



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**IN VITRO ORTAMDA IRIS UNGUICULARIS, IRIS SUAVEOLENS VE
IRIS HISTRIO BİTKİ EKSTRAKTLARININ MCF7 MEME KANSERİ
HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşe Fatma OĞUZCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Gaziantep
2016

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

IN VITRO ORTAMDA IRIS UNGUICULARIS, IRIS SUAVEOLENS VE IRIS HISTRIO
BİTKİ EKSTRAKTLARININ MCF7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ
ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe Fatma OĞUZCAN

Tez Savunma Tarihi: 15.01.2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

.....

Doç. Dr. Zafer ÇETİN

.....

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21.01.2016

Ayşe Fatma OĞUZCAN

CANIM ANNEM ve BABAM

Semra ve Süleyman AKSOY' a

TEŞEKKÜR

Araştırmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, her aşamada beni cesaretlendiren, bana çalışma imkânı sunan, akademik yaşantımda her daim desteğini esirgemeyeceğinden emin olduğum değerli hocam Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya

Her koşulda yanımda olup bilgi ve desteğini esirgemeyen dostlarım; Demet TAŞDEMİR, Ebru TEMİZ ve Gülper NACARKAHYA' ya

Bu tezin gerçekleştirilmesinde finansal desteği nedeniyle Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne (BAPYP, Proje No: TF.15.25.)

Yüksek lisans eğitimim boyunca bütün sıkıntılı süreçleri benimle beraber yaşayan, uzun yıllardır maddi, manevi desteklerini esirgemeyen ve bu durumdan bir an bile şikayetçi olmayan en başta eşim olmak üzere anneme ve babama,

Teşekkürlerimi Sunarım...

Ayşe Fatma OĞUZCAN

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	iv
TABLOLAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kanser ve Göğüs Kanseri	5
2.2. Fitokimyasallar ve Kanser	6
2.3. Kanseri Engellemedeki Biyolojik Yaklaşımlar	8
2.3.1. Kanserojenlerin Dektoksifikasyonu.....	8
2.3.2. Antioksidan Aktivite (GSH miktarı, GR ve katalaz ve süperoksit dismutaz) 	9
2.4. Bitki Aktivite Çalışmaları	10
2.5. Iris L. Bitkileri	11
2.5.1. Iris unguicularis poiret.....	13
2.5.2. Iris suaveolens boiss & reuter	14
2.5.3. Iris histrio reich.....	15
2.6. Apoptozis ve Hücre Döngüsü	15
2.6.1. Apoptozisin tanımlanması	15

2.6.2. Apoptozisin temel işlevi ve amaçları	16
2.6.3. Apoptozisi uyaran sinyaller	16
2.7. Apoptozisden Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler	16
2.7.1. Apoptotik hücrede gözlemlenen morfolojik değişiklikler	17
2.7.1.1. Yüzey organellerinin kaybı.....	17
2.7.1.2. Hücre büzülmesi	17
2.7.1.3. Kromatin yoğunlaşması	17
2.7.1.4. Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşumu.....	17
2.8. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Fagositozu	18
2.9. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar.....	19
2.10. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri.....	19
2.10.1. Kaspazlar	20
2.10.2. Bcl-2 ailesi	20
2.10.3 p53	21
2.10.4. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi.....	21
2.11. Apoptozis Sürecinin Değerlendirilmesi.....	21
2.11.1. Apoptozis evresinin hücre içi veya hücre dışı uyaranlarla tetiklenmesine göre değerlendirilmesi	22
2.11.2. Ekstrinsik yol (Reseptör aracılı apoptozis)	23
2.11.3. İntrinsik yol (Mitokondri aracılı apoptozis).....	23
2.12. Hücre Döngüsünün Tanımlanması	24

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Gereçler.....	26
3.1.1. Biyolojik Aktivite Testleri İçin Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler.....	26
3.1.2. Cihazlar	27
3.2. Kullanılacak Yöntemler	27
3.2.1. Hücrelerde kullanılan kültür vasatının hazırlanması	27
3.2.2. Hücrelerin kaldırılması	27
3.2.3. Hücrelerin sayılması	27
3.2.4. Bitkilerin toplanması ve özütlerinin hazırlanması	28
3.2.5. Bitki ekstraktları ile muamele	28
3.2.6. Hücre canlılığının değerlendirilmesi	28
3.2.7. Apoptozisin değerlendirilmesi.....	29
3.2.8. Apoptozis için akım sitometrisi yöntemi	29
3.2.9 Hücre döngüsü için akım sitometrisi yöntemi	30
3.2.10. İstatistiksel değerlendirme	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Iris Unguicularis, Iris Suaveolens ve Iris Histrio Bitkilerinin MCF7 hücre canlılığına etkileri.....	32
4.2. Iris Unguicularis, Iris Suaveolens ve Iris Histrio Bitkilerini Erken apoptozis üzerine etkileri.....	34
4.3. Iris Unguicularis, Iris Suaveolens ve Iris Histrio Bitkilerinin hücre döngüsüne etkileri.....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
5.1. Sitotoksosite Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	39

5.2. Erken Apoptozise ve Hücre Döngüsüne Etkilerin Değerlendirilmesi	40
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	49

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Iris familyasına ait üç bitki türleri ile maruz bırakılan erken apoptotik MCF7 hücrelerinin belirlenmesi	36
Tablo 4.2: Iris familyasına ait olan üç bitki ekstraktının MCF7 hücresi üzerinde akım sitometri ile hücre döngüsünün değerlendirilmesi.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Göğüs Anatomisi.....	6
Şekil 2.2: Bazı Besinsel Fitokimyasallar.....	7
Şekil 2.3: Antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki ilişki	9
Şekil 2.4: Iris çiçeğinin genel yapısı	12
Şekil 2.5: Apoptozisin morfolojik değişiklikleri	18
Şekil 2.6: Apoptozisin genel görünümü	22
Şekil 2.7: Hücre döngüsü ve kontrol noktaları.....	25
Şekil 4.1: Y1 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	32
Şekil 4.2: Y2 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 4.3: Y3 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi	34
Şekil 4.4: (a) Kontrol grubunun MCF7 hücresindeki apoptotik etkisi, (b) Y1 bitki ekstraktının MCF7 hücresindeki apoptotik etkisi, (c) Y2 bitki ekstraktının MCF7 hücresindeki apoptotik etkisi, (d) Y3 bitki ekstraktının MCF7 hücresindeki apoptotik etkisi	35
Şekil 4.5: (a) Kontrol grubunun (DMSO) hücre döngüsüne etkisi, (b) Y1 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi, (c) Y2 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi, (d) Y3 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi	37

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1: Iris Unguicularis bitkisi	13
Resim 2.2: Iris Suaveolens bitkisi	14
Resim 2.3: Iris Histrio bitkisi	15
Resim 3.1: MCF7 İnsan meme kanseri hücre hattı	26
Resim 3.2: Apoptozis ve hücre döngüsü deney aşaması.....	31

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

1. Simgeler

g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
°C	Santigrad derece
μM	Mikromolar

2. Kısaltmalar

APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ANOVA	Analysis of Varians
AIF	Apoptozis indükleyici faktör
APO-1= Fas	Apoptozis indükleyici reseptör-1
Brd U	Bromodeoksüridin
Bid	Bcl-2 interacting domain
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bcl-2	Anti apoptotik protein
Bcl-XL	Bcl-2 inhibiting apoptozisin bir üyesi
CARD	Caspase recruitment domain

Caspase	Cysteinly aspartate- specific protease
c-myc	Myelocytoma oncogene
cyc	Siklin
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FADD	Fas associated death domain
Fas	TNF ailesinden tip 1 glikolize transmembran reseptörü
Fas-ligand	Apoptozisi uyaran 40 kd'luk tip 2 transmembran proteini
FCS	Fetal sığır serumu
IAP	Inhibitor of apoptosis
IC ₅₀	İnhibisyon Konsantrasyonu
PS	Fosfotidilserin
PUMA	P53 up-regulated modulator of apoptosis
SMAC/D	Second mitochondrial-derived activator(SMAC/ DIABLO)
TNF	Tümör nekroz faktörü

Araştırma Projesi No: BAPYP, TF.15.25.

ÖZET

IN VITRO ORTAMDA IRIS UNGUICULARIS, IRIS SUAVEOLENS VE IRIS HISTRIO BİTKİ EKSTRAKTLARININ MCF7 MEME KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe Fatma OĞUZCAN

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Ocak 2016, 49 Sayfa

Iris bitki türleri daha çok sıcak ve ılıman bölgelerde yetişmektedir. Iris türleri aktif bileşenleriyle ilgili immünoloji, enfeksiyon hastalıkları, ülser ve onkoloji gibi çeşitli araştırma alanlarında yeni tedavi olasılıkları bulmayı hedefleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Kimyasal analizler gösteriyor ki Iris türleri 250’den fazla bileşim içermektedir. Bu bileşimler; flavonoidler, izoflavonoidler ve onların glikozitleri, benzokininleri ve triterpenoitleri içermektedir. Bu nedenle olası toksik ve terapötik etkileri öngörmek açısından Iris türlerinin ekstraktlarının etki mekanizmalarını incelemek önemlidir. Özellikle Türkiye’de yetişen Iris türleri ile ilgili çok fazla çalışma yoktur. Iris familyasından olan Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bileşenlerinin hücrenin içine girişini maksimuma çıkartabilmek için dimetil sülfoksit (DMSO) ile ekstresi kullanılmıştır. DMSO, bitki ekstraktlarımız için iyi bir çözücüdür. Bu çalışmanın amacı kanser hücreleri üzerinde Türkiye’de yetişen Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitkilerinin DMSO ekstrelerinin antikanser etkilerini araştırmaktır. Çalışmada Türkiye’nin farklı yerlerinden toplanan bitki ekstraktlarının insan meme kanseri (MCF7) hücrelerinin büyümesi üzerindeki azaltıcı etkileri incelendi. MTT (3-[4,5 – dimethylthiazol -2-il] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) yöntemi ile MCF7 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi ve IC₅₀ değerleri belirlendi (IC₅₀ değerleri sırasıyla 50.8 µM, 49.40 µM ve 50.8 µM). Sonuçlar bitki ekstraktlarının doza bağımlı bir şekilde sitotoksik olduğunu gösterdi. %50 hücre ölüm oranının (IC₅₀) neden olduğu konsantrasyon değeri Iris unguicularis ve Iris suaveolens bitkileri için 150 µg/ml, Iris histrio bitkisi için de 100 µg/ml olarak belirlenmiştir. Sonraki deneyler bu konsantrasyonlara göre devam etmiştir. Bitki ekstraktlarımızın apoptozise etkisi Anneksin V boyama ile hücre döngüsüne etkileri ise Propidium iyodür (PI) ile boyandıktan sonra akım sitometrisi tarafından analiz edilmesiyle incelendi. Sonuçlar; bitki ekstraktlarıyla muamele edilen MCF7 hücreleri, kontrol olarak belirlenen DMSO ile muamele edilmiş MCF7 hücreleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığını göstermektedir. Değerler birbirine çok yakın değişimler göstermektedir. Hücre döngüsü sonuçlarına bakıldığında ise Iris unguicularis, Iris histrio ve Iris suaveolens bitki ekstraktının kontrol grubuyla G1, S ve G2/M fazları ayrı ayrı karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Bu sonuçlar bize bitki ekstraktlarının kanser kemoterapisi veya önlenmesinde faydalı olabilecek güçlü bir anti-tümörijenik bileşenlere sahip olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Iris türleri, Meme Kanseri, Apoptozis, Hücre Döngüsü ve Sitotoksikite

ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF ANTICANCER ACTIVITY ON BREAST CANCER CELL LINES MCF7 THE PLANT EXTRACTS OF IRIS UNGUICULARIS, IRIS SUAVEOLENS AND IRIS HISTRIO

Ayşe Fatma OĞUZCAN

M. S. in Medical Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serdar ÖZTUZCU

January 2016, 49 pages

The Iris genus grows especially in hot and warm temperate areas. There are many studies conducted on Iris genus or their active components aiming to find new treatment possibilities in diverse research fields such as immunology, infectious diseases, allergy, diabetes, ulcers and oncology. Chemical analysis indicated that Iris genus have more than 250 compounds. They include flavonoids, isoflavonoids and their glycosides, benzoquinones and triterpenoids. Therefore it is important to investigate the Iris genus extracts mechanisms of action in order to predict possible cytotoxic and may be therapeutic effects for cancer. There are not many investigations about Iris genus which are grown especially in Turkey. Iris unguicularis, Iris suaveolens and Iris histrio which are from the family of Iris L. were extracted with dimethyl sulfoxide (DMSO) which can maximize the penetration of compounds from plants extracts to the cells. DMSO is a good solvent for our plant extracts. The aim of this study was to investigate the anticancer effects of DMSO extracts of Iris unguicularis, Iris suaveolens and Iris histrio which are grown in Turkey. In our study, inhibitory effects of Iris unguicularis, Iris suaveolens and Iris histrio extracts collected from different regions of Turkey were analyzed on growth of the human breast carcinoma cells(MCF7). Their cytotoxic effects of breast carcinoma cell line(MCF7) was examined using the MTT 3-[4,5 – dimethylthiazol -2-yl] - 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay. IC₅₀ values were determined (IC₅₀ values respectively 50.8 µM, 49.40 µM and 50.8 µM). The results showed that our plant extracts are cytotoxic in dose-dependent manner. The concentration rates that was why % cell death ratios (IC₅₀) are determined as 150 µg/ml for Iris unguicularis and Iris suaveolens, as 100 µg/ml for Iris histrio. Next assays were continued according to these concentrations. The effects of plant extracts on apoptosis with Annexin V, the effects of plant extracts on cell cycle with flow cytometer after staining the cells with Propidium iodide (PI) was analyzed. The results were indicated that there are not a meaningful difference on apoptosis when the effects of plant extracts treated cells were compared to control DMSO treated MCF7 cells. The rates show very close variation to one another. In case we look the results of cell cycle, it is observed that there are not a meaningful difference when the effects of extracts of Iris unguicularis, Iris histrio and Iris suaveolens on cell cycle were compared separately to control group on G1, S and G2 phases ($p>0.05$). In conclusion, you are thought that Iris unguicularis, Iris histrio and Iris suaveolens extracts don't have potent anti-tumorigenic compounds that may be useful in cancer chemoprevention or therapy.

Key Words: Iris Genus, Breast Cancer, Apoptosis, Cell Cycle and Cytotoxicity

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Binlerce yıldan beri insanlar çeşitli rahatsızlıklarının tedavisi için bitkileri kullanmıştır. Bitkilerin hemen hemen tamamı kendilerinin metabolik aktivitelerinin sonucunda tıbbi potansiyeli olan kimyasal bileşikleri üretmektedirler. Bütün bunlara rağmen, özellikle ülkemizde doğal olarak yetişen bitkilerin tıbbi etkileri hakkında yeterli bilgiye sahip olmadığımız görülmektedir. Ayrıca, kanser gibi çok yaygın hastalıkların tedavisinde ülkemizde kullanılan geleneksel ilaçlarla ilgili bilimsel temellerde çok az bilinmektedir.

Kanser halen Türkiye’de ve dünyada önemli bir ölüm ve hastalık nedenidir. Günümüzde kanser hastalığının tedavisinde etkili ilaçlar ve metotlar bulunmaktadır. Mevcut kullanılan kemoterapötik ajanlar yeteri kadar etkili olmadıkları gibi sağlıklı hücrelerde de olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu sebeple yeni, seçici, etkili ve daha az toksik antikanser etkili ajanların belirlenmesi adına bilimsel araştırmalar yapılmaktadır.

Etkili antikanser aktivitesine sahip aktif bitki çeşitlerinin fitokimyasal araştırmasının sonuçları flavonoidler, izoflavonoidler, terpenler ve fenoliklerden kaynaklandığını göstermektedir. Bitkilerden elde edilen fitokimyasalların; antioksidan ve serbest radikallerin giderilmesinde, hücre döngüsü, tümör baskılayıcı, gen ekspresyonu, apoptozis ve metabolizma etkilerini içeren etki mekanizmalarında önemli rol oynadığı bilinmektedir.

