

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE SERİSİ (MCF-7)
ÜZERİNDE *PHELLODENDRON LAVALLEİ* BİTKİSİNDEN
İZOLE EDİLEN FELAVİN SAF MADDESİNİN
SİTOSTATİK VE APOPİTOTİK ETKİSİ

Bio. Ayşenur AYDOĞAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BOLU
2012

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE SERİSİ (MCF-7)
ÜZERİNDE *PHELLODENDRON LAVALLEİ* BİTKİSİNDEN
İZOLE EDİLEN FELAVİN SAF MADDESİNİN
SİTOSTATİK VE APOPİTOTİK ETKİSİ

Bio. Ayşenur AYDOĞAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir. | Proje numarası:2011.08.03.438 |

BOLU
2012

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY SAYFASI

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Ayşenur AYDOĞAR tarafından hazırlanan ve 16/01/2012 tarihinde savunulan
“İnsan Meme Kanseri Hücre serisi (MCF-7) Üzerinde *Phellodendron lavallei* Bitkisinden İzole Edilen Felavin Saf Maddesinin Sitostatik ve Apoptotik Etkisi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından Farmakoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Prof. Dr. Akçahan GEPEĞİREMEN
(AİBÜ)

Üye Doç. Dr. Özge UZUN
(AİBÜ)

Üye Doç. Dr. Güler BUĞDAYCI
(AİBÜ)

ONAY

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve Yönetim Kurulu’nun kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tezimin hazırlanması ile ilgili çalışmalarında bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi, deneyim ve yardımlarından yararlandığım başta değerli hocam ve danışmanım, Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Akçahan GEPDİREMEN'e;

Bilgi ve yardımlarıyla bana destek olan bölüm hocalarımdan Doç. Dr. Özge UZUN ve Yrd. Doç. Dr. Zeynep Güneş ÖZÜNAL'a;

Bu çalışmadaki deneysel sürecin her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, destek ve yapıcı eleştirileri ile bana yol gösteren ve istatistiksel analizde bana yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Recep BAYRAM'a; tezimin deney kısmının yapılmasının çeşitli aşamalarında yardımcı olan Bio. Ali UCBEK ve Araş. Gör. Dr. Muhsine Zeynep YAVUZ'a;

Literatür taramasında, çevirilerimde ve tezimin hazırlanmasında yardımlarıyla beni yalnız bırakmayan arkadaşım Hakan BOZKURT'a;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da her zaman yanımda ve bana destek olan anneme, babama ve abime;

Sonsuz Teşekkür ederim...

ÖZET

Rutaceae familyasına ait *Phellodendron* bitki türlerinden elde edilen bileşiklerin son yıllardaki çalışmalarda bağışıklık düzenleyici, antitumor, antibakteriyel ve glomerüler bazal gangliyon hastalığına karşı etkileri bulunmuştur. Gürcistan'da yetişen *Phellodendron lavalleyi* (PL) bitkisinin hipoglisemik aktivitesi literatürde gösterilmiştir.

Bu çalışmada ilk kez olarak in vitro şartlarda insan meme kanseri (MCF-7) hücre serisinde bu bitkiden izole edilen Felavin flavonoidinin apopitotik ve sitostatik etkisi araştırılmıştır.

Deneyler; MCF-7 hücre kültürünün yapılması, hücre sayımı, morfolojik değerlendirme, MTT yöntemi, kaspaz-3 aktivitesi ve sitokimyasal floresan boyama yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitokimyasal floresan boyama sonuçları morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Hücre sayımı, MTT ve kaspaz-3 sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Beş farklı yöntem ile elde edilen sonuçlar kendi aralarında tutarlılık göstermiştir. PL bitkisinin yaprağından elde edilen Felavin flavonoidinin MCF-7 hücre serisi üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisi olduğu gözlenmiştir. Felavin'in hücre ölümünü düşük dozlarında apopitozla yaptığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Phellodendron lavalleyi*, Felavin, MCF-7, apopitotik, sitostatik.

SUMMARY

Compounds derived from *Phellodendron* species, belong to the Rutaceae family, have been reported to have immune-modulation, antitumor, antibacterial, and antiglomerular basement membrane nephritis effects. Hypoglycemic effects of *Phellodendron lavallei* (PL) that grows in Georgia have been shown in the literature.

For the first time, in this study it was aimed to investigate the apoptotic and cytostatic effects of Phellavin flavonoid which is isolated from PL plant on human breast cancer cell culture in vitro conditions.

Experiments were realized by various methods, MCF-7 cell culture, cell counting, MTT method, caspase-3 activity and cytochemical fluorescence staining. The results have been considered by morphologically. Findings obtained from cell counting, MTT and caspase-3 activity tests were subjected to statistical analysis.

The results are obtained from five different methods have shown consistence. The Phellavin flavonoid is obtained from the leaf of the PL plant has a significant cytotoxic effect on MCF-7 cell culture has been observed. Phellavin realizes the cell death in low doses by apoptosis has been observed.

Key words: *Phellodendron lavallei*, Phellavin, MCF-7, apoptotic, cytostatic.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLOLAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.2. Kanser Biyolojisi	2
2.3. Hücre Siklusu	4
2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları	6
2.4.1. Nekroz	6
2.4.2. Apoptoz	7
2.5. Meme Kanseri	13
2.5.1.Meme Kanseri Risk Faktörleri	13
2.5.2. Meme Kanseri Biyolojisi	15
2.5.3. Meme Kanseri ve Onkogenler	16
2.5.4. Meme Kanseri ve Tümör Baskılayıcı Genler	17
2.5.5. Klinikte Meme kanseri	18
2.5.6. Meme Kanseri Belirti ve Bulguları	20
2.6. Sitostatik ve Sitotoksik Tedavi Prensipleri	21
2.7. Flavonoidler	21
2.7.1. Flavonoidlerin İn Vitro Antioksidan Etkileri	22
2.8. Rutaceae	23
2.8.1. <i>Phellodendron lavallei</i>	23
2.8.2. Flavon	24
2.9. Hücre Kültürü	25

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	26
3.1. Kullanılan Kimyasallar	26
3.2. Kullanılan Yöntemler	27
3.2.1. Hücre Kültürü	27
3.2.2. Felavin'in etkisinin hücre sayımı ile belirlenmesi	28
3.2.3. Felavin'in etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi ve etken dozun hesaplanması	28
3.2.4. Felavin verilmiş hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesi	29
3.2.5. Hücrelerde apopitozisi belirlemek için kaspaz-3 aktivasyonu tayini	29
3.2.6. Akridin oranj ve etidiyum bromit ile boyama	30
3.2.7. İstatistiksel değerlendirme	31
4. BULGULAR	32
4.1. Hücre Büyüme Eğrileri	32
4.1.1. Hücre sayımı ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi	32
4.1.2. MTT yöntemi ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi	34
4.1.3. Hücre proliferasyonunun morfolojik olarak değerlendirilmesi	35
4.2. Kaspaz- 3 aktivasyonu sonuçları	39
4.3. Akridin oranj ve Etidiyum bromit ile boyama sonuçları	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

AIF	Apopitozisi indükleyici faktör
APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	Adenozin trifosfat
BRCA-1, BRCA-2	Meme kanserine yatkınlık geni
CAD	Kaspaz deoksiribonükleotid
DCIS	Duktal karsinoma insitu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Endoplazmik retikulum
Fas	Hücre ölüm reseptörü
FCS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GST	Glutatyon-S-transferaz
GTP	Guanin trifosfat
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC-50	The half maximal inhibitory concentration
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNase
IGF-1, IGF-2	İnsülin benzeri büyüme faktörü
LCIS	Lobüler karsinoma insitu
MCF-7	İnsan meme kanseri hücresi
Mdm-2	Murine double minute
MTT	Thiazoly blue tetrazolium bromide
PA	<i>Phellodendron amurense</i>
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PL	<i>Phellodendron lavallei</i>
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik asit

ROT	Reaktif oksijen türleri
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1: Hücre siklusunun bölümleri	5
Şekil 2.2: Nekroz oluşumu	6
Şekil 2.3: Apoptozisin görüldüğü fizyolojik durumlar	7
Şekil 2.4: Apoptoz basamakları	9
Şekil 2.5: Meme kanseri hormonlar ve büyüme faktörleri	15
Şekil 2.6: Temel flavonoid yapısı	22
Şekil 2.7: <i>Phellodendron lavallei</i>	23
Şekil 2.8: Felavin'nin yapısı	24
Şekil 4.1: MCF-7 hücre büyüme eğrisi	33
Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlardaki Felavinin MCF-7 hücre canlılık oranları üzerindeki etkisi	34
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 24. saatte faz kontrast mikroskobunda alınan görüntüleri.	36
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 48. saatte faz kontrast mikroskobunda alınan görüntüleri.	37
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 72. saatte faz kontrast mikroskobunda alınan görüntüleri.	38
Şekil 4.6: Farklı Felavin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki kaspaz-3 seviyelerine etkisi.	39
Şekil 4.7: Felavin uygulanan hücrelerin 24. saatte akridin oranj ve etidiyum bromit ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri.	40

Şekil 4.8: Felavin uygulanan hücrelerin 48. saatte akridin oranj ve etidiyum bromit ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri.	42
Şekil 4.9: Felavin uygulanan hücrelerin 72. saatte akridin oranj ve etidiyum bromit ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri.	43

TABLÖLAR

Tablo

Sayfa

Tablo 2.1: Meme Kanseri Belirti ve Bulguları

20

1. GİRİŞ

Dünyada meme kanseri, kadınlarda görülen kanser türleri arasında ilk sırada, kanser nedeniyle oluşan ölümlerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (1). Ülkemizde ise meme kanseri %24,96 oranıyla kadınlarda görülen kanserler arasında 1. sırada yer almakta ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık olarak $\frac{1}{4}$ 'ünü meme kanserleri oluşturmaktadır (2, 3). Meme kanseri yaygın olmasına karşın, genellikle yavaş bir gelişme hızı gösteren ve tanısı erken yapıldığında oldukça başarılı tedavi sonuçları elde edilebilen ve ölüm oranı azaltılabilen bir kanser türüdür (4, 5).

