciğer kanseri dört şekilde bulunur: Skuamöz hücreli kanser, adenokanser, büyük hücreli indifferansiye kanser ve küçük hücreli akciğer. İlk üç tipteki akciğer kanseri çoğunlukla Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olarak sınıflandırılmaktadır. Bazı olgularda bu histolojik tipler ayrı ayrı veya birlikte de bulunabilirler (Travis vd., 2011).



Şekil 1.9 Akciğer kanseri türleri

1.3.5.1 Skuamöz Hücreli Karsinom

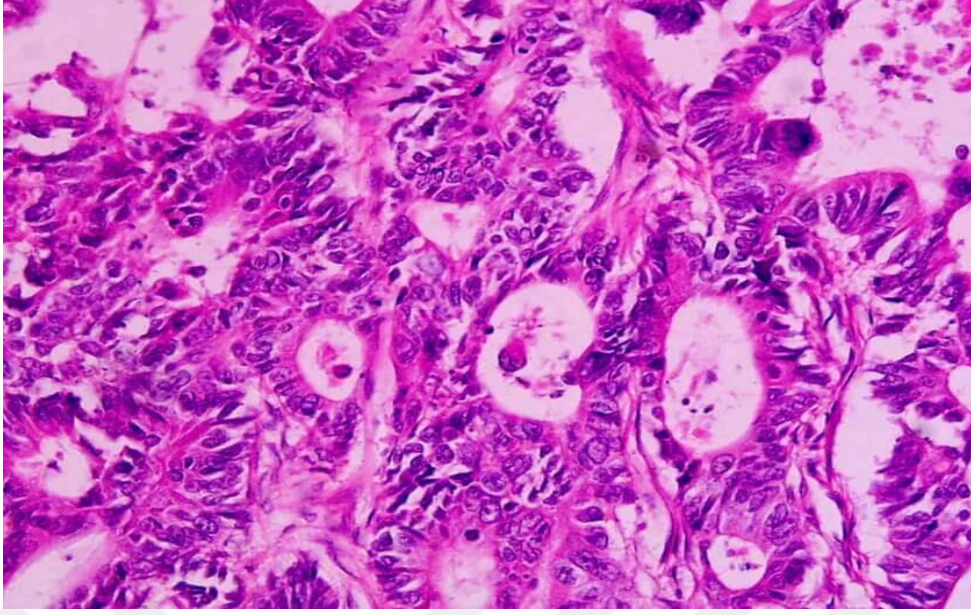
Skuamöz Hücreli Karsinom, erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülen ve daha çok sigara ile ilişkili olan kanser türüdür. Büyük bronşların merkezinden kaynaklanmakta olup bölgesel lenf nodlarına kolay yayılmaktadır. Göğüs kafesi dışına diğer hücre tiplerine göre daha geç yayılır. Bu tümörler dokularda keratin inciler ve hücre içi köprüler oluşturan iyi farklılaşmamış tipten, minimal skuamöz eğilim özelliği olan farklılaşmış tipe kadar değişebilmektedir. Bu tür hastalığın seyri diğer tiplerden daha iyidir (Robbins, 1995). Morfolojik olarak 4 varyantı vardır (Parkin vd., 2001). Şeffaf hücreli, küçük hücreli, papiller ve bazaloid varyantlar (Perez vd., 2012).



Şekil 1.10 Skuamöz hücreli karsinom

1.3.5.2 Adenokarsinom

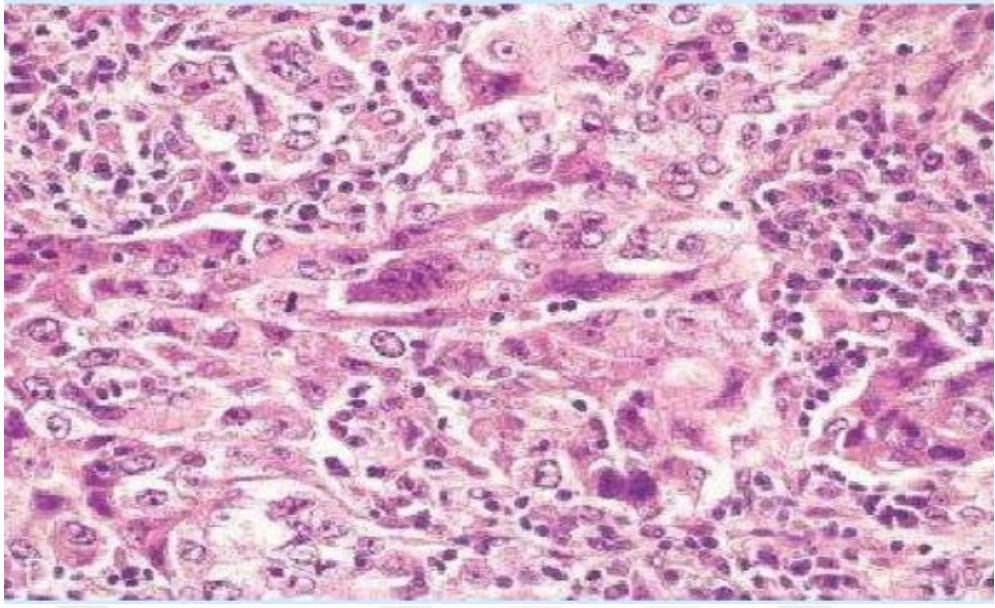
Skuamöz hücreli karsinoma göre sigara içimi ile daha az ilişkili olan akciğer kanseri türüdür. Cinsiyet ayırt etmeksizin yıllar içinde sıklığı her iki cinsten giderek artan akciğer kanseri türüdür. Pnömoni, tüberküloz, interstisyel fibrozis, pnömokonyoz gibi akciğer hastalıklarının skarları üzerinde tümörün geliştiği düşünülmektedir. Periferik hava kanalları ve alveollerden gelişmeye başlayan terminal tümörlerdir (Robbins, 1995; Fidaner vd., 2001).



Şekil 1.11 Adenokarsinom

1.3.5.3 Büyük Hücreli Karsinom

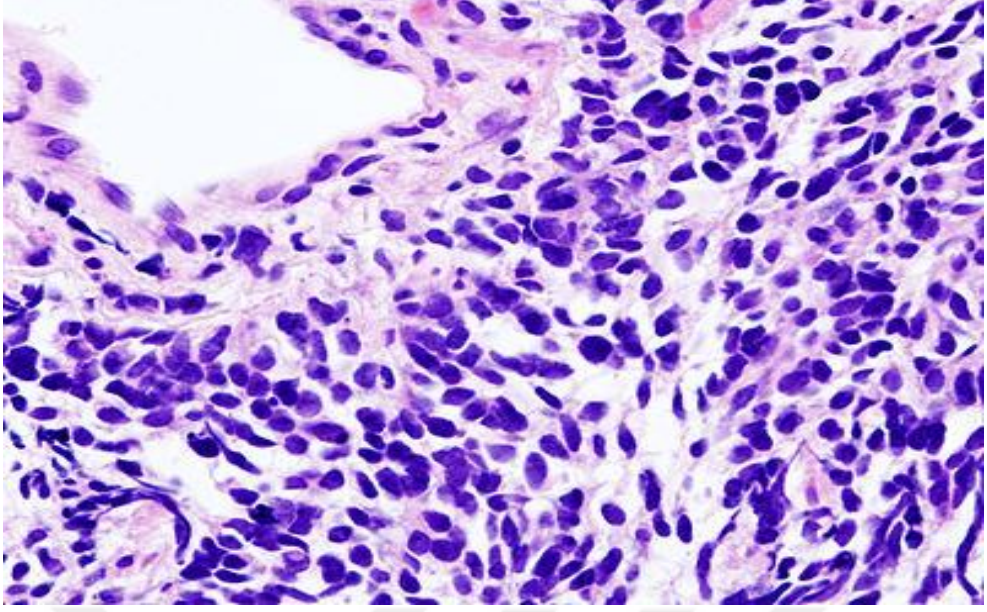
Büyük hücreli akciğer kanseri, herhangi bir kategoriye giremeyecek kadar farklılaşma (sitolojik farklılık, morfolojik olarak skuamöz veya glandüler ayrışma) göstermeyen kanserlerin şeklidir. Genellikle hücrelerin periferine yerleşir. Dev hücrelerden oluşan ve bazen hücrelerin kendine has özelliklerini kaybetmesiyle kendini gösteren kanserdir. Erken dönemde bile çok hızlı yayılabilen akciğer kanseri türüdür (Robbins, 1995; Sholl, 2012; Travis ve Brambilla, 2004).



Şekil 1.12 Büyük hücreli akciğer karsinomu

1.3.5.4 Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu

Akciğer kanser türleri arasında görülme oranı %14 kadardır. Sigara ile ili ekli olup erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır. Hastalarda hücrelerin ölümü ve kanama sıklıkla görülür. KHAK olan hastalarda hastalık hızlı ilerleme gösterir (Kaiser, 2002). Çoğunlukla santral bir bron tan kaynaklandığı düşünülür. Akciğer kanseri türleri arasında kökeni üzerinde en çok tartışılan tümör tipi küçük hücreli akciğer karsinomlarıdır (Churg, 1988; Warren vd.,1989).



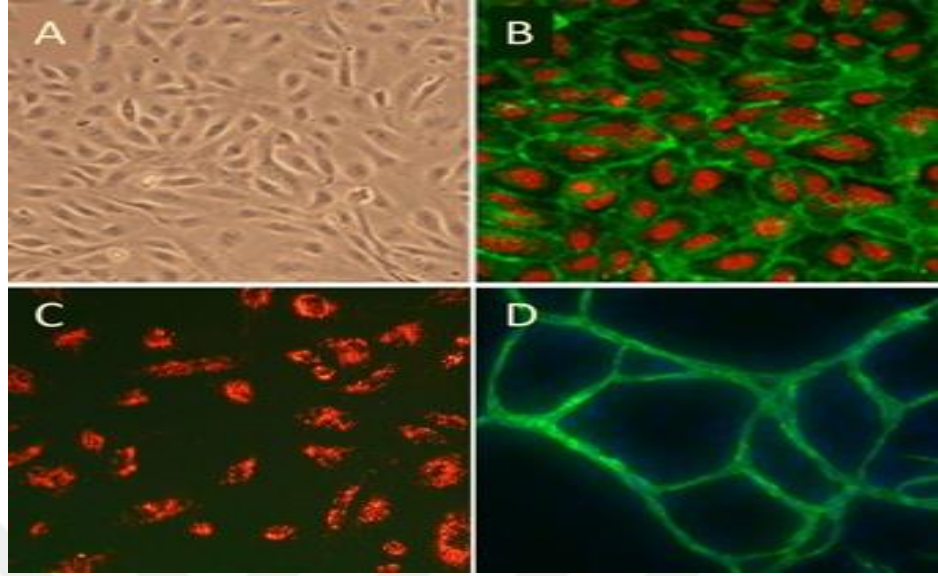
Şekil 1.13 Küçük hücreli akciğer kanserinin histopatolojik görüntüsü.