Iris L. türleri daha çok sıcak ve ılıman bölgelerde yayılım gösterir. Türkiye’de 18’i yerli olan 51 Iris taksonu vardır. Iris Türkiye’de “süsen” olarak da bilinmektedir. Iris’in çeşitli türlerindeki bitki kimyasal (fitokimyasal) araştırmaları, izole edilmiş 250’den fazla bileşimden bahsedilmektedir. Bu bileşimlerin bazıları flavonoidler, izoflavonoidler ve onların glikozitleri, benzokininleri ve triterpenoitler içermektedir. Iris türleri; kanser, inflamasyon ve virüs enfeksiyonları gibi çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için yararlı olan etkilere sahiptir. Iris tectorum, Iris germanica ve Iris missouriensis içeren çoğu Iris türleri onkoloji alanında araştırmalara dikkati çekmektedir. Fakat Türkiye’de yetişen Iris türlerinin antikanser etkileriyle ilgili hiç çalışma bulunmamaktadır (1).

Bu nedenle bu çalışmada meme kanser hücre hattı (MCF7) üzerinde Iris familyasına ait olan Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitki özütlerinin sitotoksite üzerine olası etkileri incelendi. Sonuçta bitki özütlerinin doza bağımlı sitotoksik değerleri belirlendi. Bu değerler ile bitki özütlerinin apoptozis ve hücre döngüsüne etkileri incelendi.

Ülkemizde doğal olarak yetişen bu bitki türlerinden elde edilen özütlerin meme kanser hücre hattı (MCF7) üzerindeki olası antiproliferatif ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi, tıp ve farmakoloji alanında kullanılabilecek yeni terapötik ajanların literatüre tanıtılması ve bu alandaki boşluğun doldurulması ile istenilen sonuca ulaşılmış olunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

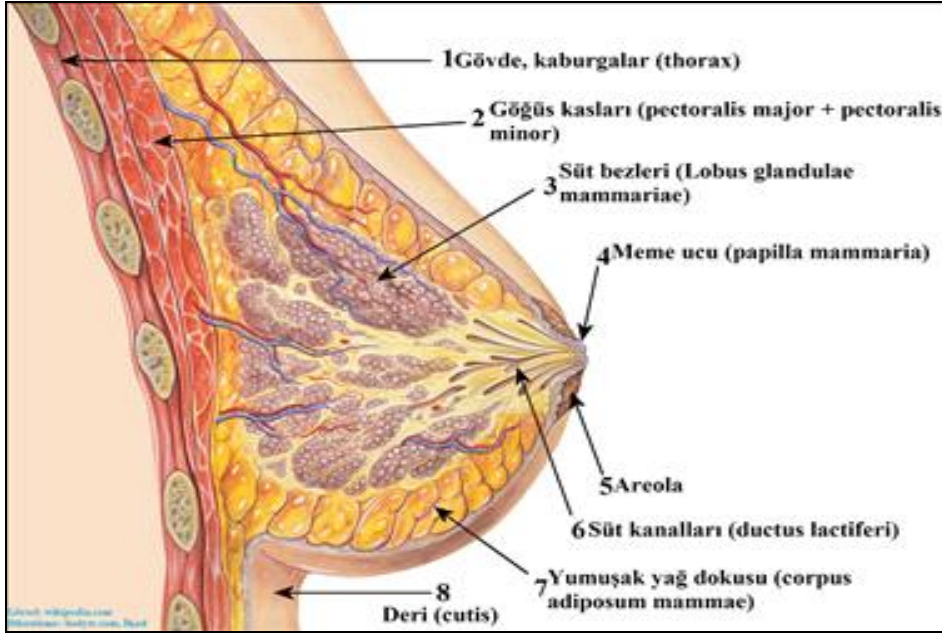
2.1. Kanser ve Göğüs Kanseri

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla ya da normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam etmesi ile karakterize edilen bir hastalık gurubu olarak tarif edilmektedir. Organlar, ihtiyaç halinde yenilerini oluşturmak üzere bölünen hücrelerden oluşmaktadır. Eğer hücreler gerekli olmadığı halde bölünürse tümör olarak bilinen aşırı bir doku kitlesi meydana getirmektedir. Tümörler, hayatı tehdit etmeyen iyi karakterli ya da kanseröz özellikte malignant karakterli olabilirler. Malignant tümörler, komşu doku ya da organları istila ederek onlara sonunda ölümle sonuçlanacak zararlar verebilmektedir (2). Hücre çoğalması ile hücre ölümünün (apoptozis) azalma hızı kansere yol açabilmektedir. Hücrelerin yaşam süreleri boyunca DNA'sında meydana gelen dinamik değişiklikler sonucu belirlenen, genomun bir hastalığı olarak da kanseri tanımlamak mümkündür (3). Kanserin nedenleri hala tam olarak açıklanamamıştır. Genellikle kanser oluşumu tek bir nedenle birlikte dönüşülmemektedir. Diyet, genetik mutasyon, ultraviyole ışığa (UV) maruziyet ve karsinojenik yapılar da kanser oluşturabilmektedir. Tütün, alkol, kimyasal katkı maddeleri, atmosferik ve su kirleticilerinin de kanser bağıntılı olduğu gösterilmiştir (4).

Akciğer, göğüs, prostat ve serviks gibi pek çok kanser tipi bilinmektedir. Özellikle göğüs ve serviks kanseri bayanlarda en sıklıkla rastlanılan kanser türleri iken erkeklerde en çok rastlanan kanser türü prostat kanseridir. Göğüs kanseri kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türlerinden birisidir ve kanser ölümlerinin en sık rastlanan türünün ikincisidir (5).

A.B.D. de göğüs kanseri kadınlar arasında cilt kanserinden sonra en yaygın ikinci kanser türüdür. Hem erkeklerde hem de kadınlarda meydana gelebilmektedir. Fakat erkeklerde çok nadirdir. Her yıl göğüs kanserinin erkeklerde 2.300 yeni vakası, kadınlarda da yaklaşık 230.000 yeni vakası oluşmaktadır (6).

Göğüs, süt yapabilen süt bezleri ve süt bezlerinden meme uçlarına süt taşıyan kanallar olarak adlandırılan salgı bezlerinden oluşmaktadır. Göğüs dokusu aynı zamanda yağ ve bağ doku, lenf bezleri ve kan damarları içermektedir (6).



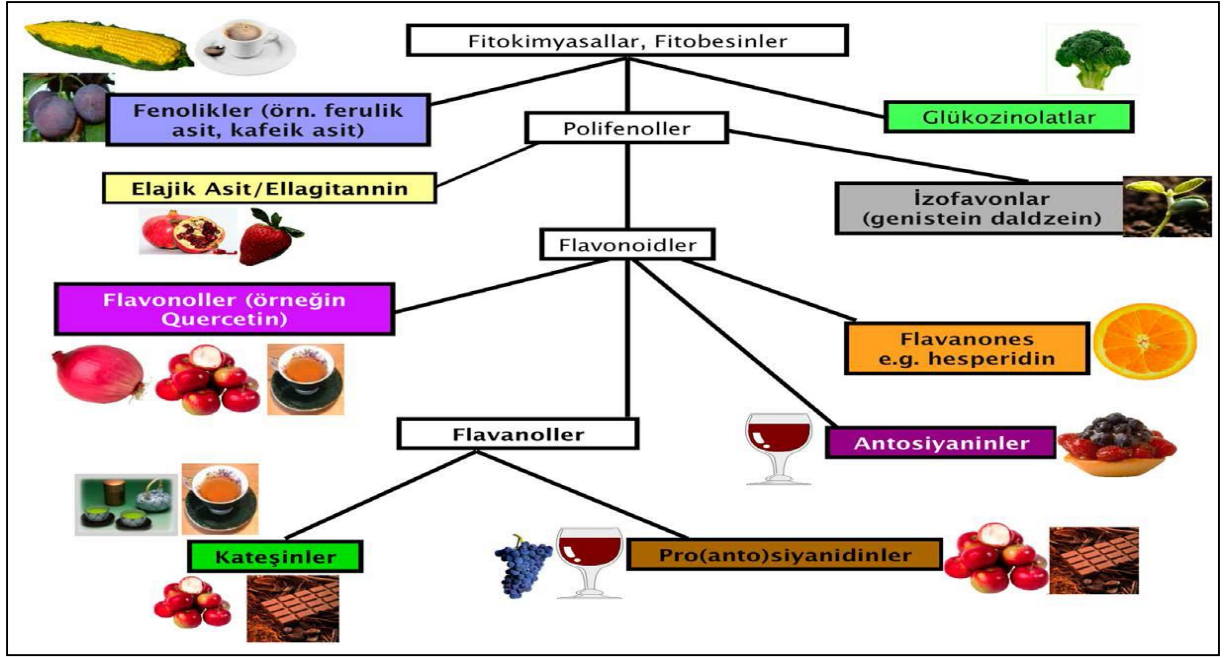
Şekil 2.1: Göğüs Anatomisi (88)

Göğüs kanserinin en yaygın tipi kanallardaki hücrelerde başlayan kanal kanseridir. Göğüs kanseri aynı zamanda süt bezlerindeki hücrelerde ve göğüsteki diğer dokularda da başlayabilmektedir. İlerleme gösteren göğüs kanseri, dokuyu çevreleyen kanallar veya süt bezlerinde başlayarak yayılan göğüs kanseridir (6).

İlerleyen göğüs kanserinin yaşam riski kadınlar için % 12.6 dır. Göğüs kanseri; yaşın ilerleyişi, daha yüksek vücut indeksi, alkol tüketimi, hormon değişimi, radyasyona maruziyet, kısırlık, aile öyküsü, BRCA1 ve BRCA2 geni mutasyon taşıyıcı durumu ve göğüs dokusunun oluşumunun geçmişini içeren bazı risklerle bağlantılıdır (7).

2.2. Fitokimyasallar ve Kanser

Fitokimyasallar meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda ve çoğu kronik hastalıkların riskini azaltmakla ilgili olan diğer bitkilerde bulunan biyoaktif besleyici olmayan bitki bileşimleri olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde birbirinden farklı 5000 fitokimyasal bulunduğu tahmin edilmektedir (8).



Şekil 2.2: Bazı Besinsel Fitokimyasallar

Bu fitokimyasalların bazılarının kanserin neden olduğu zararlardan hücreleri koruduğu bilinmektedir. Bazı bilim adamları daha fazla sebze, meyve ve bazı fitokimyasalları içeren bitkileri yiyerek %40 kadar fazla kanser riskini azaltılabileceğini düşünmektedir. Araştırmalar bazı fitokimyasalların;

- Kansere neden olan potansiyel maddelerin (kanserojen maddeler) oluşumlarını durdurmaya yardımcı olabileceğini
- Saldıran hücrelerden kanserojen maddeleri engellemeye yardımcı olabileceğini,
- Kanser gibi değişiklikleri yok etmeye veya durdurmaya yardımcı olabileceğini; göstermektedir (9).

Antioksidan aktivite içeren ve serbest radikalleri temizleyen fitokimyasallar hücre çoğalmasındaki, hücre farklılaşmasındaki, onkogenlerdeki ve tümör baskılayıcı genlerindeki gen ifadesini düzenlemektedir. Fitokimyasallar hücre döngüsünün ilerlemesini ve programlı hücre ölümünü başlatmakta, detoksifikasyon, oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarındaki enzim aktivitelerinin düzenleyerek; bağışıklık sistemini uyarmakta, hormon metabolizmasını düzenlemektedir (10).

2.3. Kanseri Engellemedeki Biyolojik Yaklaşımlar

Kanseri engellemek, kanserin oluş oranını azaltmak için yapılan aktif önlemler olarak tanımlanmaktadır. Kanserin kimyasal maddeler kullanarak engellenmesi ilk 1976'da Sporn tarafından tanımlandığı gibi kanserin ilerlemesini engellemek, geri çevirmek veya durdurmak için doğal, sentetik veya biyolojik kimyasal maddeleri içermektedir (7).

Bu kanserojenlerden sakınarak veya metabolizmayı değiştirerek, kansere neden olan faktörleri veya tıbbi müdahaleyi azaltan bir yaşam ve beslenme şeklini sürdürerek başarılabılır.

Kanserin kimyasal maddeler kullanılarak önlenmesi;

1. Detoksifikasyon enzimlerini; faz I (örneğin fare karaciğer hücresi için (YP 1A1)) ve faz II (örneğin GST) uyararak kanserojenin detoksifikasyonu;
 2. antioksidan aktivitesi,
 3. doğal ürünlerdeki bileşiklerin anti inflamatuvar etkisi,
 4. hormona bağlı mekanizması,
 5. bağışıklık düzenleyici etkisi
- ile sağlanabilmektedir (10).

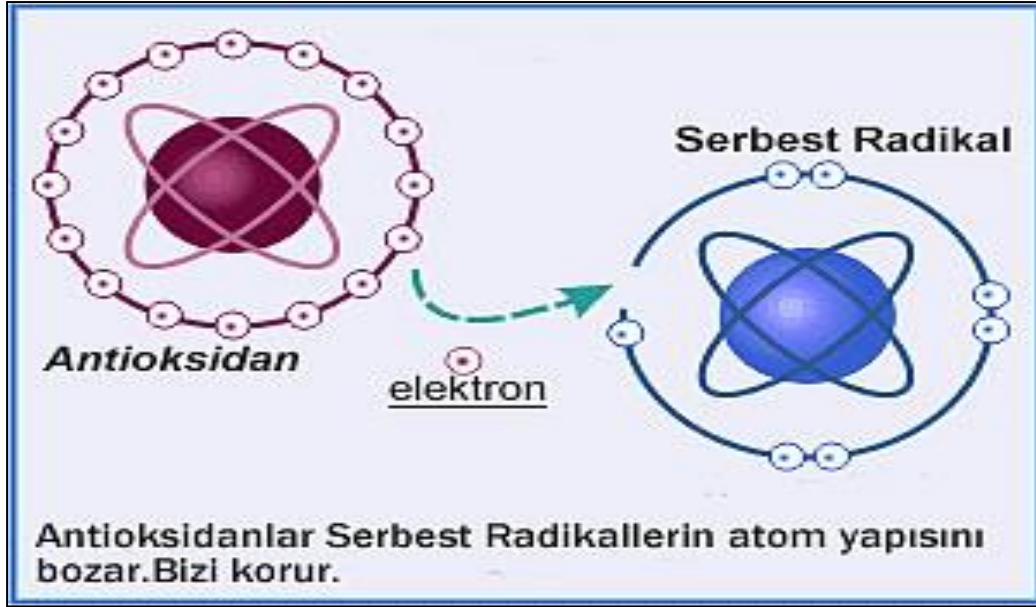
2.3.1. Kanserojenlerin detoksifikasyonu

Faz I ve Faz II enzimleri sırasıyla çevresel ve kimyasal kanserojenleri için detoksifikasyon yollarını belirtmektedir. Çoğu şifalı bitkilerin etki mekanizması, Faz I enzim aktivitesini azaltıp veya Faz II enzim aktivitesini artırma özelliğini içermektedir.

Organosülfür bileşikleri, daha etkili Faz I/II düzenleyicilerinin bazılarını sunan sarımsakta bulunmaktadır. Kimyasal olarak yemek borusu ve kolon kanserine nedenlerini ortadan kaldırdığı düşünülen DAS, CYP2E1'in etkili bir engelleyicisidir. Dimetilhidrazin ve çeşitli nitrozaminler içeren CYP2E1, çeşitli kanserojenlerin metabolik aktivasyonu ile uğraşmaktadır (11,12).

2.3.2. Antioksidan aktivite (GSH miktarı, GR ve katalaz ve süperoksit dismutaz)

Reaktif oksijen çeşitleri (ROS), oksidatif stresi başlatarak ya kanser oluşumunun başlamasında ya da ilerlemesinde büyük bir rol oynadığı bilinmektedir (14).