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lı yıllara kadar kemoterapi palyatif amaçla, bazı klinik bulguların azaltılması ve hastanın yaşamını biraz daha uzatmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak 1960'lı yıllardan itibaren hücre kinetiği bilgileri ve kinetik kavramları kemoterapi protokollerinde uygulanmaya başlanılmıştır. Hücre kinetiği hakkında bilgiler arttıkça yeni ilaçlar laboratuvarlarda antikanser aktiviteleri açısından araştırılmaya başlanmıştır (6).

Epidemiyolojik çalışmalar kalp hastalıkları ve kanser riskini azaltabilmesi açısından flavonoidlerin önemli olabileceğini göstermiştir. Flavonoidler bitki orijinli besinlerde her zaman bulunan polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin temel yapıları fenolik hidroksiller, O-şekerler, metoksi gruplar, sülfatlar ve glukoronidler içeren 3 halkadan oluşur. Flavonoidlerin bulundukları ana kaynaklar; meyveler, sebzeler, kırmızı şarap ve yeşil çaydır (7).

Bu çalışmada ilk kez olarak, in vitro şartlarda meme kanseri hücre kültüründe *Phellodendron lavalleyi* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden elde edilen HPLC ile saflaştırılmış Felavin (Phellavin) flavonoidinin apoptotik ve sitostatik etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Latince'de yengeç anlamına gelen kanser, çağımızın en korkulan hastalıklarından birisidir. Toplumda her beş kişiden biri, yaşantısının bir döneminde kanser ile karşılaşmaktadır. Tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın, halen kanserden ölümler, gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (8).

Kişilerin kanserden korunması ve erken tanı yaklaşımları, bu hastalığı bu denli korkulur olmaktan çıkarabilir. Kanser, tek bir hücrede oluşan genetik değişiklikler sonucu hücrenin farklılaşması ile ortaya çıkar. Hızla çoğalan hücrelerin oluşturduğu tümoral yapı, öncelikle yakın çevreye yayılır (lokal invazyon). Daha sonra, daha uzak organlara kan veya lenfatik yol ile yayılır (metastaz). Organizmada en fazla kanlanan organlar olan akciğer, beyin ve karaciğer en sık metastaz yapılan organlardır. Tümör çoğalırken çevre dokular ile uyuma dikkat etmez ve hızla içinde bulunduğu organizmaya ait besinleri kullanarak büyür (9, 10).

Kanseri oluşturan nedenler, çevresel ve genetik nedenlerdir. Çevresel nedenlerin arasında en önemli faktörler sigara, yiyecekler, şişmanlık, hormonlar, virüsler, fiziksel ve kimyasal ajanlar gösterilebilir. Ayrıca kanser, kronik iltihabi olaylar ve iyi huylu tümörlerin zemininde de sık olarak gözlenmektedir (8,11).

2.2 Kanser Biyolojisi

Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir. Bu anormal hücreler hangi organdan kökenleniyorsa hastalık buna göre isimlendirilir (akciğer, meme, prostat kanseri gibi) (12- 14).

Kanserin altı önemli özelliği vardır;

a) Büyüme sinyallerinde otonomi: Normal hücrelerin bölünebilmesi için dışardan büyüme faktörü sinyalini alması gerekir, kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildir, mutasyonlar düzenli olmayan büyümeye sebep olurlar (12-15).

b) Büyüme sinyalleri engelleyicileri: Normal hücreler engelleyici sinyallere homeostası sağlamak için cevap verirler (vücuttaki hücrelerin çoğu aktif olarak bölünmez), kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermez, mutasyonlar engelleyici yolları etkiler (12-15).

c) Programlı hücre ölümünde bozukluklar: Genellikle normal hücreler DNA hasarına karşı apoptozla yok olurlar, kanser hücreleri apoptotik sinyallerden etkilenmezler (12-15).

d) Sınırsız replikasyon potansiyeli: Normal hücreler yaşlandıktan sonra hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma düzeneğine sahiptirler. Bu hücresel sayaç, her DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kromozom uçlarının kısalmasını belirler (telomerler), kanser hücrelerinde telomerlerin uzunluğu korunur, telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur (12-15).

e) Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu): Kanser hücrelerinin yeni kan damarlarının oluşumunu hızlandıran büyüme faktörleri salgılamalarıdır. Böylece artan oksijen ve besin gereksinimi yeni damar oluşumlarıyla karşılanmış olur. Bu olay kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastatik yayılımının başlamasına olanak sağlar (12-15).

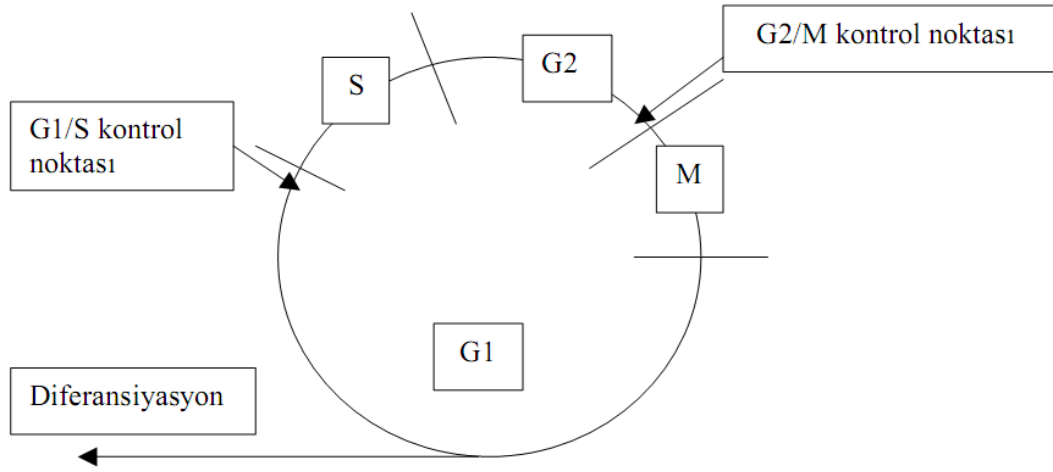
f) İnvazyon ve metastaz: Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler, mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini değiştirir ve hücre-hücre, hücre-ekstraselüler adezyon moleküllerini değiştirirler (12-15).

2.3. Hücre Siklusu

Organizma/organ/doku gelişimi, hücrelerin büyüme ve çoğalmalarını içerdiği gibi hücre ölümlerini de sağlar. Hasarlı dokuların onarımı somatik hücrelerin ve destek dokunun çoğalması ile gerçekleşmektedir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (15).

Hücre siklusu, hücre içeriğinin kopyalandığı ve hücrenin ikiye bölündüğü olaylar bütünüdür. Temel olarak G_1 , S, G_2 ve M fazlarından oluşur. G_1 fazında hücre büyümesi başlar, hücre %20 büyür, S fazı kromozomların duplike olduğu ve hücre büyümesinin devam ettiği fazdır. G_2 fazında hücre yeterli büyüklüğe ulaşır ve M fazında hücre bölünmesi gerçekleşir (16). Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G_1 -S- G_2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı G_0 da durmaktadırlar (17,18). G_1 , S, G_2 fazları (interfaz) hücre siklusunun %90' ını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1- 2 saat sürmektedir.

Hücre büyümesi G_1 fazında kısıtlayıcı nokta (R point) tarafından koordine edilir. Kısıtlayıcı noktada hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır (18,19). G_1 fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G_2 fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitozla hazırlanır. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Telofazda sitoplazmik bölünme tamamlanır ve aynı genetik materyalli iki yeni hücre meydana gelir (15, 19-21) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Hücre siklusunun bölümleri (19)

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre siklusunda G_1 -S geçişinde, G_2 -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir. Radyasyon veya toksinle muamele edilen hücrelerde DNA'da meydana gelen hasara göre hücre siklusu kontrol noktaları G_1 'den S fazına veya G_2 'den mitozaya geçişi engeller. DNA'da meydana gelen hasar DNA sentezini de inhibe edebilir. DNA'sı replike olmamış hücrelerde mitozaya giriş kinaz komplekslerinin inaktivasyonu ile engellenir (18). Hücre siklusunda iki tip gen grubunun rolü vardır: Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler *p53* ve *Rb* (Retinoblastoma geni) (22).