1.4 Hücre Hatları

İnsan göbek kordonu damar endotel hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cell -HUVECS).

İnsan göbek kordonu toplar damarı endotel hücreleri normal olarak insan göbek bağı kordonundan ayrıştırılır. Endotel hücrelerin, patolojisini ve fonksiyonlarını nasıl gösterdiğini çalışmak için en uygun hücre hattı olarak HUVEC hücreleri kullanılmaktadır. Genetik faktörlerin incelenmesinde insan endotel hücre modelinde gerçekleştirilen deneyler sonucunda daha çok önem kazanmaya başlamış olup etken maddelerin daha etkili kullanılması da mümkün olabilecektir (Park vd, 2006). Biyolojik alanda endotel hücreleri birçok alanda yararlanılabilen araştırma modeli sağlar. İlk izolasyondan bu yana, İnsan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECS), uygun bir kültür ortamı sağlayabildiğinden ve çalışılması kolay olduğundan çok tercih edilen hücre çeşitidir (Kaji vd., 2017) Ancak, bazı araştırmalar için anjiyogenez, geçirgenlik gibi süreçler üzerinde odaklanan mikrovasküler Endotel Hücreleri (EC) çalışmak için çok daha önemli fizyolojik modeldir (Song vd, 2012). HUVEC hücreleri üzerinde aşı, antikor ve enzim üretimi, ilaç araştırmaları, hücreler arası bağlantılar gibi birçok farklı alan için deneysel çalışma olanağı sağlar. En iyi

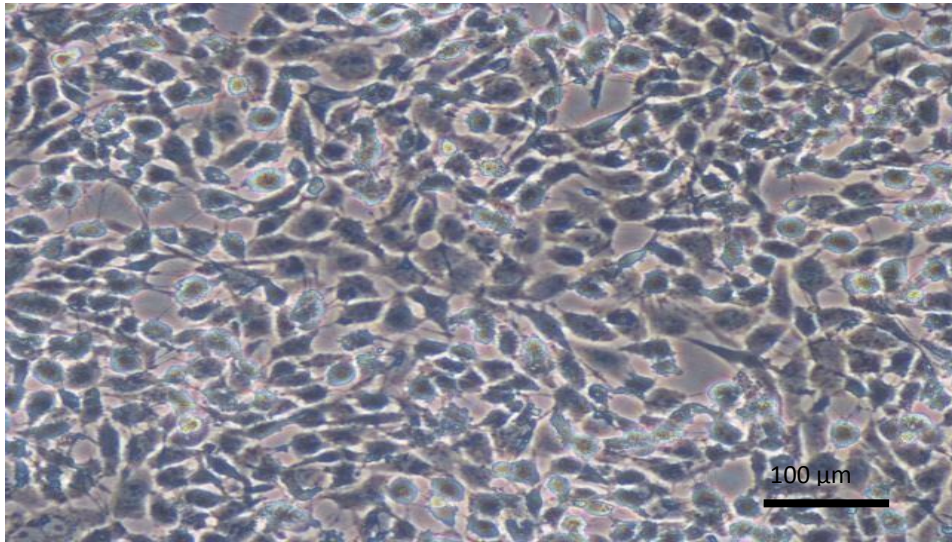
endotel hücre kaynağı özelliğini taşımaktadırlar. Maliyeti düşük olup temin edilmesi kolaydır (Yazır ve Dalkılıç, 2012).



Şekil 1.14 Hücreler

1.4.1 Çalışmada Kullanılan H1299 Hücreleri

Tümör virüsü olarak Peyton Rous tarafından 1911’de ilk defa saptanmış. H1299 hücre hattı günümüzde kanser ilaçlarının etkisinin saptanmasında, kanser ilçlerinin geliştirilmesinde kullanılırken mikrobiyolojide virüslerin tanımlanması, üretilmesi ve virüs aşılarının geliştirilmesi için kullanılmaktadır (Rous, 1911; Akçalı, 2010).



Şekil 1.15 H1299 Hücrelerinin mikroskopik görünümü

Hücresel yapıları dar sitoplazmalı, organelden içerikleri yönünden fakir hücrelerdir. İnce sitoplazmik uzantılara sahiptirler. Tümör hücrelerinin çekirdekleri belirgin, eosinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Gerçek lümen oluşumu en önemli özelliğidir. İnter veya intrasellüler boşluklar, iyi gelişmiş desmosomal bağlantılar mevcuttur (Soyocak vd., 2009; Wang vd. 2013; Zhang vd., 2014; Lin vd., 2014; Yua vd., 2014).

H1299 KHAK hücre hattı iken, A549 küçük hücreli akciğer hücre hattıdır. Akciğer kanserlerinin %80'i küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan hücre hatlarına aittir (Travis vd., 2011). Tüm akciğer kanseri tipleri arasında ise yaklaşık olarak %85' ini küçük hücre dışı akciğer kanseri oluştururken, yaklaşık %15'ini de küçük hücreli akciğer kanseri oluşturmaktadır (Hann ve Rudin, 2008; Roy vd., 2008; Li vd., 2012; Liu ve Giaccone, 2013). Küçük hücre dışı akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanserine göre daha sık görülmekte ancak büyümesi daha geç olmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri daha hızlı büyür, vücuttaki diğer organlara çok daha çabuk yayılma yapar (Alberts vd., 2004; Bayram, 2013).

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

Davis (1965), Türkiye’ de yayılış gösteren *Isatis* taksonlarını tespit etmiş ve Flora of Turkey’ de 26 tür, 11 alttür ve 2 varyetenin sistematüğini, yayılış alanlarını, ekolojisini ve morfolojik özelliklerini belirtmiştir.

Hesbert vd. (1984), Ames testini kullanarak yaptıkları çalışmada İndigo ve indirubinin fare karaciğeriindeki sitogenetik potansiyelini değerlendirmişlerdir. İlk uygulamadan 30 ve 54 saat sonra öldürülen farelerdeki sitotoksik etkiyi karşılaştırmışlardır. Doğal indigo 0.1, 1, ve 1.2 gr/kg orantılı olarak kemik iliğı hücrelerine uygulandığı zaman istatistiksel olarak önemli bir sitotoksik etki göstermediğini saptanmıştır.

Mısırdalı (1985), *Isatis* türünde morfolojik olarak araştırmalar yapmış Doğu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinden toplanan 453 *Isatis* türünün 31 tür, 14 alt tür ve 2 varyete tesbit etmiştir.

Hoessel vd. (1999), *I.indigotica*’nın kuru yapraklarından elde etmiş olduğu ekstraktın içindeki indirubinin Cylin Dependent Kinazlara (CDK) üzerinde inhibitör etkisi yaptığını bu sayede hücrelerin çoğalmasını engellediğini tespit ederek tümörlü hücrelerin gelişimini engellediğini ortaya koymuştur.

Gilbert vd. (2000), HPLC ile birleştirilmiş ELSD kullanarak çivit otunun (*Isatis* spp.) yaprak ekstraktlarındaki indigo öncüllerinin analizini yapmış ve bu bileşenlerin indirubin ve tryptanthrin olduğunu HPLC-MS ile tanımlamışlardır.

Marko vd. (2001), yaptıkları çalışma ile insan tümör hücrelerinde CDK1’in aktivitesini engelleyen bu sayede hücre çoğalmasını engelleyerek tümör oluşumunu durduran indirubin türevlerinden (indirubin-5 sulfonate ve indirubin-3 monoxime) olduğunu bildirmiştir.

Leclerc (2001), yaptığı çalışmada, İndirubin'in sitotoksik etkisinin olduğunu MFC-7 kanser hücreleri üzerinde çalışmalar yaparak indirubinin inkübasyon süresine ve İndirubin dozuna bağlı olduğunu bildirmiştir. 30µM konsantrasyonundaki İndirubin MFC-7 hücreleri ile karşılaştığı zaman bu hücrelerin gelişiminin %42 oranında azaldığını saptamışlardır. İndirubin'in methanol ve DMSO'da çözünmesi ile MFC hücrelerine karşı sitotoksitesinin azaldığı ve İndirubinin daha yüksek konsantrasyonunda MFC hücrelerine karşı etki gösterdiği saptamışlardır.

Danz vd. (2001), SARS virüsüne *Isatis* kökünün etki ettiğini tesbit etmişlerdir.

Geleneksel Çin Tıbbında Kronik Lösemi'nin (CML) tedavisinde kullanılmakta olan 11 bitkisel karışımı araştırırken tek bir etken maddenin indigo olduğunu saptayan Çin Hematoloji Enstitüsü daha sonra yaptığı çalışmalarda anti lösemik aktivitenin indigonun kırmızı renkli izomeri olan indirubinden kaynaklandığını tespit etmiş. İndirubinin moleküler mekanizmasının nasıl çalıştığı üzerine araştırmalar başlamış ancak 90'lı yılların sonuna kadar indirubinin etki mekanizması bulunamamıştır (Meijer vd. 2006).

Çivit otunun genç yaprakları ezildiğinde içerisindeki glukobrassin miktarı brokoliden 65 kat daha fazladır. Prostat kanserine karşı kullanılan 8 bitkiden (Reishi mantarı, krizantem, panax ginseng, meyan kökü gibi) biri de *Isatis*'tir (Galletti, 2006).

İndirubinin CML üzerine etkisinden sonra, hemofili hastalığı üzerindeki etkileri merak edilmiş ve deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu deneylerde olumlu yönde etkisi kanıtlanmıştır. İndirubin tedavisi lösemi hastalarının bir kısmına uygulandıktan sonra hastalığın belirtilerinde iyileşme görüldüğü, diğer kısmında ise hastalığının tamamen tedavi edildiğini görülmüştür. Kanser tedavisi olan hastalarda İndirubin, kanser tedavisindeki bir ilaçla kıyasladığında, ilacın daha yüksek bir oranda sonuç vermesine rağmen, bulguların azaltılmasında (kanseri hücrelerin çoğalmasının durması ve kan proteinlerinin üretimi) benzer bir sonuç alındığı tespit edilmiştir. (Meijer vd. 2006).