Şekil 2.3: Antioksidanlar ve serbest radikaller arasındaki ilişki(99)

Peroksitler ve süperoksit anyonlar (O_2^-) hücresel sistemlerde sitotoksik/genotoksik neden olmaktadır.

Bitkisel kaynaklı östrojenik etkiye sahip kimyasallar (fitoöstrojenler); kaynağa bağlı değişen düzenleyicilere rağmen şifalı bitkilerdeki besleyici ürünlerde çok fazla çeşitte bulunmaktadır. Flavanoid ve lignan fitoöstrojenler antioksidan aktiviteye sahiptir (15).

Fitoöstrojenlerin en fazla üzerinde çalışılmış olanları fenolikler ve karotenoidlerdir.

Fenolikler: Fenolikler bir veya daha fazla hidroksil gruplarıyla bir veya daha fazla aromatik halkalara sahip olan bileşiklerdir ve genelde fenolik asitler flavonoidler, stilbenler kumarinler ve tanik asitler olarak sınıflandırılmaktadır. Bitkilerdeki ikincil metabolizmanın ürünleri olan fenolikler bitkilerin büyümesinde ve çoğalmasındaki temel fonksiyonları sağlamaktadır ve patojenlere, parazitlere karşı savunma mekanizması olarak harekete geçmektedirler (8).

Flavonoidler: Flavonoidler diğer gübreler, meyveler ve sebzelerde tanımlanan antioksidan aktivite ile ilgili fenolik bileşikler grubudur. Flavonoidler kanser riskini azaltması ile ilgili bağlantılı olduğu gözlenmektedir. 4000'den fazla flavonoid olduğu tahmin edilmektedir (8).

Flavonoller, flavonlar, izoflavonlar ve antioksiyaninler yiyeceklerdeki yaygın flavonoidlerdir (8).

3. Diğer önemli değişken, kimyasal engelleyici olan bir etken olarak doğal üründeki bileşenlerin antiinflamatuvar etkisinin değerlendirilmesidir. Hemen hemen tüm steroid yapıda olmayan antiinflamatuvar ilaçlar; prostaglandinler, COX-1 ve COX-2'nin üretiminden sorumlu siklooksijenaz (COX) enziminin izoformların her ikisinde tercihen değiştirmektedir (10). Özellikle hemen hemen tüm steroid yapıda olmayan inflamatuvar ilaçlar göğüs ve kolon kanseri için riski azaltıcı etkisiyle bilinmektedir (11).

4. Hormona bağlı mekanizma

Deneyssel, kliniksel ve epidemiyolojik bulgunun önemli bir kısmı hormonların göğüs kanserinin etiyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (17). Hormon kaynaklı kanserler; Amerika'da yakın zamanlarda teşhis edilmiş kadın kanser hastalıklarının %40'dan ve erkek kanser hastalıklarında %20'sinden fazlasını oluşturmaktadır (98).

5. Bağışıklık düzenleyici etkisi

İmmünomodülasyon, bağışıklık sisteminin gücünü artırma veya azaltma yoluyla sistemin yanıtını değiştiren bir süreç olarak tanımlanmaktadır (10).

2.4. Bitki Aktivite Çalışmaları

Dünya üzerinde yaklaşık olarak 1.000.000 civarında bitki türünün mevcut olduğu varsayılmaktadır. Bu bitkileri yaklaşık olarak yarısı isimlendirilmiş ve bilim dünyasına kazandırdığı kazandırılmıştır (17).

Ayrıca, bu bitkilerin pek çoğu insanoğlu tarafından ıslah edilmiş ve besin maddesi olarak yetiştirilmiştir. Bununla birlikte besin maddesi olarak kullanılmasının dışında pek çok hastalığın tedavisi için bu bitkilerden faydalanılmıştır. 1979 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nce yapılan bir çalışmada farmakoplarda mevcut olan ülkelerde kullanılan ve ticareti yapılan bitkisel ilaçların miktarlarının 2.000 civarında olduğu ve dünyada yaşanan insanları %80'inin sağlık tedavileri için geleneksel tıbbi seçenek bu amaç için bitki özütleri ile bitkilerin aktif bileşenlerini kullandıkları belirtilmiştir (18).

Bitkilerin bu kadar çok kullanılma amaçları başında;

- Kolay ve ucuz bir tedavi aracı olarak elde etmenin mümkün olması,
- Sentetik kimyasal maddelerin tehlikeli yan etkilerinden dolayı oluşacak hastalıklara maruz kalmamak için, uzun yıllardan beri kullanılan ve etkileri bilinen bitki türlerinin bulunması,

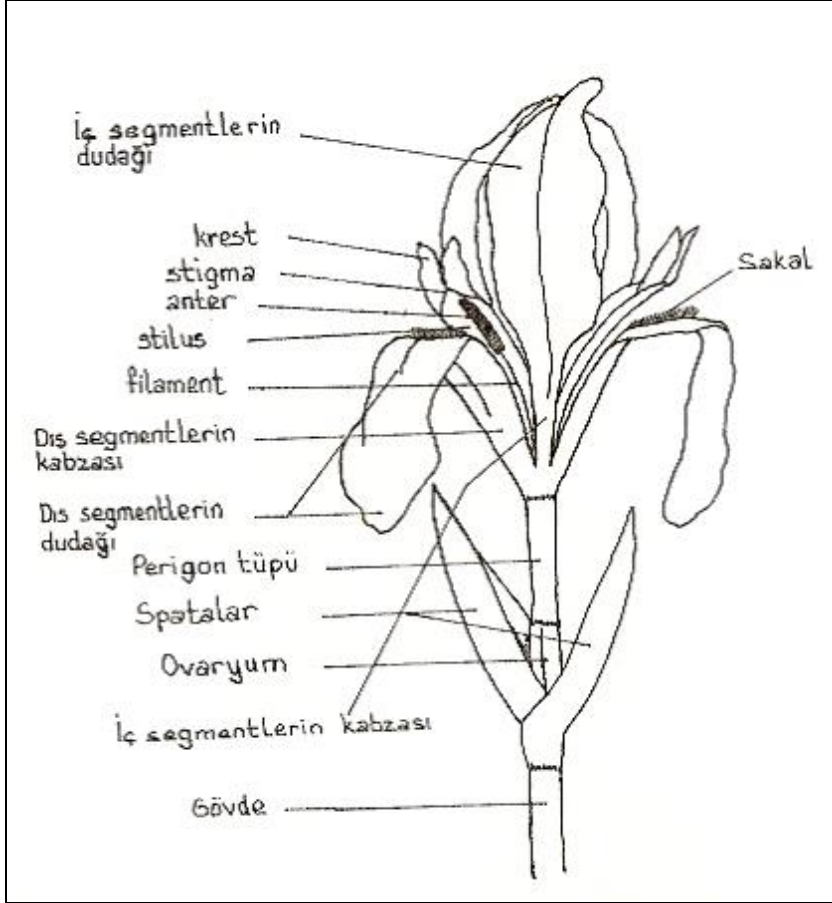
- Sentetik kimyasallar genellikle tek bir etkiye sahip olurken, bitkisel ürünlerin birden fazla etkiye sahip olması, gelmektedir (17).

Doğal ürünler, çok iyi farmakolojik etkileri ve düşük toksik etkisinden dolayı kanser kemoterapi alanında çok önemli bileşimlerdir. Geleneksel Çin Tıbbında klinik kanser tedavisi için kullanılan çok sayıda doğal bitkiler kullanılmaktadır (23).

Bitki ekstraktlarının antikanser etkileri; insan tümöründen türetilen hücre hatları panellerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirerek belirlenmiştir. Bu yaklaşım aynı zamanda kansere özgü sinyal molekülleri ve bitki ekstraktları için kanser hücrelerinin duyarlılığı aralarındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaktadır (24). FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) arasında antikanser ve antiinflamatuvar ihtiyaçların doğal kökenini uygun bulan %60 ve %75 paylaşım bulunmaktadır. Mevcut ilgi kanser tedavisi için doğal ilaçların keşfi üzerindedir. Çoğu bitki türleri dünya çapında bu amaç için korunmaktadır ve biyolojik tayini yapılmaktadır (1).

2.5. Iris L. Bitkisi

Iris L. türleri büyüleyici çiçekleri bulunan ve sıcak kuzey bölgeleri boyunca geniş bir şekilde dağılmış olan bahçe çiçeklerinin bir üyesidir. Çoğu türler arasında bulunan bol çeşitli çiçek renklerine atıfta bulunularak adını Yunanca gökkuşağı kelimesinden almıştır (1). Kuzey yarım küre boyunca Iris türlerinin yaklaşık 260' dan fazla çeşidi bulunmaktadır. Bazı Iris türleri nemli bölgelerde yetişmektedir. Çoğu türler ise çöl, yarı çöl veya kuru, kayalık alanlarda bulunmaktadır. Iris türlerinin çeşitleri iki yüzeyi aynı olan yaprakların esas yelpazesıyla bir tüp içinde birleşmiş olan üç tane dik duran taç yaprağıyla ve üç yatay çanak yaprağının renkli çiçek yapraklarıyla tanımlanmaktadır (31).



Şekil 2.4: Iris çiçeğinin genel yapısı (87)

Iris türleri ayrıca süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Yaklaşık olarak Türkiye’de 18’i endemik (yerli) olan 51 Iris taksonu vardır. Türkiye’de “süsen” olarak da bilinmektedir (1).

Iris çoğu türlerinin toprakaltı kısımlarının kullanımı yüzyıllardır geleneksel Avrupa tıp alanında kullanılmıştır. Kökleri soyulmuş ve kurutulmuş Iris türleri kusturucu, müsil, idrar söktürücü, uyarıcı, balgam söktürücü ve burun akıntısını kolaylaştıran özelliklerden dolayı popüler hale gelmiştir (26, 32).

Iris türlerine ait olan bitkilerden; izoflavonoidler, kinonlar ve Iris türü triterpenoidler ayrılmıştır (33, 34, 35, 36). Frag ve arkadaşlarının (37) araştırmasıyla bu benzerlikler Iris türlerinin izoflavonoid ve flavanoid miktarınca zengin olduğunu göstermektedir. Ayrıca bazı taksonlarda C-glikosiliksanton ve kinon miktarınca zengin olduğu belirtilmiştir (38). 14 Iris çiçeğindeki 17 glikosilflavonların dağılımını kanıtlamaktadır (39). Aynı zamanda Iris familyası ikincil ara ürünleri bakımından zengin olarak sınıflandırılmıştır. Çok çeşitli fitokimyasalların bu familyadan tanımlandığını göstermektedir (40). Şüphesiz ki Iris,

flavonoidin farklı tiplerini ve ilişki fenolik bileşenleri içermektedir. Bu Iris familyasının tıbbi ve ilaç kullanımına ait araştırmada muazzam potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (40).

2.5.1. *Iris unguicularis* poiret



Resim 2.1: Iris Unguicularis bitkisi

Iris Unguicularis; Yunanistan için endemik olup Türkiye, Batı Suriye ve Tunus'ta yetişen Iris türü olan çiçekli bir bitkidir. Türkiye'de Batı ve Güney Anadolu'da bulunmaktadır. Çiçekleri kış ve ilkbaharın ilk zamanlarında görülmektedir. Belirgin güzel bir kokuya sahiptir. Bu bitki ılıman bölgede yaygın olarak yetişmektedir (41, 42).

2013 yılında bir kimyasal analiz çalışması üzerine Iris Unguicularis bitkisinin onkoloji alanında önemi daha da artmıştır. Iris unguicularis kökleri 1, 3,- 0 -diforuloysucose, 5, 7-dihidroksil - 6 metoksiflavon, irilone, 4', 5 - trihidroksi - 6 - metoksiflavon, tectarigenin, kaempferol, 4', 5, 7- trihidroksi -3', 8 -dimetoksi flavon, 8- metroksi hispidulin, mangiferin içermektedir (43).

2.5.2. *Iris suaveolens* boiss & reuter



Resim 2.2: *Iris Suaveolens* bitkisi

Iris suaveolens Boiss & Reuter; çok yıllık şifalı bir bitki olup kuzeybatı Türkiye ve Balkanlara dağılmıştır. Mor, sarı ve kahverengi yapraklı ve sarı veya mavimsi püsküllü çift renkli çiçeklere sahiptir (44). *Iris* türlerinin aktivitesi ve kimyası ile ilgili birçok makale olmasına rağmen *Iris suaveolens* bitkisi ile ilgili hiçbir çalışma bulunmamaktadır (45, 46).

2010'da yapılan bir çalışmada (47), *Iris suaveolens*'in taze köklerinden petrol ayırıcı, kloroform ve metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Onların ham ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin sırasıyla pirokatekol ve kuersetin yapıları olarak tespit edilmiştir. Ham ekstraktların antioksidan ve antikolinesteraz aktivite testleri, petrol ayırıcı ve kloroform ekstraktlarında önemli antioksidan ve antikolinesteraz etkilerinin olduğunu kanıtlamaktadır (47).

2.5.3. Iris histrio reich



Resim 2.3: Iris Histrio bitkisi

Iris Histrio Reich; Güney Türkiye, Suriye ve Lübnan'da yetişen küçük bir Iris türüdür. Temelde karışık desenlerler ve eflatuni mavili beneklerle güzel mavi çiçeklere sahiptir (48). Iris Histrio Reich bitkisiyle ilgili bir makale bulunmamaktadır.

2.6. Apoptozis ve Hücre Döngüsü

2.6.1. Apoptozisin tanımlanması

Apoptozis kelimesi “apo-TOE-sis” den oluşmaktadır, Yunancada “sonbaharda yaprak dökümü” olarak da bilinmektedir. 1842' de Vogt tarafından hücrelerde normal gelişim esnasında ortaya çıkan ölüm olarak ifade edilmiştir (49).

Apoptozis ilk defa 1965 yılında programlanmış hücre ölümü terimi olarak kullanılmıştır. 1972 yılında da Kerr, Wyllie ve Currie tarafından programlanmış hücre ölümünü açıklamak amacıyla kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinden yoğun halde

olan kromatin parçacıklarını incelemiş ve organellerin iyi korunduğunu tespit ederek bunu büzüşme nekrozu olarak ifade etmiştir (50).

Cohen ve ark. aşırı dozda kullanılan steroidlerin timus hücrelerindeki etkilerini 1993 yılında araştırmış ve timus hücrelerinin doğrudan apoptozisi tercih etmediğini, hücre ölümüne sebep olacak genleri aktive ederek hücreleri apoptozise götürdüğünü ifade etmiştir (51). Böylece apoptozisin genlerin sebep olduğu bir hücre ölümü olduğunu ortaya koymuştur (52).

2.6.2. Apoptozisin temel işlevi ve amaçları

Diğer hücelere zarar vermeden, hücreleri kötü bir şekilde etkilemeden ve iz bırakmadan üzerinde çalışılan hücrenin ortadan kaldırılmasıdır. Hücre çoğalması mitozla belirlenirken apoptozis ile de belli bir dokuda bulunması gereken hücre sayısı belirlenir. Bu durumda;

- Embriyonun gelişimi ve başkalaşımı (metamorfoz) sürecindeki gibi, gelişimi esnasında organizmayı şekillendirir.
- Organizmadaki toplam hücre sayısı düzenlenir.
- Virüs bulaşmış olan hücreleri, tümör hücreleri, bağımsız hareket eden ve kendine zarar veren bağışıklık hücreleri gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreleri yok eder ve bunlara karşı kendini savunur (53).

2.6.3. Apoptozisi uyaran sinyaller

- Hücre dışında: Büyüme faktörü ve hormonlar
- Hücre içinde: İyonize radyasyon, viral enfeksiyon, serbest radikaller nedeniyle oluşan oksidatif hasar (54).

2.7. Apoptozisten Hücre İçi Sinyal İletimi ve Metabolik Değişiklikler

Bu güne kadar apoptotik sinyal iletimi ile ilgili tespit edilen bilgiler, hücre içindeki sinyal iletimiyle görevli enzim ve moleküllerin apoptozisteki sinyal iletiminden de sorumlu olduğunu ortaya koymaktadır (51, 55).