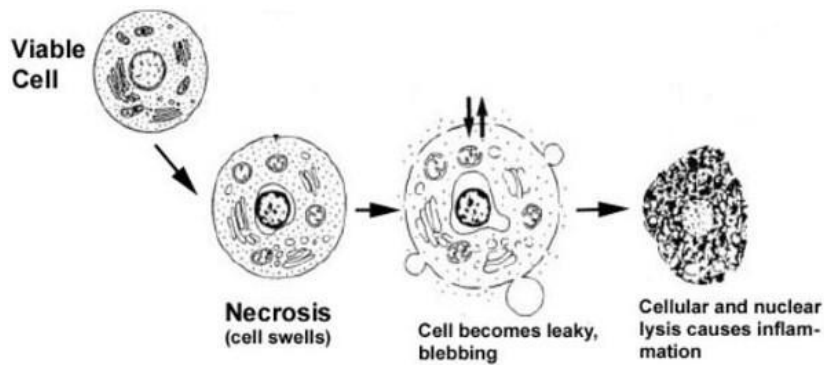
Onkogenler, kanser gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen gen grubudur. Tümör baskılayıcı genler ise kanser gelişimini baskılar (15). *p53* geni işlevini kaybederse hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve DNA tamiri olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, *p53* genomik kararlılığı sağlar ve hücre siklusunu G_1 'de inhibe ederek hücreye tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise gider (18-22). Hu W. ve ark. farelerde *p53* ve onun düzenleyicileri *Mdm2*'nin embriyo implantasyonunda da rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir (23). Normal hücrelerde *Rb*

hücre siklusunu G_1 fazında inhibe eder. Retinoblastoma ve osteosarkom tümör hücrelerinde *Rb* gen inaktivasyonu gösterilmiştir. Büyüme uyarısı, hücreden büyüme faktörlerinin salınımı ile başlar. Büyüme faktörleri hücre zarında özgün reseptörlere bağlanır ve sinyaller sitoplazma proteinlerine iletilir. Bu sinyaller çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin salınımını ve hücrenin hücre siklusuna girmesini sağlar(24, 25). Hücre siklus saati hücre siklusunun ilerleyip ilerlemeyeceğini belirler veya hücreyi ölüme yönlendirir (19).

2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları

2.4.1 Nekroz

Nekroz hücre ölümünün akut şeklidir. Dışarıdan gelen hasarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu meydana gelir. Adenozin trifosfat (ATP) kaybı, iyon gradientlerinin yok olması, hücre şişmesi ve sonuç olarak hücre lizisiyle karakterizedir. Böylece nekroz; hücre içeriklerinin çevreye salıverilmesine bağlı olarak, çevreleyen bölgede enflamasyona neden olur (Şekil 2.2). Hücre zedelenmesi sonucu hücrede gelişen geri dönüşü olmayan hasar, hücrenin ölümüne neden olur. Nekrotik hücre ölümüne genellikle yüksek toksin seviyeleri gibi, ciddi hücresel stres neden olur. Nekroz programlanmış bir hücre ölümü değildir ve oluşmasında tanımlanabilen biyokimyasal bir yolak yoktur. Nekroz başladığında, terapötik müdahaleler için çok fazla olasılık yoktur (26).



Şekil 2.2: Nekroz oluşumu (26)

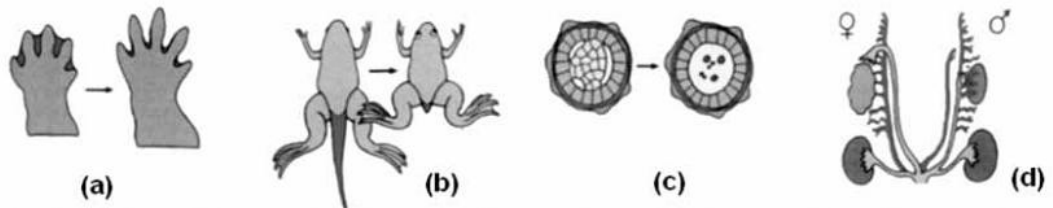
2.4.2. Apopitoz

Yunancada ‘apo’ =ayrı, ‘ptosis’ =düşen anlamındadır. Programlı hücre ölümü olarak da bilinen Apopitoz 1964’te Lockshin tarafından ilk kez ipekböceği metamorfozu sırasında tanımlanmıştır. Walther Flemming 1885’de, ‘chromatolysis’ prosesinin tavşan ovaryumunda foliküler atrezi sırasında granüloza hücrelerinin kaybı için sorumlu olduğunu tarif etmiştir. Aynı ölüm prosesini testiküler germ hücre dejenerasyonunda gözlemlemiştir. Bu çalışmalarda apopitozis terimi kullanılmasa da morfolojik olarak apopitotik hücreler gösterilmiştir (27).

1983 yılında Duke ve ark. jel elektroforezi ile apopitozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apopitotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Bu tarihten sonra apopitoz ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde artmıştır (28, 29).

İnsan organizmasında apoptozisin izlendiği durumlar

Apoptozis insan organizmasında embriyonel ve fötal gelişimde görüldüğü gibi gelişim ve yaşlanma sürecinde, dokuların hücre homeostazının sağlanmasında, immün rekasiyonlarında koruma mekanizması olarak, hormon azalmasına bağlı involüsyonlarda ve hücrelerin herhangi bir nedenle hastalanmaları durumunda görülebilir (30).



Gewies A. Introduction to Apoptosis; 2003; Page 1-26. www.ihcworld.com/_books/apointro.pdf den uyarlanmıştır.

Şekil 2.3: Apoptozisin görüldüğü fizyolojik durumlar (31)

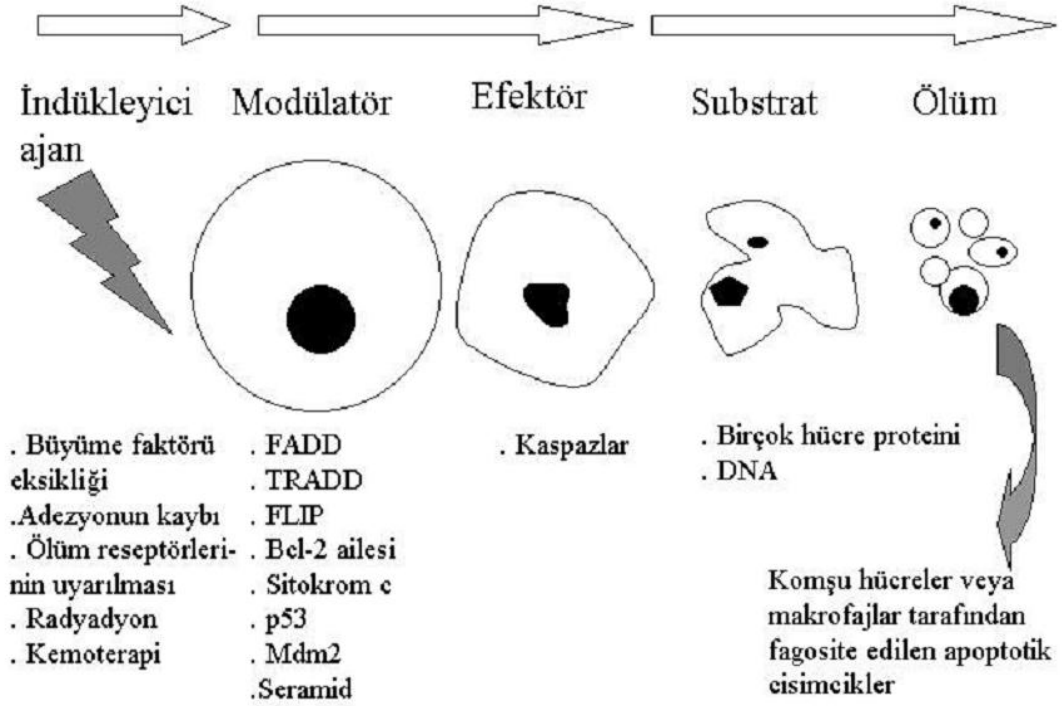
Apoptozisin görüldüğü fizyolojik olaylar (31);

- Parmak oluşumu sırasında aradaki mezenşimal hücrelerde,
- Amfibilerin metamorfozu sırasında kuyruk hücrelerinde,
- Bağırsak gibi lümenli organ oluşumunda,
- Üreme organları oluşumunda apoptozis görülmektedir. (Şekil 2.3).

Morfolojik değişiklikler

Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yakınlaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikrofilaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (32).

Apoptotik hücre ölümünün aşamaları



Şekil 2.4: Apoptoz basamakları. (Hücre içinden veya dışından gelen sinyaller, kaspazları aktive eder. Aktive olan kaspazlar hedef proteinlerini yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Sonuçta hücre parçalanarak apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik cisimler fagositoz yoluyla yok edilirler) (28)

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I) Apoptozun başlatılması,
- II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir (28).

Apoptozis mekanizması

Apoptozisin mekanizması gerçek anlamda tam olarak açıklanamamasına rağmen, apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların aktivasyonudur (33,34). Kaspazlar kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar (35,36). Bu endoproteazlar inaktif prekürsör olarak hücre sitoplazmasında bulunurlar ve çoğu proapoptotiktir (36, 37). Kaspazlar; üç subünit [NH₂ terminal subünit, geniş subünit (~20 kDa veya p20) ve küçük subünit (~10kDa veya p10) içeren prokaspazlar (30-50 kDa)] olarak sentezlenirler. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenmektedir (38-40).

a) Sitokin aktivasyonu yapanlar: Kaspaz -1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14' ü içermektedir. Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Ayrıca kaspaz -1, -4 ve -5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler.

b) Apoptozisi başlatanlar: Kaspaz -2, -8, -9 ve -10'u içermektedir.

c)Apoptozisi yürütenler (efektör grup): Kaspaz -3, -6 ve -7'yi içermektedir. Apoptotik süreçte kaspaz-3'ün en önemli rolü üstlendiği ve kaspaz -9'un da kaspaz-3'e benzer özellikler taşıdığı son çalışmalarda gösterilmiştir (41, 42).

Apoptozisin oluşum yolları

1.Mitokondri/sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (intrinsik yol):

Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c bulundurulur. Mitokondrial stres durumlarında serbestleşen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonunda önemli rol oynar (40, 43). Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir ve apoptozis sürecinde merkezi bir konumda bulunmaktadır. Bu yüzden de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşsüz (irreversibl) bir döneme girildiğine işaret eder. Sitokrom-c mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozisi indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır (44). Sitokrom-c sitoplazmik protein olan apoptotic protease activating factor-1'e (APAF-1) bağlanır

ve onu aktive eder, ardından ATP' nin de katılımıyla “apoptozom” adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3 de ICAD'ı (inhibitor of caspase activated DNase) CAD (caspase active deoskiribonükleotid) haline getirir ve kaspaza bağlı apoptozis mekanizması başlar (45, 46).

2. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi (ekstrinsik yol):

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1/CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1'in (TNFR-1) ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmalari) sonucu indüklenir. Bu reseptörler TNFR gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir (35). Fas FASR reseptörlerine ve TNF de TNFR-1 reseptörlerine bağlanır. Daha sonra her ikisi de ölüm uyarıcılarını (FADD ve TRADD) uyarır. Bu sitozolik ölüm reseptörleri prokaspaz-8'e direkt olarak bağlanırlar. Bu bağlanma mekanizması kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur. Aktif kaspaz-8 ise efektör kaspazlarda prokaspaz-3'ü aktive eder ve apoptozis başlar (40,46).

3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması:

Endoplazmik retikulum (ER); protein sentezi, protein katlanması, strese karşı hücre sel cevap ve hücre içi Ca^{++} seviyelerini düzenler, uzun süreli endoplazmik retikular stres hücre ölümüne katkıda bulunur ve birçok farklı nörodejeneratif hastalığın patojenisiyle bağlantılıdır. Hücre ölümünün başlamasında ER'nin merkezi rolü olmasına rağmen, uzun süreli stresin nedeni anlaşılamamıştır. Kaspaz ailesinin bir üyesi olan nöron ve diğer hücrelerdeki kaspaz-12'nin ER ile primer ilişkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (34). Yine yapılan çalışmalarda kaspaz-12'nin miktar artışının sadece ER'deki strese bağlı olmadığı, ER'nin yüzeyindeki sitozolik kaspaz-7'nin translokasyonu sonucu olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli ER stresinde sitoplazmanın içerisinde aktif kaspaz-12'nin hareketi kolaylaşır ve burada

kaspaz-9 ile etkileşir. Böylece ER stresinin oluşturduğu apopitozis kaskadı başlamış olur (46,47).

Apopitozis ve kanser ilişkisi

Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apopitotik ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apopitozise gidemeyen dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, malign hücelere dönüşme potansiyeli taşırlar (48).

Hücre popülasyon dinamiğinde, apopitozis ve kanser ile sık karşılaşılabilir. Azalmış apopitozis, birçok kanser için karakteristiktir. ROT ürünlerinin kanserde anahtar rol oynadığı ve oksidatif hasarın apopitozisin başlatılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. ROT ürünleri, oksidatif hasar ve apopitozisin birbirleriyle güçlü ilişkileri olduğu gösterilmiştir (49).

Apopitozis birçok hastalıkta önemli rol oynar ve serbest radikal hasarı, sitokinler ve enflamatuar yaralanma tarafından tetiklenir (50). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apopitozis dengesinin bozulması kanser, otoimmün bozukluklar, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (51, 52).

2.5. Meme Kanseri

Meme kanseri gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür. Meme kanseri kanser ölümlerinin %18'ini oluşturmakta ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Dünyada her 3 dakikada bir kadına meme kanseri teşhisi koyulmakta ve her 11 dakikada bir kadın meme kanserinden hayatını kaybetmektedir. Değişik coğrafi bölgelerde meme kanseri görülme sıklığı arasında farklılıklar gösterilmiştir. Yapılan araştırmalara göre U.S.A de her 8 kadından biri meme kanseriyken, Avrupa ülkelerinde bu oran henüz 1/10'i geçmemiştir(53).

Meme, süt bezleri ve burada üretilen sütü meme başına taşıyan kanallardan oluşur. Bu süt bezleri ve kanalları döşeyen hücrelerin kontrol dışı olarak çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle meme kanseri oluşur. Hem erkek hem de kadınlarda görülür. Erkeklerde görülme oranı düşüktür (54).

2.5.1. Meme kanseri risk faktörleri

Soygeçmişinde özellikle anne veya kız kardeşlerinde meme kanseri olan kadınlarda risk daha fazladır. Bu kişilerde hastalık ortalama 10-12 yıl daha erken çıkar. Meme kanseri olan hastalarda, karşı memede kanser gelişmesi riski de belirgin şekilde artar. Meme kanserli ailelerde bilateral meme kanseri görülme insidansı da yüksektir. Özellikle ailede bilateral meme kanseri görülmesi genç yaşta meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır (55).

Birçok çalışma geciken menarşın meme kanseri riskini % 30-50 oranında azalttığını göstermiştir. 12 yaşından önceki menarş ise insidansı iki kat arttırmaktadır. Erken menarş meme kanseri gelişiminde bir risk faktörüdür (56). Hiç doğum yapmamış kadınlarda insidans artış gözlenmiştir. İlk gebeliği 30 yaşından sonra olan kadınların meme kanserine yakalanma riski, 18 yaşından sonra ilk gebeliği olanlara göre daha yüksektir. Geç menopoza giren kadınlarda da insidans artmış olarak izlenir (55-57). Postmenopozal hormon tedavisi ile meme kanseri insidansının artıp artmadığı konusu halen tartışmalıdır. Yapılan bazı çalışmalarda, postmenopozal hormon tedavisi alan kadınların mamografilerinde % 25 kadar meme

kanseri insidansı artışı tespit edilmiştir (58). Hormon tedavisi; %36 kadar vakada memelerde ağrıyı indükler, %17-32 vakada ise mamografik değişikliklere neden olur (55, 59).

Diyetle yağ ve kolesterol alımı çok önemlidir. Kişi başına düşen yağ tüketimi ile meme kanseri arasında direkt korelasyon bulunmuştur. Bu ilişki postmenopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara oranla daha kuvvetlidir. Postmenopozal obesitede ve kronik alkol kullananlarda da risk artar. Radyasyon, meme kanserinde de risk faktörüdür (60, 61).

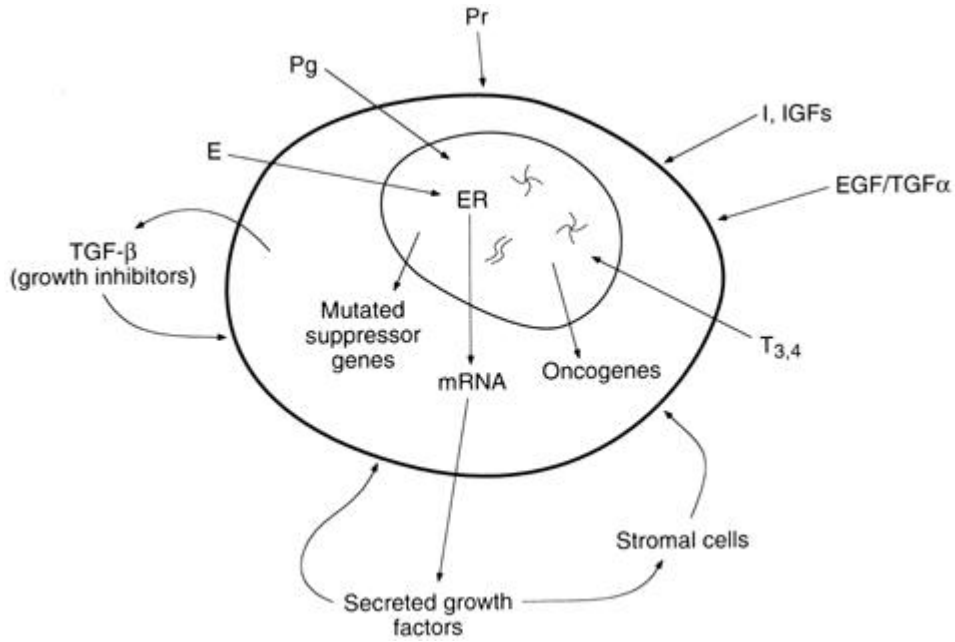
Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar, özellikle premenopozal meme kanserinin etiyolojisinde genetik faktörlerin ön plana çıktığını göstermiştir. Mutasyona uğramış BRCA1 ve BRCA2 genlerini taşıyanlarda meme kanseri riski belirgin olarak artmıştır. Bu genler, 17. ve 13. kromozomlar üzerinde yerleşmiştir. Bu genleri taşıyanlarda yaklaşık % 85 oranında meme kanseri görülür. Tüm meme kanserlerinin % 5'inde BRCA1 ve BRCA2 genleri pozitif bulunmuştur (55, 61). 13. kromozomda bulunan resesif Retinoblastoma geni bir tümör supressör gendir ve bu kromozomda heterojenitenin kaybı premenopozal meme kanserine neden olmaktadır. Kolon kanserinde olduğu gibi 17. kromozomdaki p53 supressör geni de meme kanseri gelişmesinde önemli bir gen olup, bu genin kaybı ile meme kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Yine Erb-B2 onkogeninin meme ve over kanseri prognozunu belirlemede önemli bilgiler verdiği gösterilmiştir (62, 63).

Meme kanserlerinde majör risk faktörleri; aile hikayesi, önceki hikayede meme kanseri olması, genetik olarak yatkınlık, BRCA1 ve BRCA2 genlerini taşıması, önceden geçirilen diğer benign meme hastalıklarıdır (55, 58, 64). Benign meme hastalıklarından, fibrokistik hastalık, solid veya papiller orta derecede hiperplaziler, fibrovasküler nüveli papilloma, atipik duktal veya lobüler hiperplaziler, neoplaziler (lobüler karsinoma insitu) ile meme kanseri birlikteliği fazladır (55, 62, 63).

Minör risk faktörleri ise, erken menarş, geç menopoz, obesitesi olan postmenopozal kadınlar, alkol alımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, ileri yaş, ilk doğumunu geç yaşta yapmış kadınlar, pestisitlere maruz kalma, uzun süreli oral kontraseptif ilaç alımıdır (55, 65).