İndirubin tümör hücrelerinin kontrolsüz büyümesini durdurmak için kullanılan bir maddedir. İndirubin Cyclin Dependent Kinases (CDKS) olarak adlandırılan sönmüş enzimlere tutunarak tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engellemek için çalışır. Hücre bölünmesini bu enzimler düzenler. CDKS enzimleri kansersiz hücrelerde normal olarak uygun bir zamanda etkinliğini kaybederken kanserli hücrelerde CDK'lar aktif kalır ve hücreler kontrolsüz olarak bölünmeye devam eder. İndirubin CDK'lara tutunur, aktivitelerini engeller ve hızlı hücre bölünmesini durdurur (Meijer vd. 2006; Liau vd. 2007).

Isatis cinsine ait türlerde indirubinin bitkideki varlığı ve bitkideki miktar tayini HPLC cihazı ile yapılmaktadır. İndirubin de bir indigo öncülüdür. İndigo öncülleri için kullanılan metotlar biraz değiştirilerek indirubin içinde kullanılabilmektedir (Liau vd. 2007).

Isatis'den elde edilen doğal mavi boyanın ve sentetik indigonun genotoksik etkisi üzerine de çalışmalar yapılmış olup, Dominici vd. (2010), *Indigofera tinctoria*'dan elde edilen doğal indigonun suda ve Di Metil Sülfoksit (DMSO)'de çözünmesi ile oluşan iki solüsyonun sitotoksik etkisini araştırmışlardır. İki solüsyonun da genotoksik etkisinin %10'un altında olduğunu tesbit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre indigonun hem sitotoksik hem de genotoksik etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Kim vd. (2007), ratlarda oluşturdukları tümör modelinde indirubinin bir bileşeni olan indirubin-5-nitro-3-monoxime'in kolon, göğüs, mide ve akciğer gibi çeşitli tümörleri önleyici etkisinin olduğunu ratlarda oluşturdukları tümör modeli üzerinde ispatlamışlardır.

Kameswaran (2009), yaptığı çalışma ile indirubinin ticari analogu olan indirubin-3 oxime'in antikanser etkisini insanda gırtlak kanserini oluşturan tümörlü hücrelere

karşı denemiş ve indirubin-3-oxim'in hücre ölümünü ve apoptosisi teşvik ettiğini saptamışlardır.

Kannan vd. (2010), *Wrightia tinctoria*'nın dermatofik ve dermatofik olmayan mantarlara karşı umut verici bir aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Kloroform yardımı ile elde edilen ekstraktın 0.5/ml olacak şekilde *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* ve *Scopulariopsis brevicaulis* suşlarına karşı aktivite gösterdiğinin saptamışlardır. Etken maddeler arasındaki en önemli bileşik olarak indirubin olduğunu belirtmişlerdir. İndirubin'in antifungal aktivite gösterdiğini ve dermatofit bakterilere karşı kullanılabileceğini tespit etmişlerdir.

Husuan vd. (2009), yaptıkları diğer bir çalışmada in vitro'da *I.indigotica*'nın insan ilik hücresi (HL-60) ve Swine pseudorabies virüsüne (PrV) karşı etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucu indirubinin PrV virüsüne karşı inhibitör aktivitesi, HL-60 hücrelerine karşı da çok yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

You vd. (2009), beyin ve boyun kanseri olan hastalara radyoterapi sonrası *I.indigotica*'nın köklerinden elde ettikleri ekstraktı uygulamışlar ve çalışma sonucunda *Isatis* kökünün kontrol grubuna göre tedavinin radyasyona bağlı yan etkilerini ciddi oranda azalttığını tespit etmişlerdir. Hemogloblin düzeyi üzerinde ise etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Kim vd. (2007), indirubin türevi olan glukobrassin ve neoglukobrassin'in insan tümör kitlesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemede etkili olduğunu saptamışlardır.

Williams vd. (2011), indirubini beyin tümörü olan hastalara uygulamışlar ve indirubinin beyin tümör hücrelerinde Glikojen (GSK-3) sentezini engelleyerek beyin tümörlerinin önüne geçtiğini iv vivo ve in vitro olarak saptamışlardır. İndirubin' in

sadece GSK-3 sentezini engellemekle kalmadığını aynı zaman da diğer hücreleri sararak koruma altına aldıklarını gözlemlemişlerdir.

Bacani vd. (2011), çivit otunun mutajenik aktivitesinin fareler üzerinde yaptıkları çalışmada doza ve uygulama süresine bağlı olduğunu saptamışlardır. Hazırladıkları isatin dozlarını (50, 100, 150 mg/kg) farelere besin yolu ile vermişler ve dozların komet ve mikronükleus testi yaparak mutajenik etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Dozları ikinci kez tekrar uyguladıklarında yalnız en yüksek doz olan 150 mg/kg dozu DNA'nın yapısında daha fazla hasar meydana getirip mikronükleus oluşumunu tetiklemiştir.

Calvo vd. (2011), *Indigofera truxillensis* ve *I.suffruticosa* ekstraktlarını metanol ile çözüp salmonella suşlarının TA100, TA98, TA102 ve TA97 ırklarına karşı mutajenik özelliğini tesbit etmişlerdir. *Indigofera truxillensis*'in metanolik ekstraktının T98 suşuna S9 (fare karaciğeri) yok iken mutajenik aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Gai vd. (2015), kök hücre kültürü ile yetiştirilmiş üç haftalık *Isatis tinctoria* fidelerinin köklerini %80' lik etanol ile ekstrakte ederek, bitkinin yapısındaki flavonoid miktarını HPLC ile ölçmüşler ve toplam flavonoid miktarını 438,10 µg/g olarak tespit etmişlerdir.

Galleti vd. (2015), İtalya' da farklı bölgelerde yetiştirdikleri *Isatis canescens* türünün glukobrassisin, toplam fenol ve flavonoid miktarlarını incelemişlerdir. Kuru herbada toplam fenol miktarının ortalama 22–27 mg GAE/g arası olduğunu flavonoid miktarının ise 5–8 mg/g kateşin eşdeğeri olduğunu, bölgeler arasında fenol ve flavonoid içeriği yönünden önemli farklar kaydedildiğini bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar penisilin, streptomisin (Biological Industries, İsrail), DMEM (Sigma Aldrich, Amerika), etidyum bromür (EtBr) (Merck, Amerika), FBS (Biochrom, Berlin), immünositokimya boyama kiti (Invitrogen, Amerika), 1xPBS (PAN Biotech, Almanya), MTT kiti (Cyman Chemical, Amerika), Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, Amerika), DMSO (Merck, Amerika), tripan blue (Roche, Amerika), Nf-kB transkripsiyon faktörü (Cell Signalling, Amerika), Metanol (Merck, Germany), Hekzan (Sigma Aldrich, USA) dir.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

10X TBE tamponu hazırlanışı: Borik asit 55 g (Scharlau, İspanya), EDTA 9,37 g (Merck, Almanya), Tris 108 g (Amresco, Amerika) 1000 ml distile suda bekletip tamamen çözülerek pH 8,4'e ayarlanır. Bu karışım otoklavlanarak +4 °C'de saklanmıştır.

Dondurucu medium hazırlanışı: FBS 5 ml (Biochrom, Berlin), DMEM 40 ml (Sigma Aldrich, Amerika), DMSO 5 ml (Merck, Amerika) hazırlanarak -80 °C'de saklanmıştır.

DMEM besiyeri hazırlanışı: FBS %10 (Biochrom, Berlin), Penisilin-Streptomisin %1 (Biological Industries, İsrail), L-glutamin %1 (ThermoScientific, Amerika) hazırlanarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

24 kuyucuklu plate (Sigma Aldrich, USA), 96 kuyucuklu plate (Sigma Aldrich, USA), ependorf tüp (ISO Lab, Almanya), kroviyal tüp (ISO Lab, Almanya), falkon tüp (ISO Lab, Almanya), pasteur cam pipet (ISO Lab, Almanya), yuvarlak lamel (ISO Lab, Almanya) ,25' lik flask (Greiner Bio-One, Almanya), Thoma lamı (Optik Labor, Almanya)

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (Thermo Scientific, USA), invert mikroskop (Nicon Eclipse, USA), yatay elektrofotez sistemi (Cleaver, İngiltere), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), -80° saklama dolabı (Thermo Scientific, USA) santrifüj (Hettich, Almanya), -20° saklama dolabı (Vestel, Türkiye), soxlet cihazı (Gerhardt EV14, Almanya), pasteur pipet silahı (Capp Aid, Danimarka), hassas terazi (Precissa, İsviçre), CO₂ inkübatörü (Heal Force, Avusturalya), rotary evaporatör (Heidolph Herzbad HB Digit, Almanya), UV cihazı (DNR-IS, İsrail), otomatik pipet (Eppendorf, Almanya), steril kabin (Thermo Scientific, USA)

3.2 Metod

3.2.1 *I.tinctoria* L.'nin Temini

Gaziantep, İslahiye, Huzurlu yaylası, hamo tepesi etekleri 36° 58' 52", 50 K-36° 28' 45, 87' D enlem ve boylamında 1551 rakımda bitki 14 Haziran 2016 tarihinde Flora of Turkey and the East Aegean Island v:1'e göre Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Arş. Gör. Fatih Yayla tarafından bitkinin teşhisi yapılmıştır. Bitki bir bütün olarak (kök, gövde, yapraklar ve çiçek) yaş olarak toplanıp gölgede güneş görmeyecek şekilde herbaryum tekniklerine göre kurutulmuştur. Bu kurutulmuş olan bitkinin yeşil renkli yaprakları kullanılmıştır.

3.2.2 *I.tinctoria* L.'nin Özütünün Elde Edilmesi

1. Kurutulmuş olan *I.tinctoria*'nın yeşil yapraklarını alıp elimizle oldukça küçük parçalara ayrıldı (Farusi, 2007).

2. Bunzen beki üzerinde beherin 2/3 nü damıtılmış su ile doldurup kaynamaya bırakıldı. Kaynayan suyun içine parçalamış olduğumuz yapraklar ilave edildi. Bu işlem *I.tinctoria*'nın elimizdeki yaprakları bitene kadar devam edildi (Farusi, 2007).
3. Bütün yapraklar eklendikten sonra 1 dk kadar daha kaynatıldı (Farusi, 2007).
4. Yaprakları temiz bir behere aldıktan sonra süzme işlemi yapıldı. Karışımın olduğu beheri soğuması için daha geniş bir kabın içine su konulup beher oturtuldu. Bu işlem esnasında karışımın daha hızlı soğuması için beherin içindeki karışım karıştırıldı. Bütün bu işlemlerin sonucunda isatan b içeren bir çözelti elde edilmiş oldu. Aynı zamanda İsatan-b indoksilin kararsız bir bileşiktir (Farusi, 2007).
5. Özütümüz soğuyunca hacmini ölçüp hacminin %1' kadar amonyak ilave edildi. Amonyak eklendikten sonra çözeltinin rengi önce kahverengiden yeşil kahveye daha sonra da çözeltinin rengi yeşile döndü. Amonyacı ilave ettikten sonra indoksil içeren bir çözelti elde edildi (Farusi, 2007)

3.2.3 Hücre Kültürü

Çalışmamızda akciğer kanser hücre hatları H1299 kullanılmıştır. Hücre soyları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyesi Prof. Dr. Engin ULUKAYA'dan temin edilmiştir. Temin edilen hücre soyları kullanılacağı zamana kadar kriyovial tüpler içerisinde -80°C dolapta saklanmıştır.