Genel olarak hücre içi sinyal iletiminde kullanılan Kalsiyum (Ca^{++}) apoptozisde de kullanılır. Hücre içindeki Ca^{++} iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise sürüklemektedir (56). Sitoplazmada bulunan Ca^{++} iyonlarında bulunan bir miktar artış; c-myc, c-fos ve ısı şok proteinlerini aktive eder ve hücrenin apoptozise uğramasına sebep olur. Kalsiyuma (Ca^{++})

adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir. c-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içindeki c-AMP konsantrasyonunda meydana gelen artışın da bağımsız olarak apoptozise neden olabileceği gösterilmiştir (57). Sitoplazmada artan kalsiyum, aktif olmayan kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktif hale getirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına sebep olur (49).

Kalsiyum iyonu, aktif olmayan durumdaki transglutamaz, proteaz, fosfolipaz, endonükleaz gibi latent enzimleri aktif hale getirerek hücreyi apoptozise sürüklemektedir (58).

2.7.1. Apoptotik hücrede gözlemlenen morfolojik değişiklikler

2.7.1.1. Yüzey organellerinin kaybı

Apoptozise sürüklenen hücrenin diğer hücrelerle ilişkileri biter, hücrenin yüzeyindeki mikrovillüsler ve komşu hücrelerle yaptıkları özel ilişkiler sona erer, hücrenin yüzeyi yuvarlaklaşır (59).

2.7.1.2. Hücre büzülmesi

Apoptotik hücre diğer hücrelere göre sitoplazması daha yoğun ve küçüktür. Hücre organelleri, endoplazmik retikulum hariç yapılarını korur. Sitoplazmadaki yoğunluğun artışı nedeniyle çok sayıda organel gözlemlenir. Hücre zarı dayanıklı olduğu için nekrozdaki gibi bir inflamatuvar reaksiyon görülmez (60).

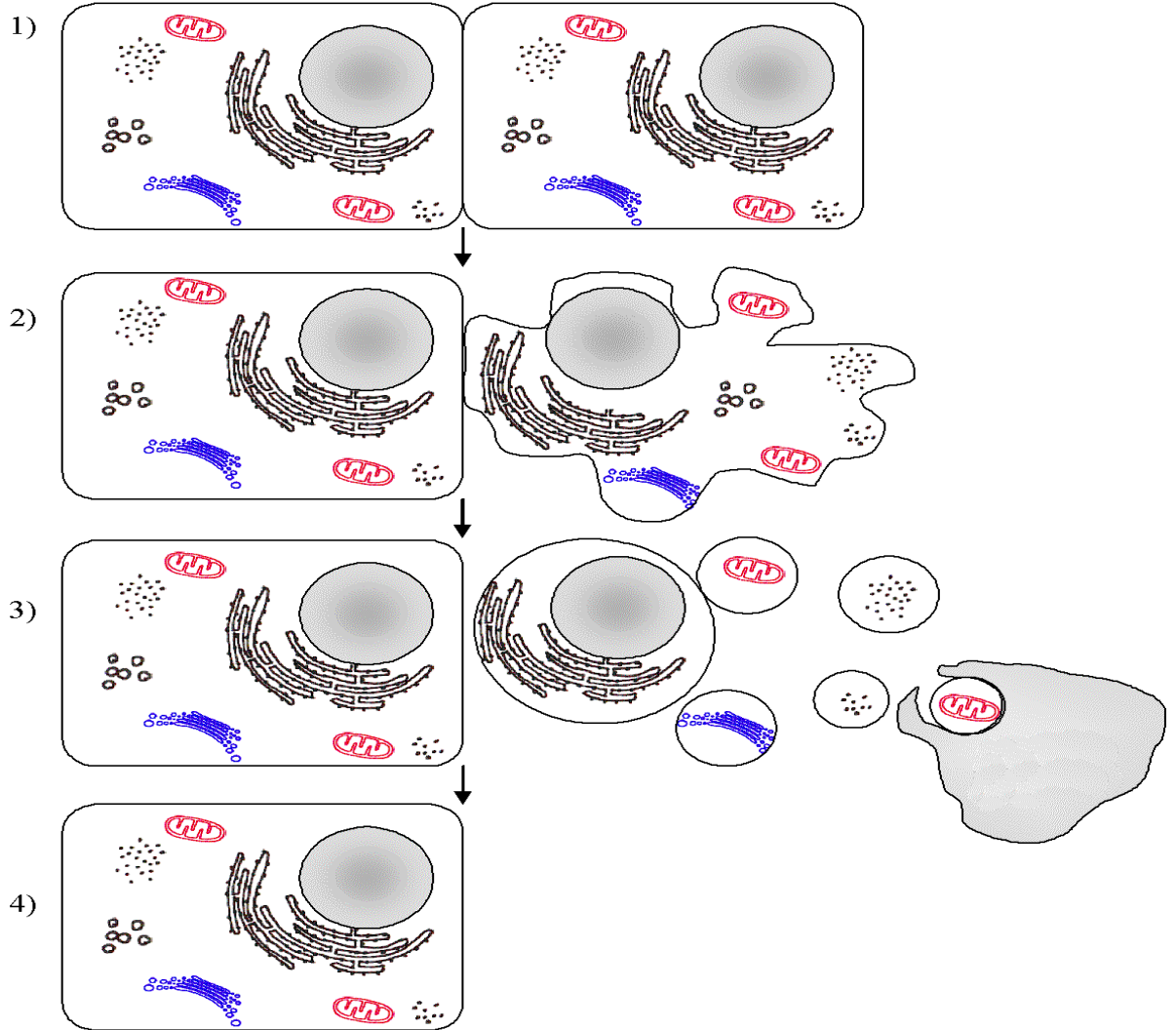
2.7.1.3. Kromatin yoğunlaşması

Genellikle çekirdek büzülür. Kromatin çok yoğun bir hale dönüşür ve parçalar toplu bir hal alır (56). Çekirdek porları tam olarak gözlemlenemez. Çekirdeğin şekli düzensiz hale gelir ve sonrasında küçük çekirdek parçalarına dönüşür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (60).

2.7.1.4. Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerin oluşumu

Öncelikle hücrede tomurcuklanma yüzeye doğru oluşur. Tomurcuklanmalardan bazıları sitoplazma parçacıkları ihtiva eden ve yoğun biçimde paketlenmiş organellerden meydana gelen zarlarla kaplı apoptotik cisimlere dönüşür (61). Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmik baloncuklar olurken fosfotidilserin

apoptotik hücrelerde plazma zarının dış yüzeyinde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevini yürütür (63).



Şekil 2.5: Apoptozisin morfolojik değişiklikleri (63)

2.8. Apoptotik Hücrelerin Tanınması ve Fagositozu

Hücrelerin ölümü nasıl olursa olsun bir şekilde yok olması gerekir. Hem nekrozda hem de apoptoziste ölü olan hücre fagositoz ile ortadan kaldırılır. Apoptozis esnasındaki hücre zarındaki değişiklikler diğer hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi nedeniyle ihtiyaç duyulan

tüm uyarıları verecek biçimde düzenlenir. Meydana gelen apoptotik hücreler, hücrelerarasındaki alana dağılırlar veya lümene dökülürler (64).

Dokuda 4-8 saat görünen apoptotik hücreler sonrasında fagozomlar içinde birkaç saat görülebilir, en sonunda ise sindirilmeyen maddeler olarak bulunur (64, 65).

2.9. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Apoptozis, bazı organların biyolojik gelişimleri sırasında da görülebilir. Apoptozis ayrıca her çeşitte neoplastik oluşumu esnasında; hem gerileme hem de büyüme evresinde rastlamak mümkündür (64). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyaranlara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hipertermi, hafif travma, hafif hipoksi verilebilir (57). Bu nedenle apoptozis spesifik bir uyaran etkisinde kalan hücrenin, bu uyarı aktif olarak hücre için düzenleyici bir cevaptır (56).

Apoptozisin yüksek oranda görüldüğü olaylar şunlardır:

- Metamorfoz ve embriyogenez esnasında programlı hücre ölümü (fetus implantasyonu, gelişim sürecinde yaşanan involüsyon ve organogenezis) (67)
- Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel döngüde endometriyum hücrelerinin parçalanması, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra oluşan meme bezlerinin rejenerasyonu) (56)
- Sürekli olarak artış gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (56)
- Bağışıklık hücrelerinin seçimi (hem T hem de B hücrelerinin sitokin depleksiyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin yok olması) (52)
- Tümörlerdeki hücre ölümü (hem regresyon hem de büyüme evresinde) (52)
- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (53)
- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (52)
- Çeşitli etkenlerden meydana gelen hücre ölümü (radyasyon, hipertermi, hipoksi, travma) (65).

2.10. Apoptozisin Moleküler Düzenleyicileri

Apoptozisin her evresi birçok proteinin birarada çalışmasıyla oluşmaktadır. Bu proteinler, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir. En fazla etkin olan proteinazlar kaspazlardır (68).

2.10.1. Kaspazlar

Sistein proteinazlardır ve aspartik asitten sonraki peptit bağı kırarlar. Çoğu apoptozisde görevli 14 farklı kaspaz bulunmuştur. Kaspazlar, tek polipeptit zinciri halinde sentezlenebilir ve üç tane bölgeleri vardır: kaspaz toplama bölgeleri (CARD), ölüm bölgeleri (DD) ve efektör ölüm (DED) bölgeleridir (68).

Tüm kaspazlar hücre içinde aktif olmayan halde bulunur ve proteolitik işlemlerle kesilerek aktive olurlar. Aktif olmayan kaspazların aktivasyonu; granzim B vasıtasıyla veya aktif olan kaspaz proteininin aktif olmayan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir. Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç gruptan oluşmaktadır; inflamatuvar kaspazlar olarak tanımlanan grup I kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz5), başlatıcı kaspazlar olarak gözlemlenen grup II kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar olarak tanımlanan grup III kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7) (68).

Tetiklenen apoptotik sinyal, ölüm reseptörleri vasıtasıyla kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktifleşmesini sağlayan mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Sonrasında bu kaspazlar diğer kaspazları aktif hale getirerek proteolitik bir kaskada sebep olurlar. Bu kaskad sonrasında efektör kaspazlar olan kaspaz 3,6 veya 7 aktif hale gelir. Bu aktivasyon, hücre iskeleti, nükleaz inhibitörü ve önemli hücre proteinlerinin kesilmesine neden olarak DNA'da parçalanmaya ve morfolojik değişikliklere sebep olur (68).

2.10.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 proteinleri, apoptozisi düzenleme esnasında; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozisin oluşum evresinde ve kaspaz kaskadının aktif hale gelmesinde önemli rol oynar (69, 70).

Bcl-2 ailesi 24' den fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozisi tetikleyici (en çok bilinenler: bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozisi baskılayıcı (en çok bilinenler: bcl-XL, bcl-2, Mcl-1) etkiye sahiptir. Bcl-2 ailesinin üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 bölgelerinden en az birini içerirler (71).

Apoptozisi tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her birini bulunduranlar (Bak, Bax) ve sadece BH4' ü içerenler (bad, bid, bim, PUMA, NOXA) olmak

üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozisi baskılayan üyelerin tümü bölgelerin dördüne de sahiptir. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde farklı bölümlerde bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı sırada, apoptozisi başlatan etkenler değişikliğe uğrar, sonrasında mitokondrinin dış zarıyla bütünleşen ve mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir etken olan sitokrom c'nin serbest bırakılmasına sebebiyet verir. Apoptozis baskılayan etkenler ise aktif değildir (72).

2.10.3. p53

p53; apoptozisi tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini arttıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezini arttıran apoptozise sürükleyen gen ürünleri; hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif bileşenleri ve bcl-2 ailesinin apoptozisi tetikleyen proteinleridir. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı olduğu zaman hasarı onarılabilecek seviyede ise hücre döngüsünü G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA tamir edilemeyecek hasara sahipse Bax'ın sentezini arttırarak apoptozise neden olur (73).

2.10.4. Tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi

TNF, bir sitokindir ve apoptozise, hücre çoğalmasına, bağışıklık sistemindeki değişikliğe, enfeksiyona, alerji ve otoimmün hastalıklara neden olur. TNF, transmembran proteini olarak sentezlenir. TNF' nin zara entegre hali (mem-TNF) proteolitik bölünme ile çözülebilir ve TNF halini alır.

TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör sayesinde gerçekleştirir; tip 1 (TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2). Hücredeki ölüm sinyal iletimi, TNF-R1'in sitoplazmik ölüm bölgesiyle oluşur. Sonrasında kaspaz 8 aktif hale gelir veya mitokondri bağımlı döngüsü aktifleşir ve hücreyi apoptozise götürür (74).

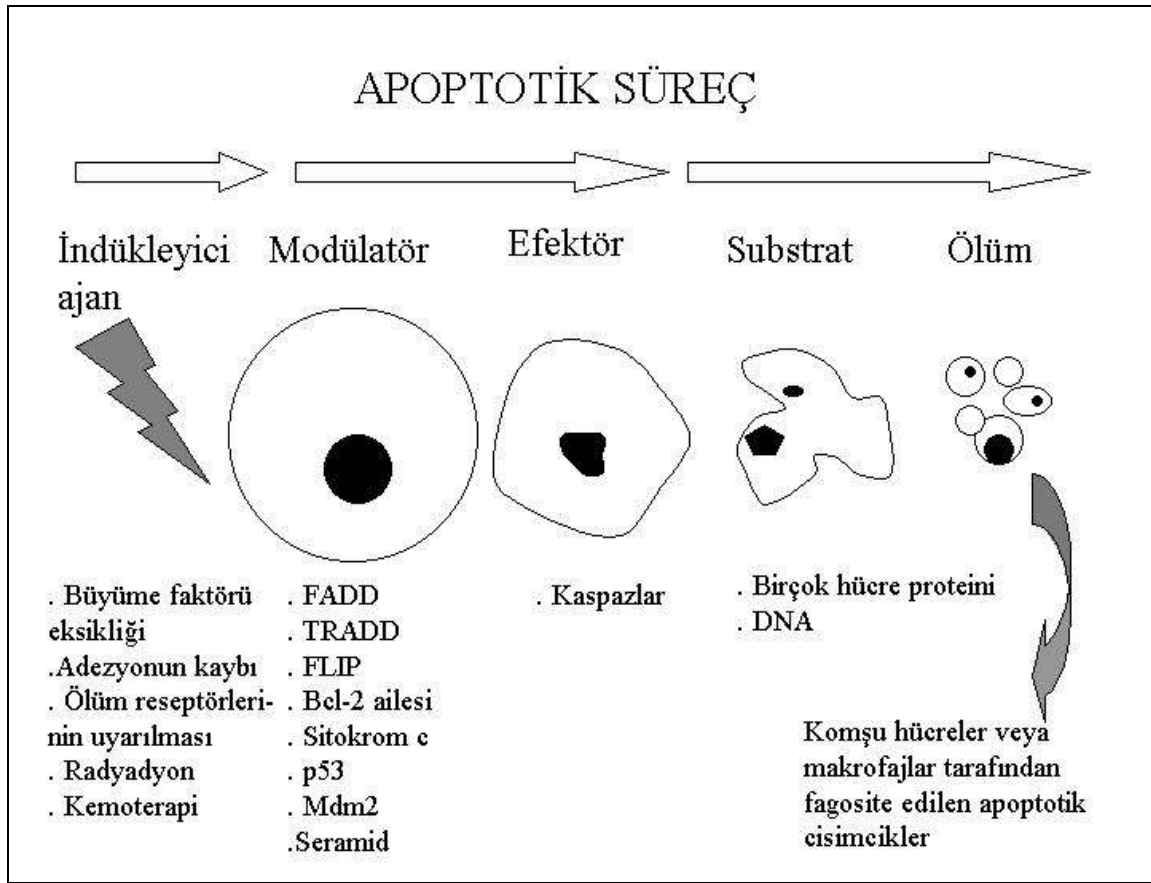
2.11. Apoptozis Sürecinin Değerlendirilmesi

Apoptozis süreci, hücre ölümüne sebep olan uyarı ile başlar ve enerji bağımlı kaskad ile sonlanır. Bu süreç, 4 faz ile anlatılabilir:

- **Erken veya başlangıç fazı:** Apoptozis, apoptotik cevaba sebep olan uyarı ile başlar. Apoptotik cevap, iki şekilde tetiklenebilir. Birincisi ilaçlar, radyasyon veya toksinlerin

sebepler olduğu hücre içi uyarılar ile olduğu gibi hücre dışı bir sinyalin hücre yüzeyindeki reseptörlerini uyarmasıyla da olabilir.