2.5.2. Meme kanseri biyolojisi

Meme büyümesi ve gelişmesi birçok hormonun ve büyüme faktörlerinin etkileşimiyle düzenlenir. Bu hormonlar; östrojen, androjen, progesteron, glikokortikoid, prolaktin, tiroid hormonu, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), fibroblast büyüme faktörleri (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü alfa'dır. Büyüme faktörlerinin ve hormonların etkileri spesifik reseptörlere bağlanmasıyla başlatılır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonların spesifik membran reseptörleri ile etkileşimi hücre içi biyokimyasal sinyaller kaskadını başlatır. Bu genlerin değişik alt küme represyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır(66).



Şekil 2.5: Meme kanseri ve büyüme faktörleri (E = östrojen; Pg = progesteron; Pr = prolaktin; I = insülin; IGF's = insülin-benzeri büyüme faktörleri; EGF = epidermal büyüme faktörleri; TGF- α = transforme edici büyüme faktörü alfa; T_{3,4} = tiroid hormonları; TGF β = transforme edici büyüme faktörü beta) (67)

2.5.3. Meme kanseri ve onkogenler

Meme kanseri ve diğer maligniteler hücre büyümesi ve gelişimine katılan hücresel yolları etkileyen genetik değişimler ile ortaya çıkar. Çoğu genetik değişimler sadece kanserli dokudaki kanser hücrelerinde gözlenirken, daha az sıklıkla da olsa germ hücrelerindeki genetik değişimler ile ortaya çıkan maligniteler kalıtsal özellik taşırlar. Genomdaki bu kalıtsal veya kalıtsal olmayan genetik değişimler, belli hücresel genlerin belli özel değişimleri ile ilişkili bulunmuştur. Bunlar onkogenler olarak isimlendirilirler ve normal işlevlere sahip bir diğer gen grubundan (protoonkogenler) türevlenirler. Protoonkogenler normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli olan bazı proteinlere ait kodlar içerirler. Eğer bir mutasyon sonucu protoonkogenin yapısı değişirse oluşan hasar, genin dolayısı ile gen ürününün yapısının değişmesine neden olur ve çeşitli yollarla hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar, malignite ortaya çıkar (68, 69).

Kanser oluşumunda, onkogenlerden başka önemli ikinci bir gen grubu da tümör baskılayıcı genlerdir. Bu iki gen grubu kanserogeneizde birbiriyle zıt etkilidir. Onkogenler malign transformasyona neden olurken tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesinde işlev gören genleri kontrol ederek tümör oluşumunu engellerler. Eğer bu tümör baskılayıcı genlerde bir hasar olursa büyüme kontrolü ortadan kalkacağından kanser ortaya çıkar (68, 69).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR): Hücre membran reseptörü olan EGFR ailesi; EGFR, HER2, HER3 ve HER4'den oluşur. EGFR, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aileye ait üyeler transfosforilasyon sonucu bir seri etkileşimler ile heterodimerler oluşturabilirler ve farklı protein ailelerinin aktivasyonunu düzenlerler. EGF'nin reseptörüne bağlanması ile reseptör uyarılarak EGF hücre içine alınır. Aynı zamanda EGFR'nin otofosforilasyonuna ve diğer hücre içi substratların fosforilasyonuna yol açar. Bu yol ile nukleusta transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu artar, hücre bölünmesi uyarılır. Hücre membranından nukleusa doğru sinyal iletiminin aktarılmasına protoonkogen ailesinden bazı üyeler (Ras, Src) aracılık etmektedir. Birçok protoonkogen çeşitli kanserlerde etkili bulunmuştur. Bu sinyal iletimi boyunca ortaya çıkan onkogenik mutasyonlar devamlı olarak mitozu aktifleyen sinyallerin taşınmasında rol alırlar (69-71). EGFR gen

amplifikasyonun kötü prognoz ile ilişkili olduğu birçok karsinomda gösterilmiştir (70).

CerbB-2 (HER2/Neu): CerbB-2, meme kanseri araştırmalarında ve tedavisinde en yoğun çalışılan onkogenlerden biridir. HER2 ve diğer üyeler (HER1, HER3 veya HER 4) arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon CerbB-2 sinyal yolunu aktifler. CerbB-2 geninin amplifikasyonu veya proteinin aşırı ekspresyonu meme kanserlerindeki neoplastik hücrelerin %10-40'ında gösterilmiştir. Bu onkogenin kopya sayılarının yüksek bulunuşu, tümör şiddeti ile doğru orantılı olarak saptanmıştır (72, 73).

Sinyal iletimi ile ilişkili nükleer onkogenler: Farklı dokularda büyümeyi indükleyici steroidlerin ve büyüme faktörlerinin etkileri nükleer protoonkogenler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin mitojenle etkileşimlerinden kısa bir süre sonra c-fos, c-myc, c-myb ve c-jun protoonkogenleri indüklenir. Bu onkogenlerin indüksiyonu ile hücre proliferasyonu arasında bir bağlantı vardır. Meme kanserinde östrojen ve progesteron ile c-myc, c-fos ve c-jun protoonkogenlerinin aktifleştikleri gösterilmiştir (74). Sinyal iletiminde önemli bir aracı molekül olan ras, genellikle plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik parçalarına yakın bölgeye yerleşirler. GTP ile aktiflenir ve protein kinazlar ile ilişkiye girerek mitozun aktifleşmesinde rol alırlar. Ras'ın onkogenik özellik kazanması nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olur. Meme kanserlerinde Ras onkogenlerinde en sık rastlanan mutasyon aşırı ekspresyondur (69, 71,75).

2.5.4. Meme kanseri ve tümör baskılayıcı genler

p53 geni 17. kromozomun p13-1 bandına yerleşmiştir ve moleküler ağırlığı 53 kD'luk nükleer bir proteini kodlar. UV ışık, karsinojenler ve sitostatiklerin DNA'da oluşturdukları hasarı ortadan kaldırmak üzere aktifleşir. Hasar düzeltilemez ise hücre apoptoza yönlendirilir (76). *p53* geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları çeşitli tümörlerde ve meme kanserlerinde gösterilmiştir. Meme kanserlerinin %20-30 unda *p53* inaktivasyonu

gözlenir. *p53* mutasyonlarının tespiti in situ'dan invazif karsinomaya geçiş için bir marker olarak kullanılabilir (77).

Ataksia teleanjiektazi geni taşıyanlarda meme kanseri riski oldukça yüksektir. Benzer şekilde otozomal dominant olarak kalıtılan Cowden hastalığında kadın hastaların %50'sinde meme kanseri gelişir. Ailesel meme kanseri erkeklerde de gözlenmiş, erkekten bir sonraki nesle cinsiyet farkı olmaksızın aktarılabildiği bildirilmiştir (78).

Kalıtsal meme kanserinde nadir gözlenen yüksek penetransa sahip meme kanserine yatkınlık genleri olarak *BRCA1* ve *BRCA2* genleri bulunmuştur. Bu genlerdeki germ hücre soyu mutasyonlarını içeren kadınların yaşamlarının bir döneminde meme kanseri geliştirme riski %50-80 arasında değişmektedir (78). *BRCA1* ve *BRCA2* proteinlerinin hücre proliferasyonunun kontrolünde tümör baskılayıcı proteinler, DNA hasarına ve tamirine katılan proteinler, transkripsiyonun düzenlenmesinde rol alan proteinler, hücre siklusunun kontrol noktalarının önemli proteinleri ve DNA'da rekombinasyonda iş gören proteinler ile yakın ilişkileri gösterilmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2*'deki mutasyonlar ve *BRCA* proteinlerinin inaktivasyonu tümör baskılayıcı proteinlerin ve diğer “genom koruyucu” rolü olan proteinlerinde inaktivasyonuna neden olarak hücreyi tümör oluşumuna götürürler (80).

2.5.5. Klinikte meme kanseri

Meme kanseri, tümörün köken aldığı asıl dokuya göre şu şekilde sınıflandırılır (81-83).

1-Lobüler kanserler: Memenin lobüllerindeki epitel dokudan kaynaklanmaktadır.

a)Noninvaziv lobüler kanserler (Lobüler karsinoma insitu) (LCIS): Başlangıçta lobül içinde sınırlı kalır. Belirti ve kitle oluşturmaz ve yavaş büyür. Bu nedenle yıllarca sessiz kalabilir. Biyopsi örneğinde tesadüfen tanınır. Sıklıkla çift taraflıdır. Vakaların %35'inde giderek invaziv hale gelir. Genellikle genç kadınlarda görülür (81-83).

b)İnvaziv (infiltratif) lobüler kanserler: Nadir (%5- 10) görülür. Genellikle multisentrik (çok merkezli) olup bir veya iki memede birçok alanda deride kalınlaşma görülebilir. Sıklıkla aksiller lenf nodu tutulumu vardır (81-83).

2-Ductal kanserler: Meme kanallarındaki epitel dokudan kaynaklanmaktadırlar.

a)Noninvaziv ductal kanserler (Ductal karsinoma insitu) (DCIS): Lobüler karsinoma insitunun aksine belirgin büyüklüğe ulaşır ve kolaylıkla tanı konulabilir. Tedavi edilmezse invaziv ductal karsinomaya dönüşür (81-83).

b)İnvaziv (infiltratif) ductal kanserler: En yaygın görülen meme kanseri tipidir. Tüm meme kanserlerinin %75'ini oluşturur. Prognozu diğer kanser tiplerinden daha kötüdür. Metastazlarını genellikle aksiller lenf nodlarına yaparlar (81-83).

3-Paget hastalığı: Nadir olup %3 oranında görülür. Başlangıçta meme başında ve areolada yanma hissi, kaşınma, kabuklanma, ülserasyon vardır. Meme başı ve areolada egzamatöz lezyonlar vardır. Geç evrede tümör invaziv hale gelir. Paget hastalığı, enfeksiyon olarak yanlış tanımlanabilir. Paget hastalığının prognozu oldukça iyidir (81-83).