3.2.4 Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

İlaç geliştirme, toksik ajanların belirlenmesi, antikanser ilaçlarının toksisitesini belirlemek, farmakolojide, biyouyumlulukta, implantlar ve kozmetikte kullanılır.

3.2.5 Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Krioviyalleri -80°C'den alınan sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözerek hücreler çoğaltılmıştır. Bu hücreler krioviyallerde dibe çökmeden; %10 FBS (fetal bovin serum) (Biochrom, Berlin), %1 Penisilin-Streptomisin (Biological Industries,

İsrail) ve %1 L-glutamin (Thermo Scientific, Amerika) içeren 5ml DMEM- Ham's F12 (1:1) 38 (Sigma Aldrich, Amerika) besileri içerisine alınmıştır. Hücrelerin süspansiyon haline gelmesi için 800 rpm'de 5dk santrifüj edilip süpernatant kısım aspire edilmiş ve dipte kalan hücre peleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılması için falkon tüplerin üzerine 4 ml besiyeri ilave edilip ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25 cm'lik flasklar (Thermo Scientific, Amerika) içerisine alınmıştır (Cevatemre, 2012).

3.2.6 Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması

Çoğaltılmış olan hücre soyları yeterli seviyeye %60-70 ulaştıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilmiştir. 25 cm'lik flask içerisine 2 ml 1XPBS (PAN Biotech, Almanya) eklenerek hücrelerin serumdan ayırıştırılması için hücrelerin yüzeylerinin hafif bir şekilde yıkanması sağlanmıştır. Flask içerisine yapışan hücreleri PBS ile ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmalrı için 0.5ml %0,05 Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, Amerika) solüsyonu kullanılarak 5 dakika %5 CO₂ 'li ortamda ve 37°C'de, hücrelerin inkübasyonu sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrıldığını kontrol etmek için mikroskop ile incelenir. Hücreler yüzeyden ayrılmış ise tripsinin inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilavesi yapılmış ve tamamen hücrelerin ayrışması sağlanmıştır. Böylece tripsinin yüzeyden ayırdıktan sonra hücrelerin parçalanmadan hücre zarlarına zarar vermesi engellenmiştir. İçerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alınan Flask içerisindeki hücre süspansiyonu 5dk 800 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım pipetle uzaklaştırılmış ve elde edilen hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözündükten sonra üzerine 9 ml besiyeri ilave edilmiştir. Hücre soyları 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakmak için elde edilmiş olan 10ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm'lik flaslara alınmıştır. Hücrelerin istenilen rakamlara gelene kadar bu işlemler tekrar edilerek çoğaltılmaları sağlanmıştır (Cevatemre, 2012).

3.2.7 Hücre Soylarının Stoklanması

Besiyerinin ortamdan uzaklaştırmak için hücrelerin flask yüzeyini tamamen kaplamaları beklenmiştir. Flask yüzeyine tutunmuş olan hücreler 1XPBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS ile aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, Amerika) solüsyonu eklenerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlanmıştır. Hücreler 5 dakika boyunca 37°C’de, %5 CO₂ ’li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere mikroskopla incelenmiştir. Tripsinin inhibe edilmesi için flaskların içine en az iki katı kadar besiyeri ilave edilmiştir. 15 ml’lik falkon tüp içerisine alınan flask içerisindeki hücre besileri süspansiyonu 5dk boyunca 800 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra falkonların içerisindeki süpernatant kısım aspire edilmiş ve pelet üzerine her bir kriyovial için 1,5 ml dondurucu medium (5ml DMSO+5ml FBS+40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak azot tankına kaldırılmıştır (Cevatemre, 2012).

3.2.8 Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

H1299 akciğer kanseri hücre hatları ve HUVEC hücre hattı çalışmamızda kullanılmıştır. %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin (Thermo Scientific, Amerika) içeren 5ml DMEM: Ham’s F12 (Sigma Aldrich, Amerika) besiyeri içerisine hücre süspansiyonları alınmıştır (Cevatemre, 2012).

3.2.9 Hemasitometre ile Hücrelerin Sayımı

20 µl 0,5 ml’lik tüpe alınan ve üzerine eşit miktarda %0,5’lik tripan mavisi (Roche, Amerika) konularak iyice homojen dağılması sağlanan süspansiyonu tripsinizasyon işleminden sonra hemasitometre ile hücre sayımı yapılmıştır. Hematositometre distile su ile iyice temizlenmiştir. Hücre sayımı için bu karışımdan thoma lamına üzerine 12 µl alınarak mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapılmıştır. 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplamak için bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılmıştır (Cevatemre, 2012).

3.2.10 MTT (Metiltiyazoltetrazolium) Canlılık Metodu Amaç:

Sitotoksitesiyi ölçmek

Metabolik aktiviteyi göstermek

Sitostatik aktiveyi ölçmek

3.2.11 MTT Yöntemi

1983 yılında ilk kez Mosmann vd., tarafından MTT yöntemi belirlenmiş. MTT yöntemi hücre kültüründe büyütülüp çoğaltılan hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ve kantitatif ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossman, 1983).

MTT analizinde formazon boyalarının ve enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalmasının miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. terapötik ajanların hücre üzerindeki sitotoksik etkisi ve çoğalmayı tetileyici etkileri bu yöntemle belirlenebilmektedir. Canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri bu metot için kullanılan temel parametridir. MTT'nin tetrazolium halkasının parçalanması esasına dayanmaktadır. Bu metotta, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavimor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Sadece aktif mitokondrinin içinde bulunduğu canlı hücrelerde formazan oluşumu, görülmektedir. Formazan oluşumu hücre canlılığının bir bulgusu olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen absorbans değerleri kristallerin çözünmesiyle oluşan canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Denizot ve Lang, 1986; McGahon vd. 1995; Horakova vd. 2001). Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu metotla sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenir (Doyle ve Griffiths, 1998). MTT yönteminin çalışması için ticari olarak satın alınan mtt kitin kullanım şekli esas alınmıştır.

Bu enzimin aktivitesi canlı hücrelerde görülürken, ölen hücrelerde ise aktivite gözlenmemektedir. Enzim aktivitesinin azaldığını veya kaybolduğunu anlamanın

yolu hücrelerin canlı olup olmamasıdır. Bu nedenle hücreler mitokondriyal dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT kimyasalına (Tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Formazan kristallerinin oluşum bölgesi ve indirgenme olayının olduğu bölge mitokondri olduğu kabul edilmektedir (Cevatemre, 2012).

Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri işlevi bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri işlevi bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristallerini 570'nin dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapmak için Kristal dissolving ya da SDS gibi deterjanlar kullanılarak suda çözünür hale getirilerek oluşturdukları renk göz önünde bulundurularak ölçülmektedir. Sonuç olarak; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş ve hiç özüt uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk sertliği ile özüte maruz bırakılmış hücrelerdeki renk sertliği oranlanarak özüte maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmaktadır (Cevatemre, 2012).

Hücre kültür kaplarının ortalama %80'ini kapladığı zaman aynı pasaj sayısına sahip olan HUVEC ve H1299 hücrelerinden besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin birbirinden ve tabandan ayrışması için Tripsin-EDTA karışımı kullanılmıştır. Daha sonra HUVEC ve H1299 hücreleri sayılarak 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 24 saat 37 °C, %5 CO₂ 'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 5 (6,25-12,5-25-50-100) farklı dozda 100 µl *I.tinctoria*.özütü üçer tekrarlı olarak uygulanan hücreler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol amaçlı olarak kit içeriğindeki kör, %2,5'luk metanol, maksimum inhibisyon (MI) için TritonX100 ve özüt uygulanmayan sadece hücre içeren kuyucuk şeklinde kontrol kuyucukları üçer tekrarlı olarak oluşturulmuştur. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklara 10µl MTT solüsyonu ilave edilerek karanlıkta 37 °C, %5 CO₂ 'li ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. MTT solüsyonuna maruz bıraktığımız hücrelerde formazan kristalleri 43 görüntüsü meydana gelmiş ve oluşan formazan kristalleri Cristal Dissolving çözeltisi yardımıyla çözüldükten sonra

oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre (Thermo Scientific, Amerika) ile 570’nm dalga boyunda ölçölmüştür. Okunan absorbans değerleri kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir.

3.2.12 İştatistiksel Analiz % Canlılık Hesabı

Özüť uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, özüť uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formöl kullanılarak hesaplanmıştır. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlanmıştır.

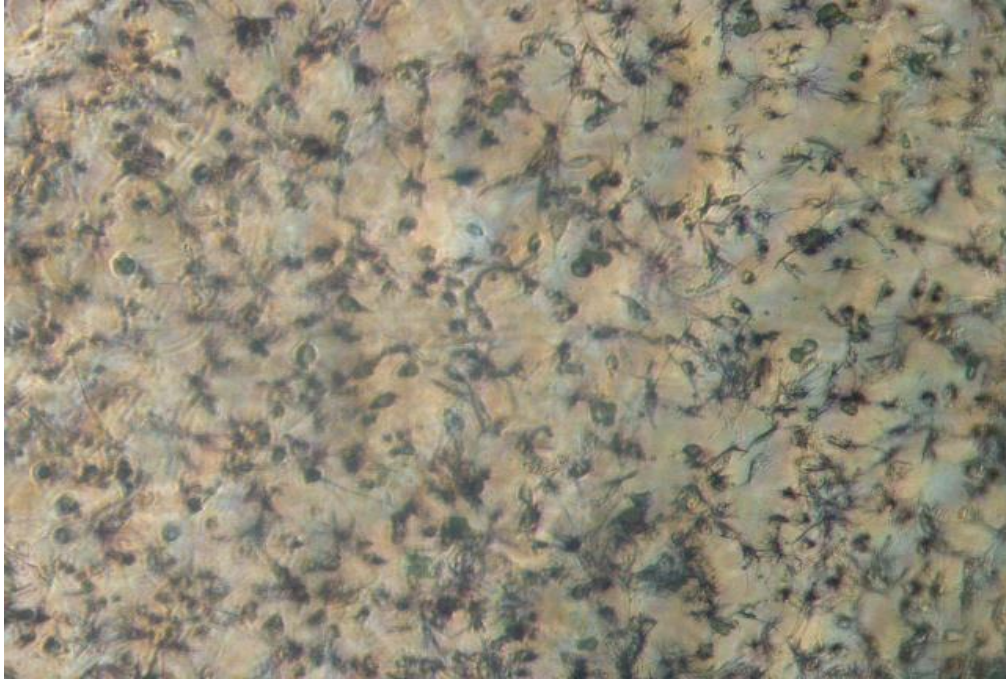
$$\%Canlılık = [100 \times (\text{Bileřik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} / \text{Özüť uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı})] \text{ (Cevatemre, 2012).}$$