- **Sinyal transferi fazı:** Metabolik durumun ve sinyalin algılanması ve bu metabolik durumun veya algılanan sinyalin hücre ölüm efektör sistemine iletilmesi,
- **Efektör fazı:** Kaspaz sisteminin aktif hale gelmesi,
- **Hücre ölümünden sonraki faz:** Hücrelerin kromatin veya DNA'ların sindirimini ve ölen hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak parçalanmalarını kapsar (68).



Şekil 2.6: Apoptozisin genel görünümü (75)

2.11.1. Apoptozis evresinin hücre içi veya hücre dışı uyarılarla tetiklenmesine göre değerlendirilmesi

Hücreler, hücre içi veya hücre dışında meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktif hale gelmesi ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyarıları ile tetiklenerek

iki farklı yol ile apoptozise sürüklenirler. Yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyaranları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptozis, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyaranlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozistir (71).

2.11.2. Ekstrinsik yol (Reseptör aracılı apoptozis)

Ekstrinsik yolda apoptozis, hücre ölüm reseptörleri olan TNF-R1 ve Fas'ın kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunur (76).

TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile oluşur (76). Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks halini alır. Sonrasında, Fas reseptörü kendisinin sitoplazma içi ölüm bölgesi olarak bilinen FADD ile, TNF-R1 ise kendi sitoplazma içi ölüm bölgesi olan TRADD ile etkileşime girer. Bu nedenle ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) meydana gelir. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (DED) ile birleşerek prokaspaz 3'ü aktif hale getirerek hücre ölümüne neden olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozisin intrinsik yola doğru ilerlemesini sağlar. Tip 1 hücreler (lenfositler), kaspaz 3 aktif yolunu seçerken, tip 2 hücreler (hepatositler), intrinsik yola doğru ilerlemeyi seçerler (76).

2.11.3. İntersik yol (Mitokondri aracılı apoptozis)

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif gerilim, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) sayesinde mitokondriye taşınır.

İntersik yolun en önemli kısmı, mitokondri dış zar geçirgenliğinde meydana gelen artıştır (MOMP) (77).

Nasıl olursa olsun ölüm sinyalinin MOMP oluşumunu gerçekleştirmesi, mitokondriden apoptozisin aktivasyonuna sebep olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), AIF, endonükleaz G ve Omi (homologue of bacterial Htr A) gibi maddelerin salınımına sebep olur. Sitokrom-c, Apaf-1 ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom olarak adlandırılan oligomerik Apaf-1 kompleksi' nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, prokaspaz 3'ü aktive eder.

Aktif kaspaz 3, kaspazla aktif hale gelen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) aktif olmayan hale getirir. Böylece ICAD' ın başladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. CAD, apoptozisin karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar. Smac/diablo; kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'ın yerini değiştirerek, Omi ise IAP'ı geri dönüşümsüz olarak engelleyerek kaspazın aktif hale gelmesini sağlarlar. AIF; doğrudan nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasına neden olur ve endonükleaz G; kaspaz aktivasyonundan ayrı bir şekilde nükleustaki parçalanmaya katılır (78).

2.12. Hücre Döngüsünün Tanımlanması

Bir hücrenin canlılık göstergesi olan birbirinin aynısı iki hücreye bölünmesi olayıdır. Genel olarak, hücreler bölünme sinyali almadıkları zaman hücre döngüsünün aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı olarak bilinen G0 fazında bulunurlar. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis ile oluşmaktadır. Hücreyi bölünmeye götüren çok çeşitli sinyaller bulunmaktadır(örneğin; sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler). Hücre bölünme sinyalini aldığı zaman sinyal ileti kaskadı “signal transduction cascade” olarak bilinen bir ileti mekanizması oluşturur. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre döngüsünü veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nükleusa ulaşıp doğrudan transkripsiyonu böylece hücre döngüsüne sokularak bölünmeye götürülmüş olur. Hücreler mitozise girmeden önce bir hazırlık evresi geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasına da interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S ve G2 fazlarından oluşur. Mitozis ve interfaz beraberce hücre döngüsünü oluştururlar. Bu nedenle, bir hücre döngüsü, fazların oluş sırasına göre; G1, S, G2 ve M fazlarından meydana gelir. G1 ve G2; İngilizce “gap” kelimesinden gelmektedir. M harfi ise mitozis anlamına gelmektedir. G0 fazı normalde hücre döngüsü içerisinde olmayan ve döngüsüyü tamamlayan döngüden çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bölünme uyarısı aldıklarında bu fazdan çıkıp G1 fazına girerler (75).

M evresi: Mitoz aşamasıdır. Hücrenin ikiye bölünmesi (Sitokinez) ile sona erer.

G1 evresi: Mitozla DNA replikasyonu arasındaki evredir. Bu evre de DNA sentezi olmamasına rağmen büyüme devam etmektedir.

S evresi: Bu evrede DNA sentezi yapılır.

G2 evresi: Hücre büyümesi devam ederken mitozla hazırlık olarak gerekli organel ve proteinlerin sentezi yapılır.

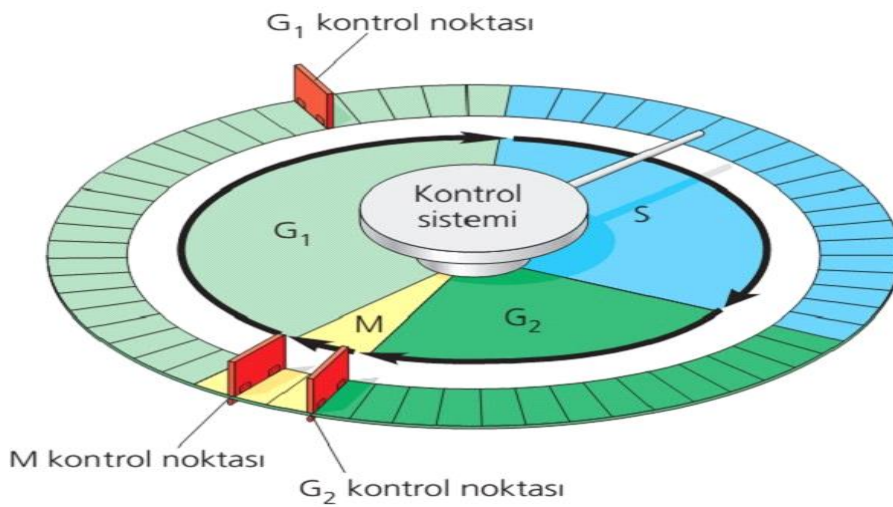
Tüm bu fazlarda bir sonraki evreye geçmeden önce kontrol mekanizmaları çalışmaktadır. Böylelikle herhangi bir hasar olup olmadığı kontrolü sağlanmış olunur. Bunlar;

G1/S kontrol noktası: Mitoz evresinde meydana gelen DNA hasarının varlığı, hücrelerin ilerlemesini G1'deki kontrol noktasında duraklatır. Böylelikle S fazına girmeden hücrenin tamiri için zaman kazanılır. Buradaki mekanizma da hücrenin gardiyanı adıyla tanınan p53 geni görev almaktadır. DNA'nın hasar görmesi durumunda p53 geni görev almaktadır. DNA'daki hasarın durumuna göre hücreye farklı sinyaller verir. Hasar tamir edilebilecek kadar küçükse hücreyi mitozdan çıkararak tamir edilmesine zaman tanır. Eğer hasar yüksekse o zaman hücreye apoptozis sinyali verir.

G2/M kontrol noktası: Bu kontrol noktası, G2 de bulunur. DNA replikasyonu tamamlanmadıkça mitozun başlamasına önler. Tüm genomun replikasyonu tamamlanmadıkça G2 ye geçilemez. Replikasyon tamamlandıktan sonra eğer bir hata olursa G2 de duraklatma söz konusudur ve tamir mekanizmaları çalışmaktadır.

M kontrol noktası: Bu noktada kromozomların mitoz mekiği üzerinde dizilmesini kontrol eder ve yavru hücrelere kromozom setlerinin doğru şekilde aktarılmasını sağlar. Bu kontrol noktası kromozomlar mekik üzerinde her iki yavru hücreye tam bir kromozom seti gidecek şekilde dizilmedikçe kardeş kromatitlerin ayrılmasını önler (79). (Şekil 2.6)

Herhangi bir kontrol noktasındaki aksama yada değişiklik normal hücreden kanserli hücre oluşumuna neden olur. Örneğin G1/S kontrol noktasındaki p53 genin mutasyonu durumunda hasar hücreye iletilmediği ve hücre ölümü gerçekleştirilmediği için hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam eder (79).



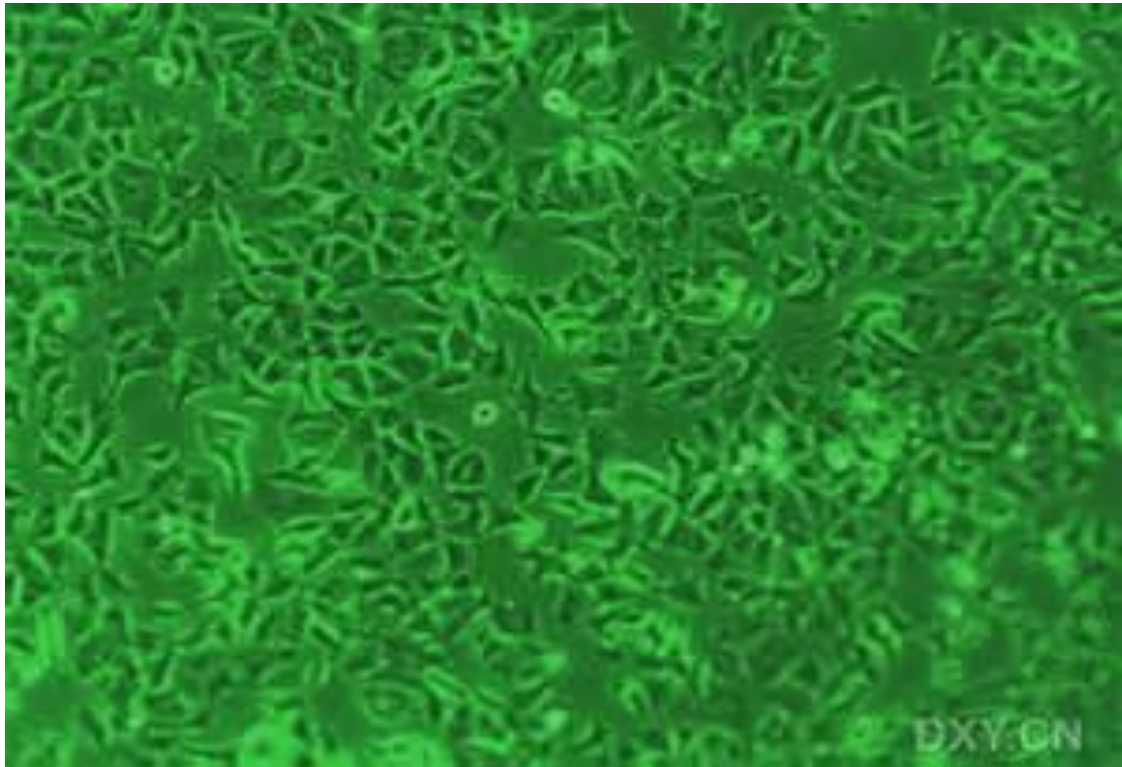
Şekil 2.7: Hücre döngüsü ve kontrol noktaları

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Biyolojik aktivite testleri için kullanılan kimyasallar ve hücreler

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Migh Glucose (Therma)
- Hank's Balanced Salt Solutions (Thermo)
- Fetal Bovine Serum (Sigma)
- Penicilin streptomycin solüsyonu (Thermo)
- Tripsin EDTA (%2.5) (Sigma)
- % 0.5'lik Trypan-Blue (Sigma)
- MCF-7 (insan meme kanser hücre hattı)



Resim 3.1: MCF7 İnsan meme kanseri hücre hattı

3.1.2. Cihazlar

- Spektrofotometre (Biotek, Mquat model, ABD)
- Santrifüj (soğutuculu, Hettich)
- Işık mikroskobu (Nikon, Eclipse E200)
- Biyogüvenlik kabini (Klass 2, Nu-Aire, ABD)
- Magnetik Karıştırıcı
- Karbondioksit (%5) inkübatörü (Sanyo IR Sensor)
- Plate sallayıcı

3.2. Kullanılacak Yöntemler

3.2.1. Hücrelerde kullanılan kültür vasatının hazırlanması

DMEM	500 ml
FCS	50 ml (%10)
Penicilin streptomycin	5 ml

3.2.2. Hücrelerin kaldırılması

Deney için kullanılacak hücre 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortam içeren inkübatör bulunan 75 cm² lik hücre kültür kaplarında (Falcon; BD Biosciences, ABD) kültür yapılarak çoğaltıldı. Burada çoğaltılan hücreler inkübatörden alındıktan sonra kültür kabı içinde bulunan DMEM vasatı vakum ile çekildi. Hücrelerin üzerine 5 ml HBSS eklenerek hücreler yıkandı üzerine 1X’lik Tripsin-EDTA eklenip, 37°C’de 4-5 dakika kadar beklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra Tripsini etkisizleştirmek için 5-10 mL %10 FCS içeren kültür vasatı eklendi. Kültür kabındaki hücreler 50 mL’lik steril tüpe aktarıldı ve 1500 rpm’de 4 dk santrifüj edildi.

3.2.3. Hücrelerin sayılması

Santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki üst faz vakumla alındı. Tüp içinde dibe çöken hücreler homojen bir şekilde dağılım göstermesi için tüpün alt kısmına parmakla hafifçe vurulur. Hücrelerin üzerinde 5 mL hücre kültür vasatı eklenerek homojen bir şekilde

karişması için pipetleme işlemi yapıldı. Hücre sayımı için Eve Automatic Cell Counter cihazı kullanıldı. 10 µL hücre karişımı ve 10 µL Trypan-Blue boyası karişımı hazırlanıp Eve Automatic Cell cihazına yerleştirildi. Elde edilen sonuca göre % 10 FCS li DMEM ile seyreltilen hücreler 24 bölmeli kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. Hücre % 70 yoğunluk elde edilene kadar yaklaşık 24 saat bekletildi.

3.2.4. Bitkilerin toplanması ve özütlerinin hazırlanması

Çalışmada Iris familyasına ait 3 bitki özütü kullanılmıştır. Bu bitkiler toplanarak, oda sıcaklığında kurutuldu. Sonra bir tokmakla öğütüldü. Her 2,5 g toz bitki özütü 25 ml metanal ile ekstrakte edildi. Szlmeden önce oda sıcaklığında gece boyunca bekletildi. Szlmeden sonra, metanol buharlaştırıldı ve işlenmemiş özütler tartıldı. İşlenmemiş özütlerin 0.1 gr dimetil slfoksitte (DMSO) 10 mg/ml stok konsantrasyon olacak şekilde çözdürüldü. Sitotoksik testlerin yapımına kadar -20 C de saklandı.

Bitkilerin toplanması ve özütlerinin hazırlanması Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ğretim yesi Prof. Dr. Bilge şener tarafından yapıldı.

3.2.5. Bitki ekstraktları ile muamele

Deneyde kullanılacak olan konsantrasyonlar (150, 100, 50, 25 µM) her bitki özütü için ayrı ayrı hazırlandı. Kontrol grubu olarak DMEM içerisine test maddeleri yerine en yüksek konsantrasyondaki (150 µM) bitki özütü çözeltisi kadar steril DMSO ilave edildi.