4-İnflamatuvar (iltihabi) kanserler: Meme kanserinin nadir tipi olup %1-2 oranında görülürler. Tümör yumuşak ve ağrılıdır. Belirtileri diğer meme kanserlerinden farklıdır. Memede ödem, kızarıklık, sıcaklık ve deride kalınlaşma bulguları vardır. Meme enfeksiyon görünümünde olduğundan enfeksiyon ile karıştırılabilir. Prognozu oldukça kötüdür (81-83).

2.5.6. Meme kanseri belirti ve bulguları

Meme kanserinin belirti ve bulguları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Belirti ve Bulgular	Yorum
• Kitle	• Hareketsizdir. • Ağrısızdır. • 1-2 cm büyüklüğündedir. • Tek taraflı ve sürekli. • Sınırları kısmen belirlenebilir. • Şekilsiz ve zor palpe edilir.
• Ağrı	• Başlangıçta %90 oranında ağrısızdır. Ağrı geç dönemde oluşur.
• Meme başı akıntısı	• Pek sık rastlanmaz. • Tek taraflıdır. • Genellikle kanlıdır.
• Foeque belirtisi	• Tümör taşıyan göğsün yukarıda, dik ve dolgun olmasıdır. Memenin üst kadrantlardaki kanserlerinde meme başının kitleye doğru çekilmesiyle olur.
• Meme üzerindeki deride ödem	• Tümör hücreleri, cooper ligamentlerindeki lenf damarlarında ilerleyerek derinin yüzeysel lenf damarlarına ulaşır. Lenfler tıkanır, lenf dolaşımı bozulur ve deride sınırlı ödem oluşur
• Meme başında retraksiyon veya çökme	• Tümör’ün büyüyüp meme başını tutması sonucunda oluşur.
• Deride ülserasyon ve eritem	• Kanser ilerleyen dönemlerinde tümör hücrelerinin önce derin fasyaya sonrada M.Pectoralis’e ve göğüs duvarına ilerlemeleri sonucunda oluşur.
• Lenf nodüllerinde büyüme	• Tümör’ün lenf nodüllerine metastazı sonucunda oluşur.
• Üst kolda anormal şişlik	• Lenflerin tıkanması sonucu lenf dolaşımı bozulur ve kolda lenf ödem oluşur.

Tablo 2. 1: Meme Kanseri Belirti ve Bulguları (84)

2.6. Sitostatik ve Sitotoksik Tedavi Prensipleri

Sitostatik ajanlar hücre gelişimini büyüme siklusunun spesifik fazında durdurmak için kullanılırlar. Sitotoksik ajanlar ise hücreleri öldürürler. Bazı sitotoksik ajanlar düşük dozlarda verildiklerinde sitostatik ve bazı sitostatik ajanlar yüksek dozlarda verildiklerinde sitotoksik olabilir. Sitostatik ve sitotoksik ajanların kombine olarak verilmesi prensibinde; teorik olarak daha yüksek oranda tümör hücresinin öldürülebilecek olması düşünülmektedir. Sitostatik ajanlar hücreleri spesifik hücre siklusunda tutmakta kullanılmaktadırlar. Örneğin, Cytarabine sitostatik etkiye sahiptir ve hücreleri G1 ve S fazında tutarlar. Methotrexate, vincristine, thioguanin gibi ajanlar ise S fazında tutarlar (85).

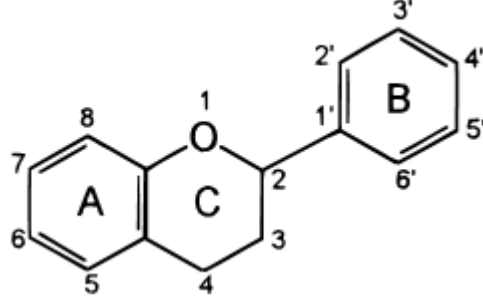
Sitotoksik ajanlar tümörün gerilemesini sağlarken, sitostatik ajanlar tümör hacminde bir değişiklik yapmadan tümör gelişimini yavaşlatır ya da durdurabilir. Sitotoksik ajanlarda dozun arttırılması tümör gerilemesini de arttırır fakat yapılan çalışmalar bazı sitostatik ajanlarda dozun arttırılmasının tümör hacminde herhangi bir değişiklik yapmadığını göstermiştir. Sitotoksik ajanlar tümör küçülmesine bağlı yaşam ömrü ve yaşam kalitesini arttırırken sitostatik ajanlar ise metastazı önleyebilmektedir (86, 87).

2.7. Flavonoid

Flavonoidler yüzyıllardan beri bitki pigmentleri olarak bilinmektedir. Flavonoidlerin biyolojik aktivitelerine ilişkin ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yayınlanmıştır (88). Polifenoller önceleri bitki fizyolojisindeki rolleri ve bitkilerin renk ve lezzet özellikleri üzerindeki etkileri nedeniyle ele alınmakta iken, son yıllarda sağlık üzerindeki etkileri ön plana çıkmış, özellikle antioksidan ve radikal yakalama fonksiyonları nedeniyle dikkat çekmeye başlamışlardır (89, 90). Flavonoid alımının koroner kalp hastalıkları ile kanser gibi hastalıkların engellenmesinde rol oynadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (89, 92).

Flavonoidler en büyük polifenol grubunu oluşturan ve difenilpropanlar ile benzer bir yapıya sahip olan bileşiklerdir (93). Flavan çekirdeği ile karakterize edilen

favonoidler iki benzen halkasının (A ve B) oksijen içeren bir piren halkası (C) ile bağlanmasıyla oluşmaktadır (94).



Şekil 2.6: Temel flavonoid yapısı (94)

2.7.1. Flavonoidlerin in vitro antioksidan etkileri

Halliwell ve Gutteridge'e (95) göre flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları, xanthine oxidase ve protein kinase C gibi süperoksit anyon üretimini sağlayan enzimleri inhibe ederek ve serbest demir, bakır gibi metallerle şelat oluşturarak serbest radikal üretimini sağlayacak elementleri yakalar, reaktif oksijen türleri yapımını baskırlar. Ayrıca reaktif oksijen türlerini süpürücü etkisi ve antioksidan etkisi de bulunmaktadır (96- 98).

Flavonoidlerin serbest radikal yakalama ve antioksidan özelliklerinin yapılarında bulunan üç gruptan ileri geldiği öne sürülmektedir (99). Bu yapısal gruplar şunlardır:

- 1) B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu (radikal hedef yeri),
- 2) C halkasındaki 4-okso grubu ile 2- 3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gereklidir).
- 3) 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimal radikal yakalama ve metal şelatlama için gereklidir).

2.8. Rutaceae

Rutaceae daha çok sedefotu ve turunçgillerle tanınan Sapindales takımına ait bir çiçekli bitki familyasıdır. Bu familya bitkileri tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişen çoğu ağaç, bir kısmı küçük ağaç ya da otsu bitkilerdir. Yaprakları alternan ya da opozit dizilişli, tam veya parçalıdır; çoğunlukla salgı cebi taşır ve kokuludur (100).

Rutaceae zengin familyalardandır, yeryüzünde 140 kadar cins ve 1300 kadar türü yetişir; yurdumuzda yerli olan cinslerinden biri, Ruta, eczacılıkta önemlidir. Buna karşılık birçok yerde yetiştirilen Citrus cinsi, hem ekonomik hem de eczacılık bakımından değer taşır (100). Rutacea familyasına ait bitkiler flavonoid ve alkaloidlerce zengin bir kaynaktır. Son yıllarda yapılan araştırmalar turunçgil limonoidlerinin kansere ve tümör gelişimine karşı önleyici etkilerinin bulunduğunu göstermiştir. Furan halkası bulunduran birçok doğal bileşik, glutatyon S-transferaz (GST) enzim sistemine uyarıcı etki yapar. GST sistemi glutatyon konjugasyonunu katalize ederek, aktif karsinogenlerin daha fazla suda çözülebilir, daha az aktif ve daha kolay vücuttan atılabilir forma geçmesini sağlayan detoksifikasyon fonksiyonunu gösterir (101).

2.8.1. *Phellodendron lavalleyi*



Şekil 2. 7: *Phellodendron lavalleyi* (102)

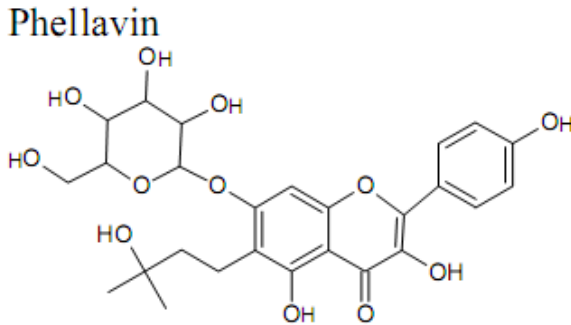
Phellodendron, 10 türe sahip Asyanın tropikal ve yarı tropikal bölgelerine dağılmış Rutaceae familyasına ait olan bir bitkidir (103, 104). Bu bitki, berberin, aphorpine alkaloid, flavonoid ve çeşitli kumarinler, lignan ve limonoidlerce zengin bir kaynaktır (105, 106). Rutaceae familyasına ait *Phellodendron* bitki türlerinden elde edilen bileşiklerin son yıllardaki çalışmalarda bağışıklık düzenleyici, antitümör, antibakteriyel ve glomerüler bazal gangliyon hastalığına karşı etkileri bulunmuştur (107-110).