BÖLÜM 4

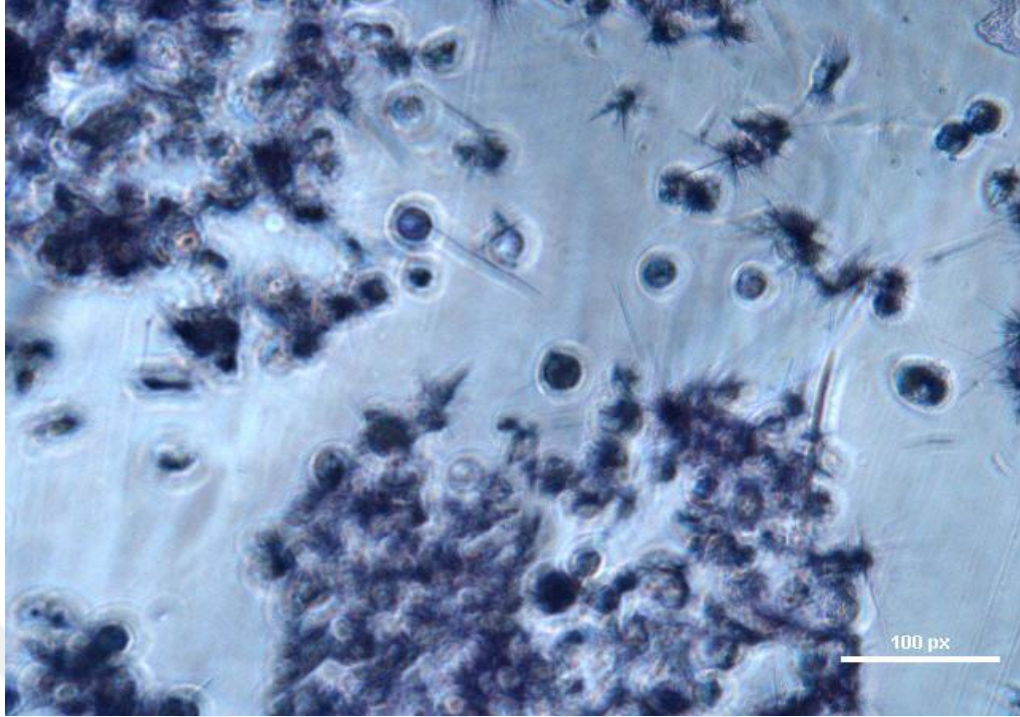
BULGULAR

4.1 Sitotoksik Aktivite Bulguları

Huvec ve H1299 hücre hatlarında *I. tinctoria* özütünün uygulanmasıya sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromit) canlılık testinin formazan kristalleri görüntüsü Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' verilmiştir.



Şekil 4.1: HUVEC Hücre Hattında MTT Sonrası Formazan Kristalleri (100X)



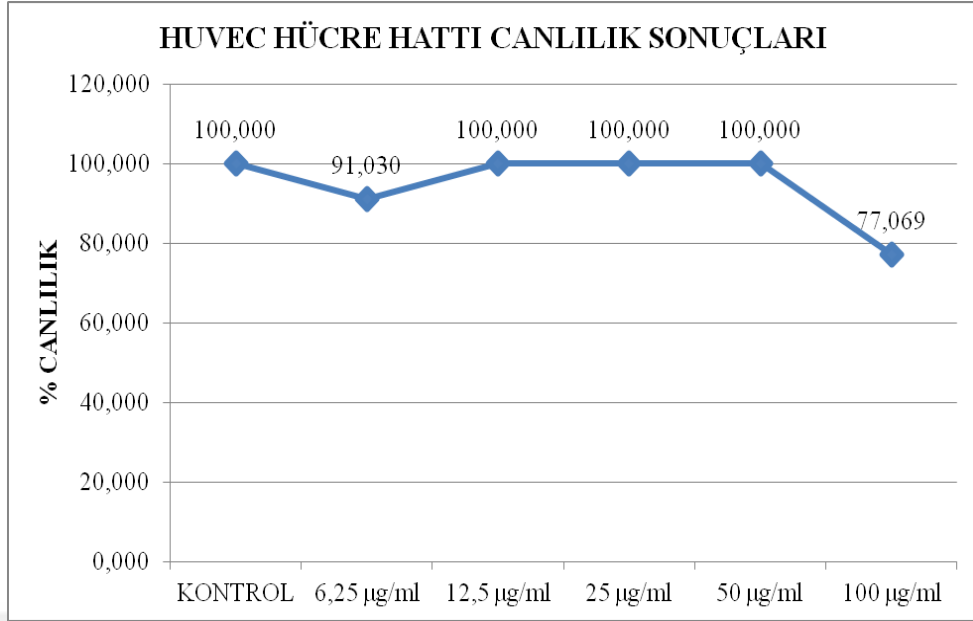
Şekil 4.2: H1299 Hücre Hattında MTT Sonrası Formazan Kristalleri (40X)

Sadece aktif mitokondrinin içinde bulunduğu canlı hücrelerde formazan oluşumu, görülmektedir. Formazan oluşumu hücre canlılığının bir bulgusu olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen absorbans değerleri kristallerin çözünmesiyle oluşan canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Formazan kristallerinin çok olması hücrelerin canlılığının çok olmasıyla ilgilidir (Denizot ve Lang, 1986; McGahon vd. 1995; Horakova vd. 2001).

$$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} / \text{Özüt uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı})] \text{ (Cevatemre, 2012).}$$

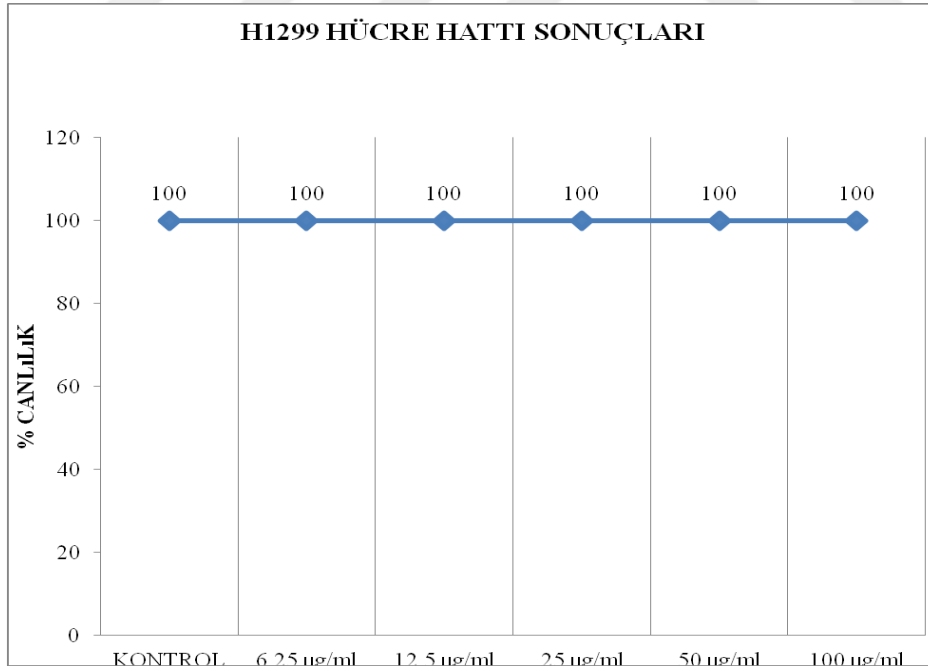
Tablolardaki % canlılık ortalamaları yukarıdaki hesaplama yöntemi baz alınarak hesaplanmıştır.

HUVEC ve H1299 hücre hatları üzerine uyguanan *I. tinctoria* özütünün sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde üç kuyucuğun istatistiksel analizi yapılarak elde edilen sonuçlara göre % canlılık grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.3 ve 4.4).



Şekil 4.3: HUVEC Hücre Hattında *I. tinctoria* L.' nin % Canlılık Grafiği

*Her Bir Veri Noktası 3 Bağımsız Kuyunun Ortalamasını Temsil Etmektedir.



Şekil 4.4: H1299 Hücre Hattında *I. tinctoria* L.' nin % Canlılık Grafiği

I. tinctoria L. özütünün HUVEC hücre hattındaki canlılık oranlarının tüm konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermediği gözlemlenmiştir. H1299 akciğer kanseri hücre hattında da beş farklı konsantrasyonda sitotoksik etki göstermediği gözlemlenmiştir.



BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüz dünyasında dünyanın her yerinde insanların sağlıklı yaşam konusunda şimdiye kadar görülmeeyen oranda ilgili ve bilinçli olduğu ve bu ilginin her geçen gün arttığı görölmektedir. Son zamanlarda “Yeşil Devrim” olarak kabul edilen doğaya dönüş hareketinin özünde bitkiler önemli bir alan oluşturmaktadır. Bu dönüşümün sonucu olarak bitkisel kökenli preparatların kullanımı ve ticareti önemli paylar almaya başlamıştır. İnsanlar bitkisel kökenli gıdaları, ilaçları, kozmetik ürünleri gibi tükettiğı ve kullandığı ürünlerin sentetiklerine oranla doğal kökenli olmasını tercih etmektedirler. Bunun sonucu olarak son zamanlarda bitkiler başta ilaç sanayi olmak üzere, parfüm, kozmetik, sabun, gıda ve tekstilde boya maddesi gibi daha birçok sanayi kolunun önemli hammaddesini oluşturmaya başlamıştır (Yeşilada, 2007).