24 saat sonunda % 70 yoğunluk elde edilen hücrelerin zerindeki DMEM ortamdan uzaklaştırıldı. Belirlenen kuyucuklara hazırlanan konsantrasyonlardaki karişımlardan her bir kuyucuğa 500 µl olacak şekilde koyuldu. Karişımlar hücrelere verildikten sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı

3.2.6. Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Canlı hücre sayısı, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) canlı hücre tarafından alınarak mitokondrial enzimler tarafından indirgenmesine dayanan boyama yöntemiyle belirlendi.

- Bu amaçla hücrelerin üzerindeki kültür vasatları alındı, yerine 1mg/ml MTT içeren SF her bir kuyucuğa 500 µM olacak şekilde konuldu, hücreler 45 dakika süre ile inkübe edildi.
- Daha sonra MTT solüsyonu atılarak yerine her bir kuyucuğa 500 µl olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. 2 dakika plate karıştırıcı kullanılarak karışması sağlandı
- Renk değişikliği görülen kuyucuklardan 100 µM alınarak ELİZA okuyucu hücre kültür (96 well) kaplarına alındı.
- Değişen renkler spektrofotometre ile 550 nm’de değerlendirildi. Bitki özütlerinin hücrelerin canlılığı üzerinde etkili olup olmadığı ve etkili ise hangi dozun etkin doz olduğu belirlendi. Bu aşamadan sonra yapılacak olan tüm çalışmalar etkin doz üzerinden yürütüldü.

3.2.7. Apoptozisin değerlendirilmesi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyde zar lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne taşınmış olur. Bu yer değiştirme hücre zar bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyinde olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesine neden olur. FITC-Anneksin-V karışımının hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86).

3.2.8. Apoptozis için akım sitometrisi yöntemi

Etkin doz Iris histrio için 100 µg/ml, Iris suaveolens ve Iris unguicularis için ise (150 µg/ml), olarak belirlenmesiyle bu dozlara bağlı 24 saat muamele edilen hücreler (1.000.000 hücre/ numune başına) (10^5 - 10^6 hücre/ml) (MCF7) 2 kez soğuk PBS ile 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek yıkanmışlardır. Daha sonra çöktelinin üzerine 500 µl “Bağlama çözeltisi (Binding Buffer)” eklendi. Bu süspansiyonun 100 µl si 5 ml lik tüplere konuldu. Bunun üzerine 5 µl kullanıma hazır Anneksin-V PE çözeltisi ve 5 µl 7AAD eklendi. Bu çözelti hafifçe karıştırılıp tüpler buz üzerinde 15-20 dakika karanlıkta inkübe edildi. inkübasyondan sonra 1500 rpm de

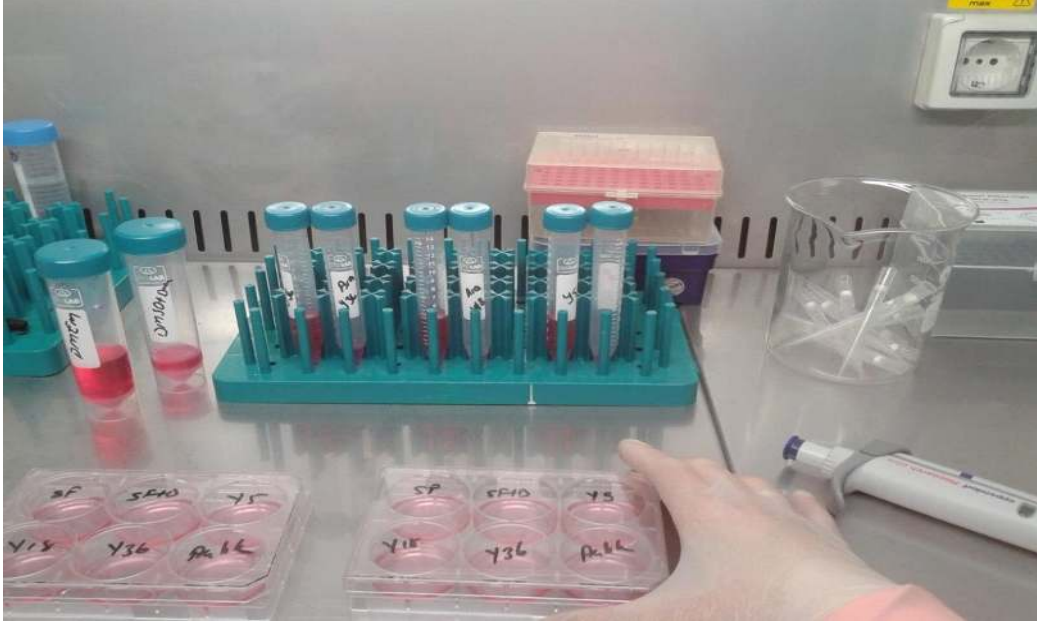
5 dk santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı döküldü ve hücrelerin 500 µl buz üzerine bağlama çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında “Coulter” Akım Sitometre’de analiz edildi.

3.2.9. Hücre döngüsü için akım sitometrisi yöntemi

- Etüvden alınan flaskların içerisindeki hücreler tripsin yardımıyla kaldırılarak 15 ml’lik falkonlara alındı ve 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml besiyeri eklendi.
- Hücreler Buffer Solusyon ile yıkanarak 5 dk 1500 rpm de santrifüj edilerek supernatant döküldü. Bu işlem 2 kez tekrar edildi.
- Her tüpe çöktürülen kısım üzerine 250 µl solusyon A (tripsin tamponu) eklenerek el ile hafifçe çalkalandı.
- Tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Daha sonra her tüpe 200 µl solüsyon B (tripsin inhibitörü ve Rnaz tamponu) eklenerek yine hafifçe çalkalandı.
- Tüpler tekrar 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Daha sonra tüplere 200 µl +4 °C den çıkartılan solüsyon C eklendi ve 10 dk +4 °C’de karanlık ortamda bekletildi.

En sonunda da örnekler akım sitometride analiz edilmiştir. Mod Fit programı kullanılarak verilen ilacın etkisi değerlendirildi.

Çalışmalar bitki ekstraktlarının hazırlanması hariç Gaziantep Üniversitesi Genetik Tanı Laboratuvarında yapılmıştır.



Resim 3.2: Apoptozis ve hücre döngüsü deney aşaması

3.2.10. İstatistiksel değerlendirme

Deneylerin verilerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi SPSS.18 programında Student t- testi veya ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı 0.05 olarak alındı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Iris Unguicularis, Iris Suaveolens ve Iris Histrio Bitkilerinin MCF-7 Hücre Canlılığına Etkileri

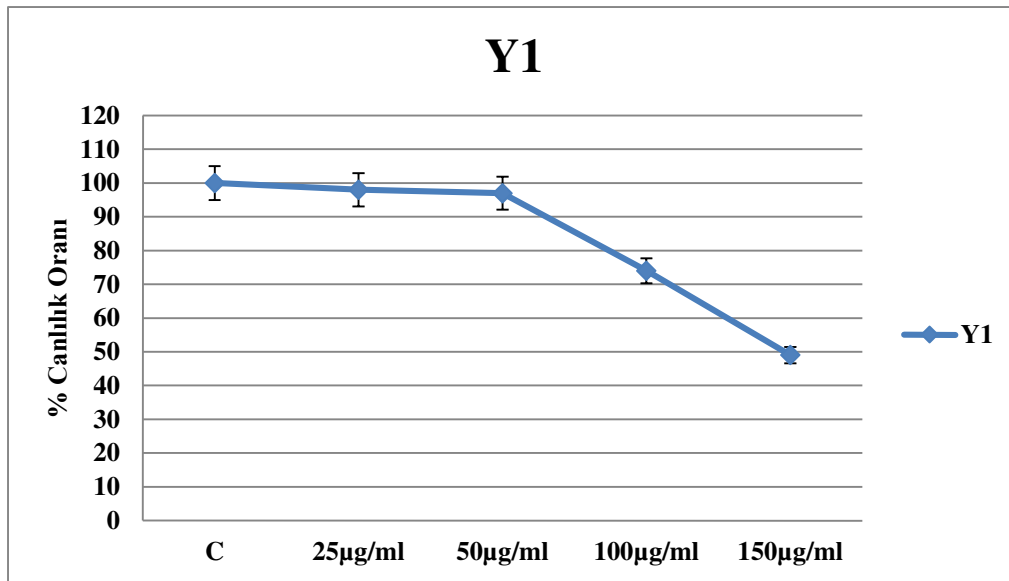
Tüm sonuçlar için bitki isimlerine gösterimde kolaylık olması amacıyla kodlamalar yapılmıştır.

Y1: Iris Unguicularis

Y2: Iris Suaveolens

Y3: Iris Histrio

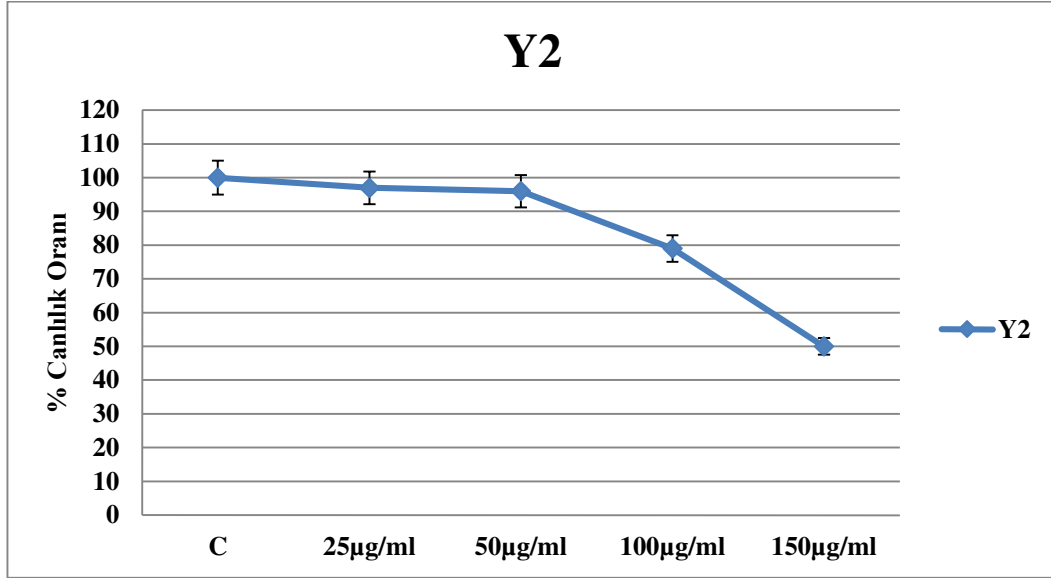
olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.1: Y1 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

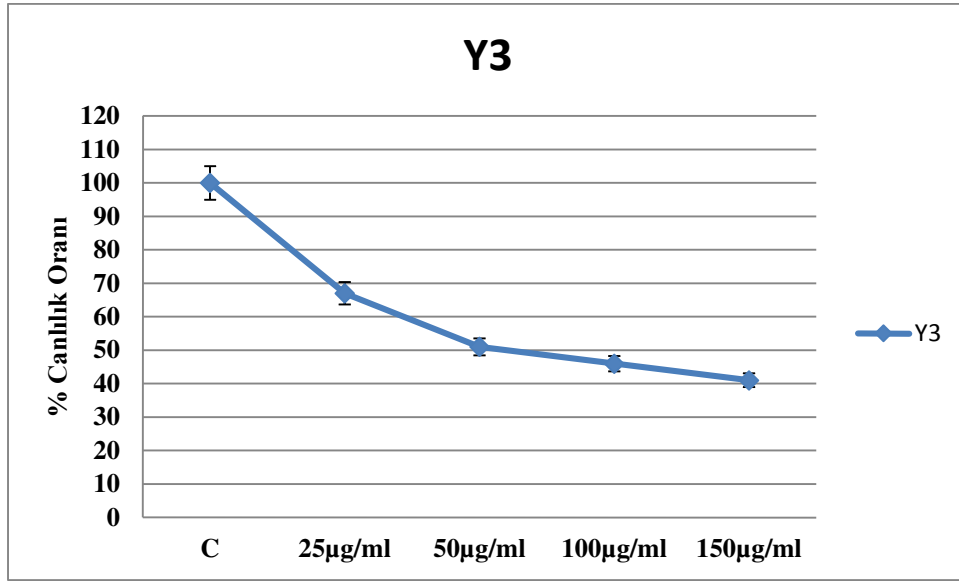
Hücreler 24 saat artan konsantrasyonlarda bitki ekstraktı ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak alınmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan DMSO'nun en yüksek dozda bile (150µg/ml), önemli ölçüde aktiviteye sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak **Y1** bitki ekstraktının

çeşitli konsantrasyonlarda hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). Sonuç olarak da **Y2** bileşiğinin yüksek dozlarda antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2: Y2 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Hücreler 24 saat artan konsantrasyonlarda bitki ekstraktı ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak alınmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan DMSO'nun en yüksek dozda bile (150µg/ml), önemli ölçüde aktiviteye sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak **Y2** bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ($p < 0.05$). Sonuç olarak da **Y2** bileşiğinin yüksek dozlarda antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.



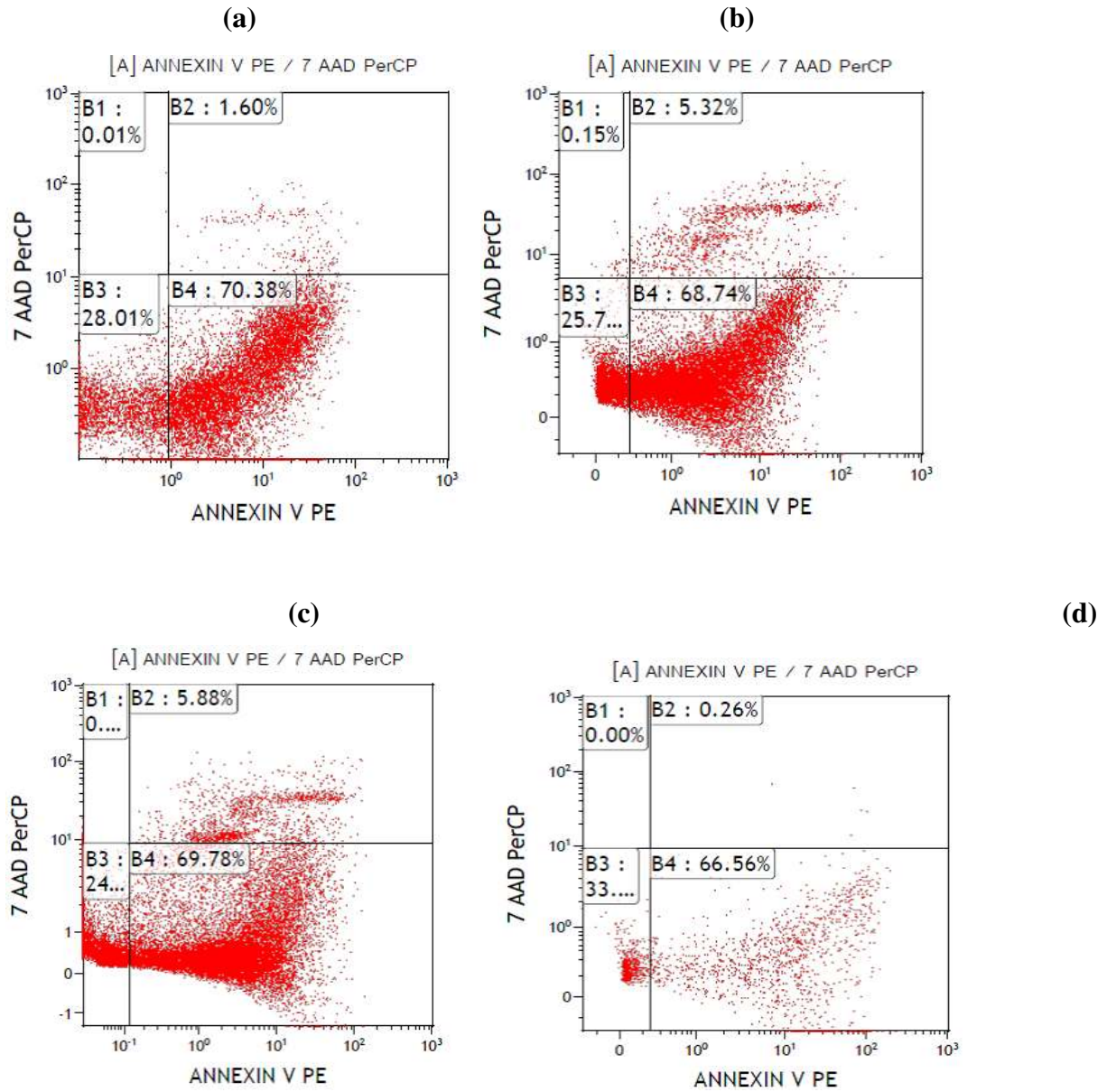
Şekil 4.3: Y3 bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarının MCF7 hücre canlılığı üzerindeki etkisi.