Phellodendron lavalleyi Rutaceae familyasına ait bir *Phellodendron* türüdür. Ana vatanı Japonya olmasına karşın Gürcistan'ın Kobuleti bölgesinde de yetişmektedir. Kışları yapraklarını döken bir bitki olup yaklaşık 10-15 metreye kadar büyürler. (112-113). Ağaç kabuğu protoberberin tipi alkaloidler, flavonoidler, fenol bileşikler ve polisakkaridler gibi doğal organik kaynaklarca zengindir (114, 115).

Phellodendron lavalleyi'nin farmakolojik in vivo testleri Tbilisi State Medical Üniversitesi Farmakoloji departmanında yapılmış ve hipoglisemik aktivitesi belirlenmiştir (116-119).

2.8.2. Felavin

Gürcistan'ın Kobuleti bölgesindeki Karadeniz kıyısından toplanan *Phellodendron* türü olan *Ph. lavalleyi* bitkisinden Felavin isimli bir flavonoid izole edilmiştir. Ham maddeleri olan yapraklar, bitkinin çiçek açma döneminde toplanmıştır. Henüz bu maddeyle yapılmış ciddi bir farmakolojik çalışma bulunmamaktadır. PL yaprağındaki bileşenlerinin, sitostatik, antioksidan, diüretik, antiherpetik, özellikleri olduğu düşünülmektedir (103, 104).



Şekil 2.8: Felavin'nin yapısı (120)

2.9. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir organ veya dokudan alınan hücrelerin, uygun fizikokimyasal ve biyolojik işlemler sonucu in vitro koşullarda üretilmesi işlemidir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar 1907 yılında Ross Harrison'un kurbağa embriyolarında yapmış olduğu çalışmalara dayanır. İlerleyen yıllarda uygun kültür besi ortamlarının geliştirilmesi ve besi ortamının içine antibiyotik eklenmesi kontaminasyon sorununu çözmüş ve bu teknolojinin, hastalıkların patogenezinin araştırılmasında, ilaç denemelerinin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde birinci basamak çalışma içine girmesinin yolunu açmıştır (121, 122).

Hücre kültürü kaynaklarına göre primer kültürler ve hücre hatları olmak üzere 2'ye ayrılır.

1) Primer Kültürler: Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildikleri dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildirler. Primer kültürde hücre soyu sonludur yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölürler.

2) Hücre hatları (cell line): Primer kültürden spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden ya da kimyasal ajanlar ya da virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokusundan alınan hücrelerden de elde edilirler. Hücre hatları primer kültürden yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörleri ve seruma daha az gereksinim duymaları, çoğalmak için bir zemine tutunma gereksinimlerinin daha az olması, sonsuz çoğalma yetenekleri (bu özellikleri ile tümör hücrelerine benzerler) gibi özellikleri ile farklılık gösterirler.

Büyüme biçimlerine göre hücre kültürleri süspansiyon ve monolayer kültürler olarak ikiye ayrılırlar. Süspansiyon hücreler kültür kabında yapışma göstermezken monolayer hücreler yaşadıkları kabın zeminine tutunarak büyüme gösterirler (121).

MCF-7 hücre hattı: İlk kez 1970 yılında Kafkas ırkından olan 69 yaşındaki bir kadından alınan dokudan geliştirilmiştir. İnsan meme kanseri hücre hattı olup, morfolojik olarak aderent bir yüzeye tutunarak büyüyen fibroblast benzeri hücrelerdir (123)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

İnsan meme kanseri hücre kültüründe (MCF-7) PL bitkisinden elde edilen felavin saf maddesinin apoptotik ve sitostatik etkisinin incelenmesi amacıyla planlanan bu çalışmada kullanılan MCF-7 hücre serisi İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü Laboratuvarı'ndan ve Felavin saf maddesi Gürcistan Tiflis'deki Farmakokimya Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Felavin maddesi %1'lik DMSO'da çözölmüş ve MCF-7 hücre serisinde denenmek üzere 6 doz (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M) hazırlanmıştır. Çalışmanın tamamı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Faköltei Farmakoloji Anabilim Dalı hücre költürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

- 1) DMEM, GIBCO
- 2) Fetal Sığır Serumu, GIBCO
- 3) Tripsin EDTA, %0.05, GIBCO
- 4) DMSO, Sigma
- 5) Antibiyotik, GIBCO 100X
- 6) Kaspaz 3 kolorimetrik kit, İnvitrogen
- 7) MTT, ROCHE
- 8) PBS, 10X liquid, Santacruz
- 9) Biüret çözeltisi
- 10) Akridin oranj, İnvitrogen
- 11) Etidiyum bromit, Sigma

3.2. Kullanılan Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Sıvı azot tankından alınan hücrelerin ekimi ve tripsinizasyonu

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki MCF-7 hücreleri 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü. (Hücrelerin bulunduğu tüpün tamamen suya batırılmamasına dikkat ettik). Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silindi. 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 10 ml ortam (%10 FCS, %1 antibiotik, DMEM) yavaşça eklendi. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 5ml yeni ortam eklendi ve hücreler iyice süspanse edildi. Hücreler 25 cm²'lik flasklara aktarıldıktan sonra mikroskop altında incelendi. CO₂ inkübatörüne kaldırarak bir gün beklendi. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelenip, ortamları değiştirildi.

24 saatlik inkübasyondan sonra flask inkübatörden alınıp steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum döküldü. Flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1ml PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS dökülüp, 1ml %0,05'lik tripsin-EDTA ilave edildi ve flask hücreler zeminden ayrılana kadar inkübatörde bekletildi. Inkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları gözlemlendikten sonra, hücreleri tripsinden uzaklaştırmak için flaska 2 ml ortam eklenerek hücreler falkon tüpe aktarıldı ve 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı, ardından tüpün dibinde kalan hücre pelleti 1 ml DMEM içinde süspanse edildi. Hücreler sayıldı ve istenen sayıda flaska ekim yapıldı.

Hücre sayımı

Hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamalarında yapılır. Santrifüj sonrasında falkon tüpün dip kısmında kalan hücreler 1ml DMEM'le iyi bir şekilde pipetaj yapılarak homojen hale getirilir. Karışımdan 10µl çekilerek thoma lamına yayılır. Faz kontrast mikroskopta thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamaları alınır. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edilir.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = A \times SF \times 10.000$$

Burada A 16 büyük karede sayılan hücre sayısı, SF sayırltme faktörü, 10.000 ise 0,1 mm³’ deki sayım sonucunu 1ml’ deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değışmezdir.

Alt kültürleme

Hücrelerin pasajlanması, üç-dört günde bir olacak şekilde yapıldı. Bir önceki kültürdeki hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılıp, 1500 rpm’de 3 dakika sentrifüj edildi ve toplam hücre miktarının en fazla 1/3’ü kadar hücre taze besiyerine alınıp 75 cm²’lik flasklara aktarılması şeklinde yapıldı. Çalışmadan bir önceki pasajın semi-konflens hücreler kullanılarak yapılması ve pasajdan sonra hücrelerin zemine tutunabilmeleri için 24 saat beklenmesine dikkat edildi.

3.2.2. Felavin’in etkisinin hücre sayımı ile belirlenmesi

MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu mikropklara her bir kuyucukta 2.10⁵ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin zemine tutunması için 24 saat 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde beklendikten sonra hücrelerin ortamına Felavin’in önceden belirlenmiş konsantrasyonları (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸M) ve % 1 DMSO eklendi. Hücre büyüme oranları 24, 48, 72. saatlerde hücre sayımı ile analiz edildi.

3.2.3. Felavin’in etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesi ve etken dozunun hesaplanması

Kolorimetrik metot olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan MTT yönteminde, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri izopropanol ve DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir. 96’lık mikropkğa kontrol grubu, % 1 DMSO grubu ve Felavin’in farklı konsantrasyonlarını

içeren(10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M) gruplar oluşturularak her bir kuyucukta 2.10^4 hücre olacak şekilde MCF-7 hücreleri ekildi. Ekimden sonraki 24. saatte hücrelere % 1 DMSO ve Felavin konsantrasyonları uygulandı. Hücreler 24, 48 ve 72 saat için inkübasyona bırakıldı.

Felavin ile muamele edilen gruplara 10 µl MTT solüsyonundan eklendi ve 37°C 'de %5'lik CO_2 'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. DMSO ile kristaller çözüldükten sonra ELİSA ile 570 nm'de okutuldu ve sonuçlar hesaplandı. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden hücrelerin yaşama oranını % 50 azaltan doz hesaplanarak IC50 dozu bulundu.

3.2.4. Felavin verilmiş hücrelerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Faz kontrast mikroskobunda hücre proliferasyonunu morfolojik olarak belirlemek için 6'lık mikropklara her kuyucukta 2.10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ortama 10^{-4} ve 10^{-7} M Felavin eklenerek 24, 48 ve 72. saatlerde gözlemlemek üzere inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Hücrelerde apoptozisi belirlemek için kaspaz-3 aktivasyonu tayini

Kaspaz-3 aktivitesi İnvitrogen kaspaz- 3 kolorimetrik ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. Hücrelerin mikropklara ekimi yaklaşık 2 günde replike olmaları nedeniyle 24, 48 ve 72 saatler için farklı sayılarda yapıldı. Bunun nedeni, kuyucuklarda fazla sayıda hücre olduğunda hücrelerin sıkışarak tutunabilecekleri alanın oluşmaması ve sonuçta hücrelerin ölmesiydi. Bu olay apoptozis değerlendirmesi açısından negatif sonuçlar doğurabileceğinden farklı sayıda hücre ekimi uygulaması yapıldı.

- MCF-7 hücrelerinin ekimi 6'lık mikropklara 24 saatlik uygulama için her kuyucukta 4.10^5 , 48 saatlik uygulama için her kuyucukta 3.10^5 , 72 saatlik uygulama için her kuyucukta 2.10^5 hücre olacak şekilde yapıldı.
- 24 saat sonra Felavin'in IC50 dozu olan 10^{-4} M ve apoptoz yaptığı düşünölen 10^{-7} M dozları hücrelere uygulandı. Ayrıca %1 DMSO uygulanmış bir kontrol gurubu hazırlandı.