Bitkinin ne amaçla kullanılacağı; geleneksel kullanımı, yapılmış bilimsel araştırmalar, taşıdığı bileşiklere bağlıdır. Çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle birlikte kanser son yıllarda çok fazla rastlanılan bir hastalıktır, günümüzde de ölüm nedeni olarak ilk sırada yer almaktadır. Bundan dolayı araştırmacılar tarafından kanser hastalığı için pek çok çalışma yapılmakta ve özellikle kanser hücreleri için sitotoksik aktivitesi olan terapötik ajanlar üzerinde durulmaktadır. Araştırmacıları doğal tedavi edici ajanlara yönelmesinin nedeni kemoterapötik ilaçların toksisitesinin fazla olması. Bu durum göz önüne bulundurularak çalışmamızda, tarihte uzun yıllar boyunca geleneksel tedavi yöntemlerinde sıklıkla kullanılan ve literatürde farklı farmakolojik etkileri çalışılmış (Takeda vd., 1999; Mansoor vd., 2000; Deliorman vd., 2002; Küpeli vd., 2004, Sezik vd., 2004; Aslan vd., 2011; Singh vd., 2012; Şenol vd., 2012; Yalçın vd., 2012) olan *I. tinctoria* L. tercih edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında *I. tinctoria* bitkisinden alınan doğal özütün sitotoksik aktivitesinin değerlendirildiğı çalışmalardan bazılarında farklı kanser hatları üzerinde etkileri incelenmiştir. Doğal indigonun sitotoksik olup antikanserojenik etkisini gösteren çalışmalar arasında (Marko vd., (2001); (Meijer vd., 2006); Kim vd., (2007); Kameswaran (2009); Husuan vd., (2009); You vd., (2009); Williams vd., (2011) gösterilebilir. Bunun dışında çalışmamız *I. tinctoria* L. özütünün sitotoksik aktivitesiyle ilgili yeni veriler sunmaktadır.

Çivit boyası elde edilen *I. tinctoria* yaprakları kullanılarak solunum yolu enfeksiyonu ve gastroenterie karşı tedavi amaçlı kullanıldığını aynı çalışmada köklerinden elde edilen ekstraktların ise antiviral, antibakteriyel ve antiparaziter etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Benske, 1986). Bir diğer araştırmada antikanser ve antiinflamasyon etkilerinin olduğu, 1,000mg/kg dozun ise burun akıntısı, ishal ve trombositopeni gibi yan etkilerinin ortaya çıktığı rapor edilmiştir. (Mingzhu, 1983). 1980’li yıllarda medikal anlamda yukarıda belirtilen yönde sonuçlar bildirilmesi ile birlikte 2000’li yıllarda karaciğerde antioksidan aktiviteyi artırması, antiproliferatif etki, antioksidan potansiyelleri, antifungal etki epilepsiye iyi gelmesi, antihelminetik aktivitesi, oral hastalıklara ve deri hastalıklarına karşı indigo boya kaynağı bitkilerinin etkili olduğuna yönelik birçok araştırma yapılmıştır (Thiruvanmiyoo vd., 2008, Asuntha, 2010, Hadissa 2006, Nagajaran 2013).

Daha önce yapılan bir takım çalışmalarda sitotoksite çalışmalarının olumlu olması bu bitkinin antikanser aktivite bakımından olumlu veriler alınabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bundan hareketle bitkinin özütü elde edilerek bu özütün biyolojik aktivitesini ortaya çıkaran çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın sonucunda da yapılan bazı diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir Dominici vd. (2010); Hesbert vd. (1984).

Gaziantep ilinin İslahiye ilçesinde Huzurlu Yaylasının Hamo tepesi eteklerinden topladığımız *I. tinctoria* L. bitkisinin özütünden doğal bir boya elde ederek çalışmamızda HUVEC ve H1299 akciğer kanseri hücre hattında sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmadır. Dolayısıyla doğal olarak elde edilen boyanın antikanserojenik etkisinin incelendiği diğer hücre hatlarından farklı olarak H1299 akciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmalar sonucunda *I. tinctoria* yaprak özütünün HUVEC ve H1299 hücre hatlarında sitotoksik etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Doğal olarak elde edilen özütün gıda maddesi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Sentetik olarak kullanılan çivitin yaygın olarak tekstil sektöründe kullanımı göze çarparken gıda boyası olarak kullanımına pek rastlanılmamıştır. Ancak hayalet şeker olarak adlandırılan Mardin mavi bademin üretiminde kullanılmaktadır. Bu şekerin tüketimi ülkemizde yaygındır. Badem şekerine renk veren maddenin sentetik çivit olduğu düşünülmektedir. Mardin’deki esnafla yapılan görüşmelerde Mardin mavi

madem şekerine renk veren maddenin kök boya olduğu iddia edilmekte veya zannedilmektedir. Mavi badem şekeri hem yerel halk tarafından hem de ülkemize gelen yabancı turistler tarafından oldukça ilgi görmektedir. Dolayısıyla sentetik çivitin sitotoksik etkisi nedeniyle gıda boyası olarak kullanımı riskli olup bunun yerine çivit otundan elde edilen bitkisel kökenli olanların kullanımının sağlık açısından daha iyi olabileceği düşüncesidir. Sonuç olarak sentetik olarak kullanılan çivitin yerine doğal olan bitki özütünün kullanılması yaptığımız araştırmaya göre daha uygun olacağı kanatindeyiz. Çünkü sentetik olan çivitin çok küçük dozların bile gıda boyası olarak kullanım durumunun insan sağlığı açısından olası risklerin araştırılması gerektiği ortadadır. Dolayısıyla kontrolsüz ve rastgele gıda üreticilerinin özellikle Mardin badem şekeri üreticilerinin kullanmasının sağlık açısından riskler taşıdığını düşünmekteyiz.

Sentetik çivit boyasının insan sağlığı üzerine olası zararlı etkileri daha ileri analizlerle saptanmalıdır. Bizim araştırmamız bu konuda ileriki çalışmalar için temel veriler sunması açısından önem taşımaktadır. Mutlaka gıda boyası olarak kullanılması gerekiyor ise kullanılan miktarın insan sağlığına zarar vermeyecek düzeylere indirgenmesi gerekmektedir. Aksi taktir de kullanılmamalıdır.

KAYNAKLAR

- Akçalı, A. (2010). Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi* **25** (3), 119-123.
- Alberg, A.J., Samet, J.M. (2003). Epidemiology Of Lung Cancer, *Chest*, **123**, 21-49.
- Altunkaynak BZ. (2008). “Programlanmış Hücre Ölümü, Apoptoz nedir?”, *Tıp Araştırmaları Dergisi*. **6**, 93-104.
- Alberg, A.J., Samet, J.M., (2003). Epidemiology Of Lung Cancer. *Chest Journal*. **123**, 130-160.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K. (2004). Manipulating genes and cells. In: Essential cell biology. 2nd ed. New York: GS Garland Science, Taylor& Francis Group; :323-7.
- Ali, S., Nisar, N. ve Hussain, T. (2007). Dyeing properties of natural dyes extracted from eucalyptus. *TJTI*. **98**, 559-562.
- Anonim. (1991). Bitkilerden Elde Edilen Boyalarla Yün Liflerin Boyanması. TC. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Küçük Sanatlar ve Sanayi Bölgeleri ve Siteleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Asuntha, N. (2010) Antioxdant and free radical scavenging potential of different solvent Extracts of *Indigofera tinctoria* l. Leaves international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences issn- 0975-1491 vol 5, issue 1,
- Arlı, M. (1982). Doğal Bitkisel Boyalarla Boyama Yöntemi Üzerinde Düşünceler, II. Uluslararası El Sanatları Sempozyumunda sunuldu.
- Aslan, M., Deliorman, O., Orhan, N. (2011). Effect Of Gentiana Olivieri on experimental epilepsy models. *Pharmacogn Mag*. **7**,344-349.
- Babaoğlu, E. ve Öz, F. (2003). “Terminal dönem kanser hastasına bakım veren eşlerin Duygusal ve Sosyal Sorunları Arasındaki İlişki”, *Hemşirelikte Araştırma Geliştirme Dergisi*. **5**, 24-33

Bacani, P. M. C., Reis M.B., Serpeloni, J.M., Calvo, T. R., Vilegas, W., Varanda, E.A., Colus, I. M. S., (2011). Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells in vivo., 47–51.

Bayram H. (2013). Göğüs Hastalıklarında In Vitro Araştırma Yöntemleri, Türk Toraks Derg . 14, 20-26.

Baytop, T. (1984). Çiçiotu (*Isatis tinctoria*), Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayinevi, İstanbul.

Beliveau R., Gingras D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. Can Fam Physician. 53, 1905–1911.

Benske D, Gamble A. (1986). *Chinese Herbal Medicine Materia Medica*. Seattle, WA: Eastland Press;

Bilello, K.S., Murin, S., Matthey, R.A. (2002). Epidemiology, Etiology, And Prevention Of Lung Cancer. *Clin Chest Med.* **23**, 1-25.

Buchanan, J. (1987) *American Economic Review*, vol. 77, issue **3**, 243-50

Burns, S. (1995). Natural Dye Crops Show UK Potential, Farmers Weekly 30 June.

Calvo, T.R., Cardosa, C.R.P., Moura, A.C.S., Santos, L.C., Colus,I.M.S., Vilegas, W., ve Varanda, E.A., (2011). Mutagenic Activity of *Indigofera truxiensis* ana *I.suffruticosa* Aerial Parts.

Cardon, D. (2007). Natural Dyes-Sources, Tradition, Technology And Science, *Archetype Publications Ltd*, London.

Cevatemre, B. (2012). Fenretinid ve İndol-3-Karbinol Kombinasyonunun Meme Kanseri Hücre Soyları Üzerindeki Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Uludağ Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Bursa.

Churg, A. (1988). Pathology Of The Lung. In: Thurlbeck W M (Ed). *Tumors Of Lung. Theime Medical Publishers*. New York, 1. Ed. Pp, 311-423.

Condursa, C., Verzera, A., Romeo, V., Zııno., M., Trozzi, A. Ve Ragusa, S. (2006).The leaf volatile constituents of *Isatis tinctoria* by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry.Plant Medica, **72**: 924-928.

Coşkunpınar, E. (2013). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında RRM1, RRM2 ve ERCC2 gen polimorfizmleri ve serum 8-OHG ve LDH düzeylerinin hastalığın riski ve prognozu üzerine etkilerinin araştırılması. (Doktora tezi), İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Çelik, İ. (2001). “Akciğer Kanserinde Epidemiyoloji. In: Engin K, Özyardımcı N; eds. Akciğer Kanseri”, *Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti.**7**, 50-56.

Danz, .H., Stoyanova, S., Wippich, P. (2001), Identification and isolation of the cyclooxygenase-2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria*. Planta Med, **67**, 411-416.

Davis, P. H. (1965). Flora Of Turkey And The East Aegean Islands. I-IX, University Press, Edinburgh.

Delammare, F., Guineau, B., (2007). Renkler ve Malzemeleri. (Çev. O. T ürkay). Yapı Kredi Kültür Sanat Yayıncılık, Ankara.

Deliorman, D., Aktay, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Ergun, E., Ergun, F. (2002). Subakut Uygulama ile G.olivieri ‘nin Hepatoprotektif Etkisi ve Aktif Bileşeni. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler.

Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid Colorimetric Asay For Celgrowth And Survival: Modifications To The Tetrazolium Dye Procedure Giving İmproved Sensitivity And Reliabilty. *Journal Of Immunological Methods*, **89**, 271-292.

Devereux, T.R., Risinger, J.I., Barrett, J.C. (1999) Mutations And Altered Expression Of The Human Cancer Genes: What They Tell Us About Causes. *IARC Scientific Publications*. **146**, 19-42.

Dominici, L., Cerbone, B., Villarini, M., Fatigoni, C., Moretti, M. (2010). In vitro testing for genotoxicity of indigo naturalis assessed by micronucleus test. 1039-42.

Doyle, A., Griffiths, JB. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley&Sons. 57, 62-64

Enez, N. (1987). *Doğal Boyamacılık Anadolu'da Yün Boyamacılığında Kullanılmış Olan Bitkiler ve Doğal Boyalarla Yün Boyamacılığı*, Fatih Yayınevi, İstanbul.

Erefe, İ. (1995). "We Can Prevent And Win Cancer". Ege University Copyright. İzmir.

Eyüboğlu., Okaygün I., Yaraş, F. (1983). *Doğal Boyalarla Yün Boyama Uygulamalı ve Geleneksel Yöntemler*, Ofset yapımevi, İstanbul.

Farusi, G. (2007). "Keşiflerin Mürekkebi: Kimyayla Tarihi Bağlayalım", *Science in School*. **6**, 36-40.

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. International journal of cancer, **127(12)**, 2893-2917.

Fidaner, C. ve Eser, S.Y. (2001). Parkin, D.M. Incidence in İzmir'in 1993-1994: First results from İzmir Cancer Registry. Eur J Cancer. **37**, 83-92.

Gai, Q-Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z-F., Zu, Y-G., Ma, W., Fu, Y-J., 2015. Establishment Of Hairy Root Cultures By Agrobacterium Rhizogenes Mediated Transformation Of Isatis tinctoria L. For The Efficient Production Of Flavonoids And Evaluation Of Antioxidant Activities. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0119022.

Galletti, S., Barillari, J., Jori, R. Ve Venturi, G. (2006). Glucobrassicin enhancement in woad (Isatis tinctoria) leaves by chemical and physical treatments. Journal of the Science of Food and Agriculture, **86**: 1833-1838.

Gilbert, K.G., Hill, D.J., Crespo, C., Mas, A., Lewis, M., Rudolph, B., Cooke, D.T., (2000). Qualitative analysis of indigo precursors from woad HPLC and HPLCMS. Phytochemical Analysis, **11**:18-20.

Guha N. (2009). Dietary flavonoids and the risk of breast cancer and childhood leukemia. Doctor Theses. California University, Berkeley.

- Hadissa, T.(2006). Jean-pierre Deschamps .Use of medicinal plants for the treatment of oral diseases in burkina faso journal of ethnopharmacology **104** (68–78)
- Halilçolar, H., Tatar, D., Ertuğrul, G., Çakan, A., Acıtaş, M.G., Kömürçüoğlu, B. (1999) Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C, eds.Akciğer kanseri; multidisipliner yaklaşım. First edition. Ankara, Toraks kitapları 1999; **1**: 17-22.
- Hann, C.L. Ve Rudin, C.M. (2008). Management Of Small-Cell Lung Cancer: Incremental Changes But Hope For The Future. *Oncology (WillistonPark)*. **22**, 1486-1492.
- Harmancıoğlu, M. (1955). Türkiye’de Bulunan Önemli Bitki Boyalarından Elde Olunan Renklerin Çeşitli Müessirlere Karşı Yün Üzerinde Haslık Dereceleri. Ankara.
- Hesbert A, Bottin Mc, De Ceaurriz J, Protois Jc, Cavelier C., (1984). Testing natural indigo for genotoxicity, 21(1):119-25,1984.
- Heynick, L.N. Johnston S.A. Mason P.A. (2003). Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis, and Genotoxicity. *Bioelectromagnetics*. **8**, 74-100.
- Hoessel, R., Leclerc, S., Endicott, J.A., Noble, Mem., Lawrie, A., Tunnah, P., Leost,M., (1999). Indirubin, The Active Constituent of Chinese Antileukemia Medicine, Inhibits Cylin-Dependent Kinase. *Nat.Cell Biol*, **1**, 60-67.
- Horakova, K., Sovcikova, A., Semanova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cel damage and its prevention by antioxidants. *Fre Radic BiolMed*. 30(**6**), 650-64.
- Husuan, S.L., Chang, S.C., Wang, S.Y., Liao, T.T., Chien, M.S., Lee, W.C., Chen,S.S., L.W.J., (2009). The Cytotoxicity to Leukemia Cells and Antiviral Effects of Isatis indigotica Exracts on Pseudorabies virus.*Journal of Enthnopharmacology*, **123**,61-67.
- İtil, O. (2000). Akciğer Kanserlerinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi. **7**, 15-34.

JAJTE, J., Zmyslony, M., Palus, J., Dziubaltowska, E., Rajkowska, E. (2001). Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50 Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. *Mutat Res.* **483**, 57-64.

Jones, E.E., Davis, K.E. (1965). Eylemlerden tutumlara, Kişiyeye Özel Atıf Süreci Algı, L., Berkowitz, (Ed.), Deneyisel sosyal psikolojideki gelişmeler, Cilt: **2**, 219-266.

Kaiser, L. (2002). Non-Small Cell Lung Cancer- Clinical Aspects, Diagnosis, Staging, And Treatment. In: Fishman Ap (Ed.). Fishman's Manual Of Pulmonary Disease And Disorders. 3th Ed. Philadelphia: McGraw Hill;; P.**615-42**.

Kaji, K., Nishimura, N., Seki, K., Sato, S., Saikawa, S., Nahanishi, K., Furukawa, M., Kawaranati, H., Kitade, M., Moriya, K., Namisaki, T., Yoshiji, H., (2017) DOI: 10.1002/ijc. 31193

Kameswaran ,TR., Ramanıbai,R., (2009). Indirubin-3-monooxime Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Hep-2-Human Laryngeal Carcinoma Cells. *Biomedicine&Pharmacotrasy*, 63, **2**, 146-154.

Kannan, P. Chelladurai P., Ramasamy M., Waheeta H., (2010). In vitro antifungal activity of indirubin isolated from a South Indianethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br.

Karadağ, R. (1997). Türk Halı, Kilim ve Kumaşlarında Kullanılan Doğal Boyarmaddeler, *Quarterly Magazine Of Carpet, Weaving & Embroidery Arts.* **1**, 3-38.

Karadağ, R. (2007). Doğal Boyamacılık, Geleneksel El Sanatları ve Mağazalar İşletme Müdürlüğü, Ankara..

Kayaalp, S.O. (1998). “Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar”, *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Cilt: 1, Feryal Matbaacılık, Ankara, 1007-1072.

Kim, S.A., Kim, C.Y., Kim, S.W., Lee, S.H., Min, J.J., Ahn, S.G., Yoon, J.H., (2007). Antitumor Activity of Novel Indirubin Derivatives in rat Tumor Model. *Cancer Therapy: Preclinical*, **13**, 253-259.

Kiyohara, C., Ohno, Y. (2010). Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gender medicine*, 7(5), 381-401.

Kligerman, S., White, C. (2011). Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening. *American Journal of Roentgenology*, 196(2), 287-295.

Korur, N.R. (1937). Türkiye’de Nebati Boyalar, Yüksek Ziraat Enstitüsü Basımevi. Ankara.

Köktürk, N., Yeğin, D., Çiftçi, T. U., Mullaoglu, B., ve Öztürk, C. (2004). Akciğer kanserlerinde epidemiyolojik özellikler yıllar içinde değişim gösteriyor mu. *Toraks Dergisi*, 5, 137-142.

Kreuzer, M., Heinrich, J., Kreienbrock, L., Rosario, AS., Gerken, M. (2002). Wichmann HE. Risk Factors For Lung Cancer Among Nonsmoking Women. *Int J Cancer*. **100**: 706-13.

Küpeli, E., Aslan, M., Gürbüz, I., Yeşilada, E.(2004). Evaluation of in vivo BiologicalActivity Profile Of Isoorientin. *Z. Naturforsch.* **59**, 787-790.

Leclerc, S., Garnier, M., Hoessel, R., Marko, D., Bibb, J.A., Snyder, G.L., Greengard, P., Biernat, J., Wu, Y.Z., Mandelkow, E.M., Eisenbrand, G. and Meijer, L. (2001) Indirubin Inhibit Glycogen synthase kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal tau Phosphorylation in Alzheimer’s Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 251-260.

Liau, B.C., Jong,T.T., Lee, M.R.,Chen,S.S. (2007). LC-APCI-MS Method for Detection and Analysis of Tryptanthrin, Indigo and Indirubin in Daqingye and Banlangen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**, 346-351.

Li F., Wang Y., Wang X., Li J., Cui H., Niu M. (2012). Ganoderic acids suppress growth and angiogenesis by modulating the nf-kappab signaling pathway in breast cancer cells. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **50**, 712-721.

Lin, I-L., Chou, H-L., Lee, J-C., Chen, F-W., Fong, Y., Chang, W-C., Huang, H-W., Wu, C-Y., Chang, W-T., David H-M., Chiu, C-C. (2014). The antiproliferative effect of C2-ceramide on lung cancer cells through apoptosis by inhibiting Akt and NFκB. *Cancer Cell International.* 14, 1.

Liu, S., Giaccone, G. (2013). Lung cancer in 2013: Refining standard practice and admitting uncertainty. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 11, 69–70

Liu, YT., Blumberg, JB., Chen, CYO. (2013). Quantification and Bioaccessibility of California Pistachio Bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 62 (7), 1550-1556.

Mansoor, A., Zaidi, M.I., Malghani, M.A.K. (2000). Isolation of bioactive alkaloids from *Gentiana olivieri* and its non-toxic effect. *Pakistan Journal of Botany.* **32**, 105-109.

Makro, D., Schatzie, S., Friedel, A., Genzlinger, A., Zanki, H., Meijer, L., Eisenbrand, G., (2001). Inhibition of Cyclin-Dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *British Journal of Cancer* 84,2, 283-289.

McGahon, AJ., Martin, SJ., Bissonnette, RP., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, RJ., Nishioka, WK., Green, DR. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro, Schwartz LM, Osborne BA (Ed.): *Methods in Cell Biology, Cell Death.* Academic Press. San Diego, Cilt **46**.s 150-181.

McMillan, S.C., Small, B.J., Weitzner, M. (2006). Impact of coping skills Intervention With Family Caregivers Of Hospice Patients With Cancer: *a Randomized Clinical Trial.* *Cancer.* **106**, 214-222.