Hücreler 24 saat artan konsantrasyonlarda bitki ekstraktı ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak alınmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan DMSO'nun en yüksek dozda bile (150µg/ml), önemli ölçüde aktiviteye sahip olmadığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak **Y3** bitki ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). Sonuç olarak da **Y3** bileşiğinin yüksek dozlarda antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Daha sonraki çalışmalar için belirlenen bitki ekstraktlarının MCF7 hücresi üzerindeki %50 ölüm oranını (IC_{50}) konsantrasyon değerleri *Iris unguicularis* ve *Iris suaveolens* için 150 µg/ml olarak *Iris histrio* bitkisi içinde 100 µg/ml olarak belirlenmiştir. Sonraki çalışmaları bu konsantrasyon değerlerine göre yapılmıştır.

4.2. *Iris Unguicularis*, *Iris Suaveolens* ve *Iris Histrio* Bitkilerinin Erken Apoptoz Üzerine Etkileri

Her üç bitki ekstraktının erken apoptoz üzerine olan etkileri Annexin-V ile işaretlenmiş hücrelerin akım sitometri ile analizi sonucunda belirlenmiştir. Ölçüm sırasında deney ortamına propidyum iyodür (PI) eklenmesi ile de geç apoptotik ya da nekrotik hücre oranları belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: (a) Kontrol grubunun MCF7 hücreindeki apoptotik etkisi, (b) Y1 bitki ekstraktının MCF7 hücreindeki apoptotik etkisi, (c) Y2 bitki ekstraktının MCF7 hücreindeki apoptotik etkisi, (d) Y3 bitki ekstraktının MCF7 hücreindeki apoptotik etkisi

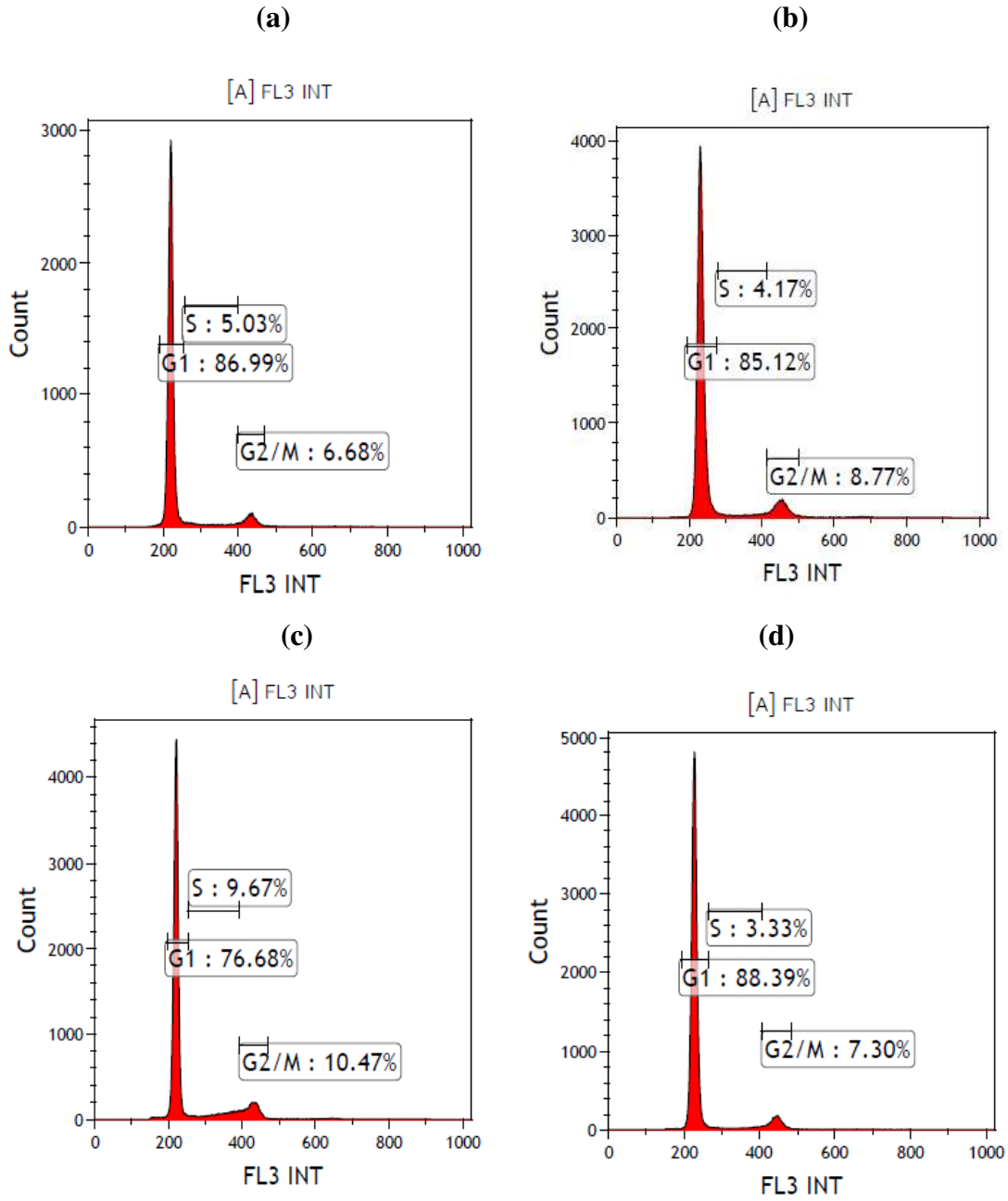
Tablo 4.1 de kullanılan üç bitki ekstraktı ile 24 saat inkübasyon sonucunda elde edilen apoptotik hücre oranı gösterilmiştir. Kontrol olarak DMSO kullanılarak elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 4.1: Iris familyasına ait üç bitki türü ile maruz bırakılan erken apoptotik MCF7 hücrelerinin belirlenmesi

% (24 saat)	DMSO	Iris Unguicularis (150 µg/ml) (Y1)	Iris Histrio (100 µg/ml) (Y3)	Iris Suaveolens (150 µg/ml) (Y2)
Tanımlanmamış hücre oranı	0.01	0.15	0.0	0.0
Canlı Hücre	28.01	25.7	33.0	24.0
Erken apoptotik hücre oranı	70.38	68.74	66.56	69.78
Geç apoptotik veya nekrotik hücre oranı	1.60	5.32	0.26	5.88

4.3. Iris Ungularis, Iris Suaveolens ve Iris Histrio Bitkilerinin MCF-7 Hücre Döngüsüne Etkisi

Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitkilerinin MCF-7 hücre döngüsüne etkisi akım sitometri ile ölçülmüştür. Kontrol grubu DMSO nun MCF7 hücre döngüsüne etkisi üzerinden yapılmıştır.



Şekil 4.5: (a) Kontrol grubunun (DMSO) hücre döngüsüne etkisi grafiği, (b) Y1 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi grafiği, (c) Y2 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi grafiği, (d) Y3 bitki ekstraktının hücre döngüsüne etkisi grafiği.

Tablo 4.2: Iris familyasına ait olan üç bitki ekstraktının MCF7 hücresi üzerinde akım sitometri ile hücre döngüsünün değerlendirilmesi

	Kontrol	Iris Histrio (100 µg/ml) (Y3)	Iris Unguicularis (150 µg/ml) (Y1)	Iris Suaveolens (150 µg/ml) (Y2)
G1	86.99	76.68	85.12	88.39
S	5.03	9.67	4.17	3.33
G2/M	6.68	10.47	8.77	7.30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserinin, 2008 yılı itibariyle diğer kanser türlerine oranla kadınlarda görülme oranının %23' ünü, kanser nedeniyle gerçekleşen ölüm oranının %14 'ünü oluşturduğu tespit edilmiştir (94,95). Meme kanserinin teşhis ve tedavisinde kaydedilen gelişmelere rağmen bu hastalıktan kaynaklanan ölüm oranları son 20 yıl içerisinde artış göstermiştir (96,97).

Bitkiler günümüzde antikanser, antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antianaljezik, antiviral vs. gibi biyoaktiviteler için birçok araştırmacı tarafından taranmış ve rapor edilmiştir. Özellikle günümüzde önemli bir hastalık olan kanser ve kansere neden olan bileşiklerden serbest radikallerin giderilmesi için bitkilerin özütleri kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur (19, 20, 21, 22). Iris türleri kanser, inflamasyon ve virüs enfeksiyonları gibi çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için yararlı olan etkilere sahiptir (25, 26). Iris familyasına ait olan *Iris tectorum*, *Iris germanica*, *Iris missouriensis*, *Iris nertschinskia* ve *Iris albicans* bitki türleri onkoloji alanındaki yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla araştırmacıların dikkatini çekmektedir (27, 28, 29, 30, 88). Fakat Türkiye'de yetişen Iris türlerinin antikanser etkileriyle ilgili hiç çalışma bulunmamaktadır.

5.1. Sitotoksite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İlk olarak Mosmann tarafından uygulanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir (92,93).

MTT, hücreler tarafından aktif olarak absorbe edilen ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir. Biz bu çalışmamızda, 24 saat süreyle 25, 50, 100, 150 µg/ml konsantrasyonlarda seri dilüsyonu yapılan Iris familyasına ait *Iris unguicularis*, *Iris suaveolens* ve *Iris histrio* bitki ekstraktlarıyla inkübe edilen MCF7 meme kanseri hücrelerine uyguladığımız MTT analizi sonuçlarından, hücre canlılığının kontrol grubuna göre azaldığını tespit ettik. *Iris unguicularis* (IC₅₀ 50.8 µM) bitkisinin 24 saat inkübe edilen MCF7 hücresinin en düşük dozda (25 µg/ml) %98 iken konsantrasyonun arttırılmasıyla (150 µg/ml) %49 olmaktadır. *Iris suaveolens* (IC₅₀ 49.40 µM)

bitkisinin ise 24 saat inkübe edilen MCF7 hücresinin en düşük dozda (25 µg/ml) %97 iken konsantrasyonun arttırılmasıyla (150 µg/ml) %50 olmaktadır. En son olarak Iris histrio (IC₅₀ 41.42 µM) bitkisinin sonuçlarında ise belirlediğimiz en düşük konsantrasyonda (25 µg/ml) %67 bulunurken 100 µg/ml konsantrasyonda %46 150 µg/ml konsantrasyonda ise %41 olarak belirlenmiştir. Iris histrio bitki ekstraktının diğer bitki ekstraktlarına göre sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. %50 hücre ölüm oranının (IC₅₀) neden olduğu konsantrasyon değeri Iris unguicularis ve Iris suaveolens bitkileri için 150 µg/ml, Iris histrio bitkisi için de 100 µg/ml olarak belirlenmiştir.

5.2. Erken Apoptozis ve Hücre Döngüsüne Etkilerin Değerlendirilmesi

Kemoterapik ilaçlarının birçoğu kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmasını tetikleyerek anti-tümör aktivitenin başlamasına neden olmaktadır. Bu çalışmada sitotoksik etkileri belirlenen Iris familyasına ait olan Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitki ekstraktlarının erken apoptotik hücre oranları ölçülmüştür. %50 ölüm oranı (IC₅₀) üzerinden belirlenen konsantrasyonlar kullanılarak deneylerimiz devam etmiştir. Bitki ekstraktlarının MCF7 hücre apoptozu üzerine olan etkileri, apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi ile hücre hücre dışı yüzeyine hareket eden fosfatidilserine karşı yüksek afiniteye sahip Annexin-V' in bağlanması ile araştırılmıştır. 24 saat inkübasyon süresinde bitki ekstraktlarının MCF7 hücresinin erken apoptoza etkileri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür. Tablo 4.1 de görüldüğü üzere kontrol grubunun erken apoptoza etkisi %70.38 bulunurken; Iris unguicularis bitkisinde erken apoptoza götüren oran %68.74, Iris suaveolens bitkisinde erken apoptoza götüren oran %69.78 ve Iris histrio bitkisinde bu değer %66.56 olarak belirlenmiştir. Birbirine çok yakın olan bu değerler aslında bitki ekstraktlarının erken apoptoza etkisinin olmadığını göstermiştir.

Kanser bir hücre döngüsü kontrolü başarısızlığıdır. Normal hücrelerde hücre döngüsü mekanizmasının düzensiz çalışması kanser de dahil olmak üzere pek çok soruna neden olmaktadır. Bu çalışmada belirlenen Iris familyasına ait olan Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitki ekstraktlarının MCF7 hücre döngüsüne etkileri akım sitometri yöntemi ile ölçülmüştür. Hücre döngüsünün farklı aşamalarındaki hücreler DNA içeriklerine göre ayırt edilebilir. Floresan veren nükleik asit boyaları yardımıyla hücredeki DNA' nın ölçümü ve döngüdeki hücre popülasyonunun oranı hesaplanabilmektedir. Hücre döngüsü evreleri; G0 (gap 0), G1, S (sentez), G2(Post sentez) ve M (mitoz). G0 ve G1 fazlarındaki hücreler normal DNA içerirler. S fazına giren hücre DNA sentezi yapmaya başlamıştır. G2 fazında hücre iki

kat DNA içermektedir. M fazında hücre ikiye bölünerek hücre döngüsünü tamamlar. Normal miktarda DNA içeren hücreler diploid, anormal artmış veya azalmış DNA içeren hücreler anöploid olarak isimlendirilir. Akım sitometride hücrelerin DNA içeriği, normal hücrelerin DNA içeriğine göre hesaplanır. Eğer incelenen hücreler normal DNA değerine sahipse yani diploid iseler DNA içeriği 1'dir. Bu değerden sapmalar anöploid hücrelerin varlığını gösterir. S fazındaki ve G2/M fazındaki hücrelerin yüksek oranda olması incelenen hücrenin proliferasyonunu göstermektedir. Anöploid DNA değerine sahip veya proliferasyon aktivitesi yüksek tümörlerin genel olarak kötü prognoza sahip oldukları bilinmektedir (89, 90,91). Hücre döngüsü sonuçlarına bakıldığında, Iris unguicularis, Iris histrio ve Iris suaveolens bitki ekstraktları kontrol grubuyla G1, S ve G2/M fazları ayrı ayrı karşılaştırıldığında aslında anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir ($p>0.05$). Tablo 4.2 de değerler arasındaki farklar ayrıntılı bir şekilde görebilirsiniz. Yapılan bitki ekstraktlarımızın erken apoptozise ve hücre döngüsüne etkileri kontrol grubuyla farkları bize antikanser etkilerinin olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmayla Iris familyasına ait olan Iris unguicularis, Iris suaveolens ve Iris histrio bitki ekstraktlarının belirlenen en yüksek konsantrasyon (150 µg/ml) değeri artırılarak ve farklı saat aralıklarıyla da deneyler tekrarlanılabilir. Yapılan deneylerle de bu sonuçlar daha da kuvvetlendirilir veya daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca genel bilgiler kısmında belirtildiği gibi Iris familyası bitki türleriyle onkoloji alanında ilgi çekmektedir. Farklı Iris türleriyle bu çalışmanın desteklenmesi antikanser ilaç teknolojisine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Şener B, Sevim D, Şenol FS, Öztuzcu S, Kaya E, Erkan K, Erdoğan Oİ. Studies on cytotoxic activities of Iris L. genus of Turkish origin. 14th Asian Symposium on Medicinal Plants, Spices and Other Natural Products (ASOMPS-XIV)-50th Anniversary Event, December 9-12, 2013, Karachi-Pakistan (Online Lecture).
2. Baloğlu E. Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs. Dissertation submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry. 2001.
3. Sinici İ, Tropak M, Mahuran D, Özkara H. Assessing the severity of the small in frame deletion mutation in the α - subunit of β - hexosaminidase A found in the Turkish population by reproducing it in the more stable β -subunit. Journal of Inherited Metabolic Disease. 2004; 27(6): 747-756.
4. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2004; 36(12): 2405-2419.
5. Merrill R, Weed D. Measuring the public health burden of cancer in the United States through lifetime and age-conditional risk estimates. Annals of Epidemiology. 2001;11(8):547-553.
6. Göğüs Kanseri. <http://www.cancer.gov/types/breast>, . Erişim Tarihi: 03.12.2015.
7. Magee PJ, Rowland LR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. British Journal of Nutrition. 2004;91(4):513-531.
8. Hai LR. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action, Journal Of Nutrition. 2004;134:3479-85
9. Göğüs Kanseri. <http://breastcancer.gov.tr> . Erişim Tarihi: 10.12.2015.
10. Güler, E. Investigation of Chemopreventive Properties of Urtica Dioica L., in MCF-7 and MDA231 Breast Cancer Cell Lines. ODTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2001, Ankara (Prof. Dr. Mesude İşcan).
11. Brady JF, Li DC, Ishizaki H, and Yang CS. Effect of diallyl sulfide on rat liver microsomal nitrosamine metabolism and other monooxygenase activities. Cancer Res. 1988;48:5937-5940.
12. Hollis J, Lovas F, Jewell P, and Coudert L. Interstellar antifreeze: Ethylene Glycol. The Astrophysical Journal. 2002; 571: 59-62.
13. https://www.dkfz.de/en/tox/c010-2-projects/list_assays.html Erişim Tarihi: 03.11.2015.

14. Sun Y. Free raddicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* 1990;8:583-599;
15. Thompson LU, Boucher BA, Cotterchio M, and Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada including isoflavones, lignans and coumestan. *nutrition and Cancer.* 2006; 54(12):184-201.
16. Niwinska A, Hormanal aspects of nipple cancer. *Ginekol Pol.* 1997; 68(11):558-562.
17. Baytop T. *Therapy with Medical Plants in Turkey* İstanbul University Press, 1999.
18. Winston D, Dattner A. *The Amercan System of Medicine Clinics in Dermatology.* 1999; 17 (1):553-556.
19. Xu B, Chang S. Comparative study on antiproliferation propertier and cellular antioxidant activities of cammonly cansumed food egumes against nine hume cell lines. *Food Chem.* 2012; 134:1287-1296.
20. Yumrutaş Ö, and Saygıdeğer S. Determination in vitro antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish et Mey. And *Lamium amplexicaule* L. From south east of Turkey. *Full Length Reseaech Paper.* 2010;4(20):2164-2172.
21. Yan L, Louboianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, San Miguel P, Bennetzen J, Echenique V, and Dubcovsky J. The wheat VRN2 gene is a flowewing repressar down-regulated by vernalization, *Science.* 2004;303:1640-1644.
22. Moongkarndi P, Kasem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. antiproliferation, antioxidantion and induction of apoptosis by *garcinia mangostana* on SKBR3 humanbreast concer cell line. *J Ethnopharmacol.* 2004;90:161-166.
23. Wang Y, Zhang S, Lu H, Yang B, Ye L, and Zharg R. A C₂₁ – steroidal glycoside isolated from the roots of *Cynanchum Auriculatum* induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Evidence Based Complement Alternative Medicine.* 2013; Article ID 180839.7
24. Sachsenmaier C. Targeting protein kinases for tumor therapy *Onkologie.* 2001; 24:7315-28
25. Han I. Traditioral Chinese medicine and the search for new antineoplastic drugs. *J Ethnopharmacol,* 1988;24:1-17.
26. Steinegger E, Hansel R. *Lehrbuch der phamokognosie und phytopharmazie.* Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988;414-421.
27. Wong S, Oshima Y, Pezzuto J, Fong H, and Farnsworth N. Isolation and characterization of a new triterpene from *Iris missouriensis*. *J. Nat. Prod.* 1986; 49:330-333.

28. Tan T, Wen J. Pharmaceutical achievement of Shen Nong Ben Ciao Jing. Chin Pharm J. 2001; 70: 285-289.
29. Wollenweber E, Stevens J, Klimo K, Knauf J, Frank N, and Gerhauser C. Cancer chemopreventive in vitro activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. Planta: Med. 2003; 69:15-20.
30. Fang R, Haughton P, Hylands P. Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* human cancer cell lines. Journal Ethnopharmacol. 2008; 118: 257-63.
31. Wilsom CA. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. Taxon. 2001; 60 (1): 27-35.
32. Uphof J. Dictionary of Economic Plants. 2. Ed / Reprint. Lehre. Verlag von J Cramer. 1968;284.
33. Wu YX, Xu L. X. analysis of isoflavones in *Belamcanda chinensis* and *Iris Tectorum* by square wave voltammetry. Acta Pharmarmatevica Sinica. 1992; 27: 64-68.
34. Krick W, Marner F, Jaenicke L. Isolation and structure determination of the precursors of alpha-irone and gamma-irone and homologous compounds from *Iris pallida* and *Iris florentina*. Zeitschrift für Naturforschung. 1983;38:179-184.
35. Seki K, Tomihari T, Haga K, Iristectorene B, a monocyclic triterpene ester from *Iris tectorum*. Phytochemistry. 1994;36(2):433-438.
36. Morita N, Shimokoriyama M, Shimizu M, Studies on the Medicinal Resources. XXXII. The Components of Rhizome of *tectorum Maximowica* (Iridaceae). Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1972;20(4):730-733.
37. Farag S, Backheet E, El-Emary N, and Niwa M. Isoflavonoids and flavone glycosides from rhizomes of *Iris cartholiniae*. Photochemistry. 50 (8): 1407-1410.
38. Williams C, Harborne J, Colasante M. Flavonoid and xanthone patterns in bearded *Iris* species and the pathway of chemical evolution in the genus. Biochemical Systematics and Ecology, 1997; 25(4):309-325.
39. Harborne J, Williams C. The phytochemical richness of the Iridaceae and its systematic significance. Annali Di Botanica. 2000; 58: 43-50.
40. Kassak P. Secondary metabolites of the chosen genus *Iris* species. Acta Univ. Agric. Et Silv. Mendel. Brum. 2012; 8: 269-280.
41. Kindersley D. RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants. United Kingdom. 2008; p. 1136. ISBN 1405332964.
42. AGS Plant Encyclopedia-Iris unguicularis. Alpine Garden Society. Retrieved 2013.

43. Rahman A, Harrem S, Choudhary M, Şener B, Abbaskhan A, Siddiqui H, Anjum S, Orhan I, Gürbüz I, and Ayanoğlu F. New and known constituents from *Iris unguicularis* and their antioxidant activity. *Heterocycles*. 2010; 82 (1): 813-824.
44. Mathew B. Flora of Turkey and East Aegean Islands. *Iris L*. In: Davis, P.H. (Ed.). University Press, Edinburgh. 1984; 8: 381-382, 393.
45. Marner F, Krick W, Gellrich B, Jacnick L, Winter W. Iridogermanal and iridogermanal: two new triterpenoids from rhizomes of *Iris germanica* L. *The Journal of organic chemistry*. 1982; 47 (13): 2531-2536.
46. Rahman A, Nasim S, Baig I, Orhan I, Şener B, Ayanoğlu F, Choudhary M. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. *Helvetica Chimica Acta*. 2003; 86: 3354-3362.
47. Hacıbekiroğlu I, and Kolak U. Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytotherapy Research*. 2011; 25: 522-529.
48. *Iris Histrio*. <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/ReticulataIris>
Erişim Tarihi: 03.12.2015.
49. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIM. Res*. 1991; 3: 75-78.
50. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J. Cancer*. 1972;26:239-245.
51. Cohen J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993; 15: 35-43.
52. Cohen J. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993; 14: 126-130.
53. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies. *Türk Kardiyoloji Dern. Ars*. 2008; 36: 120-130.
54. <http://www.tkd.org.tr>. Erişim Tarihi: 03.11.2015.
55. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biology*. 1995;6:45-52.
56. Geoffrey M, and Robert E. *The Cell a molecular Approach*. Boston, ASM Press. 2004.
57. Bellamy C, Malcomson R, Harrison D, Wyllie A. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis, *Cancer Biology*. 1995; 6:3-16.
58. Earnshaw W. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 1995;7:337-343.
59. Wyllie A. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284: 555-556.

60. Balakumran A, Champbell G, Maslen M. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;139: 122-127.
61. Yokohama S, Hirano H, Wakimaru N, Sarker K, Kuratsu J. Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro. *Neura Oncology*. 2001;3:22-28.
62. Lu J, Ashwell K, Ken W, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*. 2000;25: 1859-1866.
63. Apoptosisdeki morfolojik Değişiklikler.
http://old.tdk.org.tr/pages.asp?pg=:dergi/dergi_content&plng=tur&id=tur&id=1643&dosya=159 .Erişim Tarihi: 04.12.2015.
64. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am. J. Pathol*. 1995; 146: 3-15.
65. Schwartzman R, Cidloski J. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review*. 1993;284:555-556.
66. Cummings M, Winterford C, Walker N. Apoptosis. *Am J. Surg. Pathol*. 1997; 21: 88-101.
67. Levison D, Hopwood D. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J. Pathol*. 1976;119:159-166.
68. Indrajit C, Binu T. Current concepts in apoptosis The physiological suicide program revisited. *Cell Mol. Biol. Lett*. 2006;11: 506-525.
69. Sato T, Iris S, Krajewski S, Reed J. Cloning and sequencing of CDNA encoding the rat Bcl2 protein. *Gene*. 1994;140:291-292.
70. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell Mol Med*. 2003;7: 249-257.
71. Akciğer Kanseri. <http://eulukaya.home.uludag.edu.tr/> Erişim Tarihi: 03.12.2015.
72. Griffiths G, Dubrez L, Morgan C, Jones N, Whitehouse J, Corfe B, Dive C, Hickman J. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*. 1999;144:903-914.
73. Erster S, Moll U. Stress induced p53 runs a transcription independent death program. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331:843-850.
74. Aggarwal B. Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis. JNK and NF-kB. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:6-16.
75. Ulukaya, E. Akciğer Kanseri içinde: *Tanı, ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*, Engin K, Özyardımcı N. 1-15.
76. Hung R, Chow A. Dissecting the “end game”: clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis. *Clin Invest Med*. 2004; 27: 324-344.

77. Barnes P. Alveola Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD*. 2004; 27: 59-70.
78. Kuhn C, Yu S, Chraplyvy M, Linder H, Senior R. The induction of emphysema with elastase II. *Changer In Cannective Tissue. Lab Invest*. 1976;34:372-380.
79. Lüleyp H. Moleküler Genetiğin Esasları, 1. Baskı, Nobel kitapevi, 307-311.
80. Brattoni D, Fadok V, Richter D, Kailey J, Guthrie J, Henson P. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J. Biol. Chem*. 1997;272:26159-26165.
81. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'asta V, Gazzola G. Comparisis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem*. 1998;48:895-900.
82. Kopman G, Reutelingsperger C, Kuijten G, Keehnen R, Pals S, Van Oers N. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84:1415-1420.
83. Morrone S. Annexin V. *Purdue Cytometry CD-ROM Series*, volume 4 Erişim: [<http://www.eyto.purdue.edu/flowcyt/research/eytotech/apopto/dota/>]
84. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*. 1998;3: 115.
85. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod*. 1998;4: 757.
86. Zhang G, Gurtu V, Kain S, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechnology*. 1997;23: 525-531.
87. Güner A. Türkiye' nin bazı yabancı Iris L. türleri üzerinde taksonomik bir çalışma. 1979, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 77 sayfa, Ankara, (Pof. Dr. Latif KURT).
88. Shin J, Maeng H, Hong S, Moon J, Kim J, Suh Y, Kim E, Lee Y, Kim Y, Cho, E, Kim I, Lee S, Cho D, Hong N, Kim T, Jin D, Lee W. Iris Nertschinskia ethanol extract differentially induces cytotoxicity in human breast cancer cells depending on Akt1/2 activity. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012;13(12):6511-6516.
89. Hiddeman W, Schumann J, Andreef M, Barlogie B, Herman JC, Leif RC. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*. 1984;5:445-6.
90. El-Naggar, AK. Clinical relevance of the flow cytometric analysis in cancer. *The Cancer Journal*. 1989;20: 528-48.
91. Williams NN, Daly JM. Flow cytometry and prognostic implications in patients with solid tumors. *Surgery; Gynecolgy and Obstetrics*. 1990;171:257-66.

92. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65:55-63.
93. Alley M, Scudiere D, Monks A, Hursey M, Czerwinski M, Fine D, Abbott B, Mayo J, Shoemaker R, Boyd M. Feasibility of drugscreening with panels of human tumor cell lines using amicroculture tetrazolium assay. *Cancer Research*. 1988;48: 589-601.
94. Duijts S, Faber M, Olderburg H, Beurden M, Aaron N. Effectiveness of behavioral techniques and physical exercise on psychosocial functioning and health-related quality of life in breast cancer patients and survivors-a-meta-analysis. *Psycho-Oncology*. 2011;20:115-126.
95. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61:69-90.
96. Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2003;100:3983-3988.
97. Andre F, Broglio K, Pusztai L, Berrada N, Mackey J, Nabholz J, Chan S, Hortobagyi G. Estrogenreceptor expression and docetaxel efficacy in patients with metastatic breast cancer. A pooled analysis of four randomized trials. *The Oncologist*. 2010;15: 476-483.
98. Enderson B, Ross R, Pike M. Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science*. 1993;259(5095):633-8.
99. Kanser, slideshare.net/mahmutozgonul20091677/Mahmut-zgnl-20091677-kanser. Erişim Tarihi:20.01.2016.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Ayşe Fatma OĞUZCAN
Uyruğu : TC
Doğum yeri ve Tarihi : Gaziantep / 02-05-1986
Evlilik Durumu : Evli
Telefon : 0551 447 44 16
Email : afoguzcan27@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

	Mezun olduğu okul	Mezuniyet yılı
Yüksek Lisans	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (Matematik)	2014
Lisans	Bülen Ecevit Üniversitesi (Matematik)	2010
Lise	Özel Gaziantep Kolej Vakfı Lisesi	2004

YAYINLAR

1. Yumrutaş Ö, Öztuzcu S, Pehlivan M, İğci Y, Gögebakan B, Çevik M, Bozgeyik İ, Aksoy A, Bağış H, Arslan A. Effects on cell viability of breast cancer (MCF7) of *Arcillea aleppica* subsp. *zeberbayeri* methanol extract containing phenolic compounds. 2013; 13. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Bildiri)
2. Yumrutaş Ö, Öztuzcu S, Pehlivan M, Öztürk N, Eröz P, İğci Y, Çevik M, Bozgeyik İ, Aksoy A, Bağış H, Arslan A. Cell viability, anti-proliferation and antioxidant activities of *Sideritis syriaca*, *Tanacetum argenteum* subsp. *Argenteum* and *Achillea aleppica* subsp. *Zeberbaueri* on human breast cancer cell line (MCF-7). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5,1-5., Doi: 10.7324/JAPS. 2015,50301

YABANCI DİL BİLGİSİ : İngilizce