Meijer, L., Shearer, J., Bettayeb, K., Ferrandin, Y., (2006). Diversity of intra cellular mechanisms Underlying the anti-tumor Properties of Indirubin, the Red shade of Indigo. Editors: Meijer, L., Guyard, N., Saltounis, L., Eisenbrand, G., Chapter **25**.

Metintaş, S. (2010) Akciğer kanseri epidemiyolojisi , İç: Özlü T, Metintaş M, Karadağ M, Kaya A. editörler. solunum sistemi ve hastalıkları, İstanbul Tıp Kitabevi; 1319-1337.

Mısırdalı, H., (1985), Doğu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinin Isatis L. Türleri Üzerinde Morfolojik ve Sitolojik Araştırmalar. Tübitak Bilimsel Araştırma Grubu, Proje No: TBAG-535, 139 s., Eskişehir.

Mingzhu, M., Bangyuan, Y(1983). Progress in indirubin treatment of myelocytic leukemia. *J Tradit Chin Med* 1983;3:245-248.

Mossman, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays. *Journal Of Immunological Methods*, **65**, 55-63.

Müsellim, B. (2007). Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi(**58**), 113-118.

Nagarajan, A., (2013). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent Extracts of *indigofera tinctoria* l. Leaves international journal of pharmacy and pharmaceutical sciences issn- 0975-1491 vol 5, issue 1.

Nagar, Kh., Sanad, S.H., Mohamed, A.S. ve Ramadan, A. (2005). Mechanical properties and stability to light exposure for dyed Egyptian cotton fabrics with natural and synthetic dyes. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 44, 1269-1279.

Osann, K.E. (1991). Lung Cancer In Women: The Importance Of Smoking, Family History Of Cancer, And Medical History Of Respiratory Disease. *Cancer Research*, **51**, 48-99.

Öz, F.(2001). Hastalık yaşantısında belirsizlik. *Türk Psikiyatri Dergisi*; 12: 61-68

Öztürk, İ. (1999). Doğal Bitkisel Boyalarla Yün Boyama, Dokuz Eylül yayınları, İzmir.

Park, HJ., Zhang, Y., Georgescu, SP., Johnson, KL., Kong, D., Galper, JB., (2006). Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular

Endothelial Cells Offer New Insights into the Relationship between Lipid Metabolism and Angiogenesis. *Stem Cell Rev*, **2**(2):93-102.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan. *Int J Cancer*. **94**, 153-6.

Pawlak, K., Puchalska, M., Miszczak, A., Rosłonec, E. ve Jarosz, M. (2006). Blue Natural Organic Dyestuffs–From Textile Dyeing To Mural Painting Separation And Characterization Of Coloring Matters Present In Elderberry, Logwood And Indigo, *Journal Of Mass Spectrometry*. **41**, 613-622.

Perez-Moreno, P., Brambilla, E., Thomas, R., Soria, J.C., (2012). Squamous Cell Carcinoma Of The Lung: Molecular Subtypes And Therapeutic Opportunities. *Clin Cancer Res*. **18**, 2443-51.

Piccaglia, R. and G. Venturi. (1998). Dye Plants: A Renewable Source of Natural Colours, *Agro Food Industry Hi-Tech*, pp, 27–30.

Pitceathly, C., Maguire, P. (2003). The Psychological Impact Of Cancer On Patients' Partners And Other Key Relatives: a Review. *Eur J Cancer*. **39**, 1517-1524

Rayet, B., Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, **18**(49), 6938-6947.

Rivera, M.P., Stover, D.E. (2008). Gender And Lung Cancer. *Clin Chest Med*. **25**, 391-400.

Robbins, K., (1995). Solunum Sistemi. 21th. İstanbul: Nobel & Yüce, 385-437.

Rous, P. (1911). A Sarcoma Of The Fowl Transmissible By An Agent Separable From The Tumor Cells. *J Exp Med*. **134**, 397-411.

Roy S. Herbst, M.D., Ph.D., John V. Heymach, M.D., Ph.D., and Scott M. Lippman, M.D., (2008). Molecular Origins of Cancer Lung Cancer. *N Engl J Med*. 359, 1367-80.

Sezik, E., Aslan, M., Yesilada, E., Ito, S. (2004). Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fraction at Singh A. (2008). *Phytochemicals of Gentianaceae: A review of*

Pharmacological Properties. International Journal of Pharmaceutical Sciences and nanotechnology 1, 33-36. ion techniques, Life Sciences. **76**, 1223–1238.

Sholl, L.M., (2012). Large-cell Carcinoma Of The Lung: a Diagnostic Category Redefined By Immunohistochemistry And Genomics. *Curr Opin Pulm Med.* **20**, 324–31.

Singh, S., C.P.S Y., Noolvi, MN. (2012). Immunomodulatory activity of butanol fraction of *Gentiana olivieri* Griseb. on Balb/C mice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 433-437.

Smith, R., Cokkinides, V., Brawley, O. (2012). Cancer Screening in the United States., CA CANCER J CLIN. 62, 129–142.

Song, Y., Dai, F., Zhai, D., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Luo, J., Liu, M., Yi, Z. (2012). Usnic Acid Inhibits Breast Tumor Angiogenesis And Growth by Suppressing VEGFR2-Mediated AKT And ERK1/2 Signaling Pathways, *Angiogenesis.* **15**, 421–432.

Soyocak, A., Coşan, D., Başaran, A., Değirmenci., Güneş, H., Mutlu, F., Çolak, E. (2009). The Association Between Apoptotic Bak Protein And Quercetin in Breast And Colon Cancer Cell Lines, *FABAD. J. Pharm Sci.* **34**, 83-89.

Spiro, S.G, Porter, J.C. (2002), Lung Cancer-Where Are We Today? Current Advances İn Staging And Nonsurgical Treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* **166**, 1166-96.

Şenol, F.S., Tüzün, C.Y., Toker, G., Orhan, I.E. (2012). An in vitro perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five gentiana species and gentianella caucasea, *Int J Food Sci Nutr.* **63**, 802-12.

Takeda, Y., Masuda, T., Honda, G., Takaishi, Y., Ito M., Ashurmetov O.A., Khodzhimatov, O.K., Otsuka, H. (1999). Secoiridoid Glycosides from *Gentiana olivieri*. *Chem. Pharm. Bull.* **47(9)** 1338—1340.

Tdamç G. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi.* 2006;7:1-37

Thiruvanniyar R., Kaneswaran and Ravichandran R. (2008). The Antiproliferative activity of flavanoid fraction of *Indigofera tinctoria* is through cell cycle arrest and apoptotic pathway in A-549 cells. *Journal of Biological Science*

Travis, W., Brambilla, E., (2004). Muller-Hermelin, H., Harris, C.C., eds. Pathology and genetics: tumors of the lung, pleura, thymus and heart. *World Health Organization classification of tumors. Lyon, France: Iarc. 20*, 324- 31.

Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K.R., Yatabe, Y. (2011). Et Al. International Association For The Study Of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification Of Lung Adenocarcinoma. *Journal Of Thoracic Oncology*, **6**, 244-85.

Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, AG., Geisinger, KR., Yatabe, Y., Beer, DG., Powell, CA., Riely, GJ., Van Schil, PE., Garg, K., Austin, JH., Asamura, H., Rusch, VW., Hirsch, FR., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R.M., Ishikawa, Y., Jett, J., Sanchez-Cespedes, M., Sculier, JP., Takahashi, T., Tsuboi, M., Vansteenkiste, J., Wistuba, I., Yang, PC., Aberle, D., Brambilla, C., Flieder, D., Franklin, W., Gazdar, A., Gould, M., Hasleton, P., Henderson, D., Johnson, B., Johnson, D., Kerr, K., Kuriyama, K., Lee, JS., Miller, VA., Petersen, I., Roggli, V., Rosell, R., Saijo, N., Thunnissen, E., Tsao, M., Yankelewitz, D. (2011). International Association For The Study Of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification Of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, **6**, 244-85.

Wang, L-H., Li, Y., Yang, S-N., Wang, F-Y., Hou, Y., Cui, W., Chen, K., Cao, Q., Wang, S., Zhang, T-Y., Wang, Z-Z., Xiao, W., Yang, J-Y., Wu, C-F. (2013). Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer through suppressing NF-KB and MAPK/HO-1 signalling, DOI:10.1038/bjc.2013.752

Warren W. Faber P., Gould V., (1989). Neuroendocrine Neoplasms Of The Lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **98**, 321-332.

Williams, S. P., Nowicki, M.O., Liu, F., Press R., Godlewski, J., G. , Rasoul, M.A., Kaur, B., Fernandez, S.A., Lawler, S.E., (2011). Indirubins decrease glioma invasion

by blocking migratory phenotypes in both the tumor and stromal endothelial cell compartments. Sean E Lawler, Neurosurgery, Ohio State University, 400 W. 12th Ave., Columbus, OH, 43210, United States.

Wu, D., Rice, C.M., Wang X. (2012). Bioinformatics: a New Approach To Systems Clinical Medicine. *BMC Bioinformatics*. 13-71.

Yalçın, F., Meydan, S., Kaya, D., Genç, Y., Harput, Ş., Ersöz, T. (2012). Isolation and cytotoxic activity of some secoiridoids from *Gentiana olivieri*. *Planta Med*. 78.

Yazır, Y., Dalkılıç, H. (2012). “Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç Endotel Hücre Kültürü. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye”, *Koşuyolu Kalp Dergisi*. **15**, 137-142.

Yeşilada E., (2007).Ölümsüzlük mümkün mü? *Fitomed* 3:**37-44**

Yokuş, B. Çakır. D.Ü, Akdağ. Z, Mete. N, Sert. C. (2005). Oxidative DNA Damage in Rats Exposed to Extremely Low Frequency Electro Magnetic Fields. *Free Radical Research*. **39**, 317-323.

Yokuş, B. Çakır. DÜ. (2012). İn vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy'de Oxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. **5**, 535- 43.

Yokuş, B., Mete N. (2012). “Kanser Biyokimyası”, *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **1**, 7-18.

Yokuş, B., Mete. N. (2003). Oksidatif DNA Hasarı. *Klinik Laboratuar Araştırma Dergisi*. **7**, 51-64.

You, W.C.,Hsieh, C.C., Huang, J.T. (2009) Effect of Extracts from Indigowood Root (*Isatis indigotica* Fort) on Immune Responses in Radiation- Induced Mucositis. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **15**, 7, 771-778.

Yua, J., Sunb, R., Zhao Z., Wang, Y. (2014). *Auricularia polytricha* polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*. 68, 67–71.

Zhang, S., Wang, L., Liu, H., Zhao G., Ming, L. (2014). Enhancement of recombinant myricetin on theradiosensitivity of lung cancer A549 and H1299 cells. Diagnostic Pathology. 9, 68.