- 24, 48 ve 72. saatlerde hücreler tripsinle mikropıaktan toplandı ve tripsinden uzaklaştırmak amacıyla iki katı ortam eklenerek 1500 rpm de 3 dk. senrifüj edildi.
- Hücreler 1 ml. DMEM içinde ependorfa aktarılıp sayıldı.
- Tekrar 4000 rpm de 4 dk. senrtifüjden sonra DMEM çekildi ve üzerine 50 µl cell lysis buffer eklendi.
- 10 dk. buzda bekletildi.
- 11000 rpm de 1 dk. sentrifüj edildi, süpernatant alınıp farklı bir ependorfa aktarıldı.
- Protein tayini biüretle yapıldı.
- 50 µl'de 50-200 µg protein olacak şekilde cell lysis buffer eklendi.
- 1 ml. 2x reaction buffer'a 10 µl 1M'lık DTT eklendi. (final konsantrasyonu 10 µl olacak)
- Her örneğe 50 µl 10 mM'lık DTT içeren 2x reaction buffer eklendi.
- 4 mM'lık DEVID- Pna'dan final konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde 5 µl eklendikten sonra 37°C'de 2 saat inkübe edildi.
- 405 nm'de ölçüm yapıldı.

3.2.6. Akridin oranj ve etidiyum bromit ile boyama

Akridin oranj plazma membranına girer ve intraselüler nükleik asidi boyar, düşük boya konsantrasyonunda yeşil floresan üretir. Canlı hücreler etidiyum bromit ile yeşil renkli, ölü hücreler akridin oranj ile portakal renkli görülür.

MCF-7 hücreleri 6'lık mikropıaklara 24 saatlik uygulama için $4 \cdot 10^5$, 48 saatlik uygulama için $3 \cdot 10^5$ ve 72 saatlik uygulama için $2 \cdot 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Önceden belirlenen Felavin konsantrasyonları ($10^{-4}M$ ve $10^{-7}M$) hücrelerin ortamına eklenerek 24, 48, 72 saat 37°C de inkübatör ortamında tutuldu. Bu sürenin bitiminde hücrelerin ortamına daha önce hazırlanmış 1:10 oranında PBS içersinde seyreltilen 200 µl Akridin oranj (100 µg/ml) ve Etidiyum bromit (100 µg/ml) karışımı eklendi. Hücreler 5 dk. Oda ısısında bekletildikten sonra floresan mikroskop ile incelemeye alındı.

3.2.7. İstatistiksel değerlendirme

Deneylerde sonuçlar $\pm$ standart hata olarak hesaplanmıştır. Gruplar arası farkın saptanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmış, anlamlılık belirlenmişse post-hoc test olarak Tukey testi kullanılmıştır.

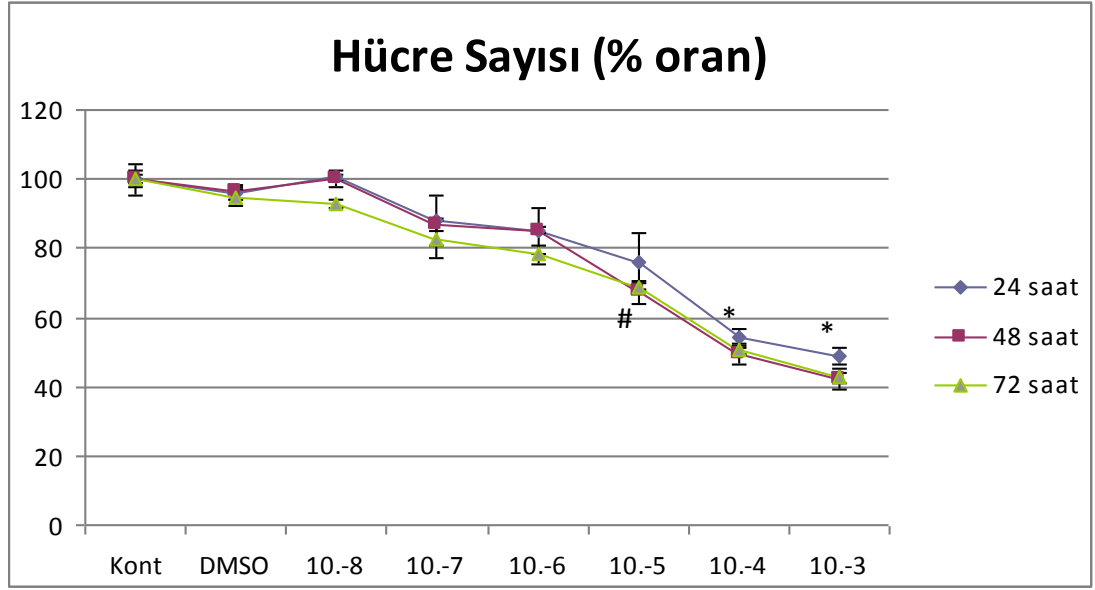
4. BULGULAR

4.1. Hücre Büyüme Eğrileri

Hücre büyüme oranları, faz kontrast mikroskopunda hücre sayımı ve MTT boya indirgeme yöntemi olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak analiz edildi. Elde edilen veriler kullanılarak, Microsoft Excel grafik programı ile hücre büyüme eğrileri çıkarıldı.

4.1.1. Hücre sayımı ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi

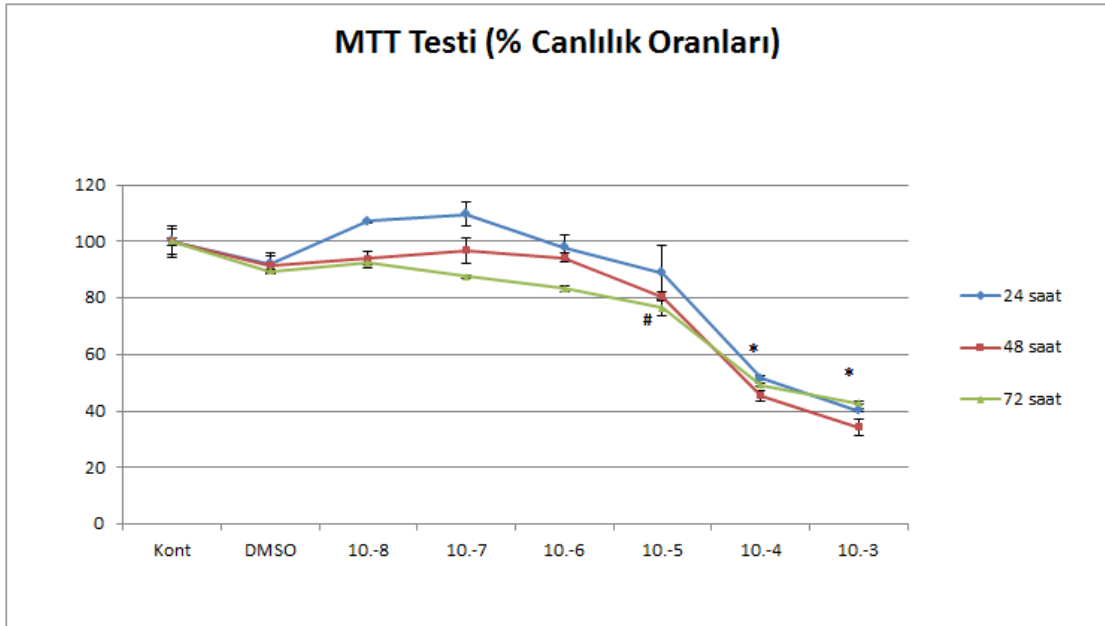
Felavin'in sitostatik etkisinin belirlenmesi ve IC50 dozunun bulunması için 6 dozu (10^{-8} M 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M ve 10^{-3} M) hücrelere verildikten sonra 24, 48 ve 72. saatlerde faz kontrast mikroskopunda hücre sayımı yapıldı. Farklı konsantrasyonlardaki felavinin 24, 48 ve 72 saatlik etkilerine bakıldı. Her üç zaman diliminde de 10^{-3} M ve 10^{-4} M felavin dozlarının olduğu kuyucuklarda hücre sayılarında anlamlı bir azalma tespit edildi. 10^{-5} M felavin dozu da 48 ve 72. saatlerde anlamlı bulundu. Bu çalışmada, felavinin MCF-7 insan meme kanseri hücre serisi üzerinde sitostatik bir etkisi tespit edilmedi fakat artan dozlarında sitotoksik etkisi görüldü. 10^{-4} M'lık Felavin konsantrasyonu IC50 dozu olarak belirlendi. Hücre büyüme eğrileri Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: MCF-7 hücre büyüme eğrisi (* için 10⁻⁴M ve 10⁻³M felavin konsantrasyonu her üç zaman grubunda da p< 0,001; # için 10⁻⁵M felavin konsantrasyonu 48 ve 72. saatte p< 0,001), (n=3).

4.1.2. MTT yöntemi ile hücre büyüme eğrisinin belirlenmesi

MTT testi canlı hücre sayısını belirlemede kullanılan kolorimetrik bir metottur. Felavin flavonoidinin 6 dozu (10^{-8} M 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M ve 10^{-3} M) hücrelere verilmiş ve 24, 48, 72. saatin sonunda MTT yöntemi ile formazan kristalleri ölçülmüştür. Ölçüm sonunda kontrol grubunda bulunan hücrelerin formazan kristalleri oluşturduğu, DMSO grubunda hücre yaşama oranında az bir düşüş olduğu gözlenmiştir. En düşük dozlar olan 10^{-8} M ve 10^{-7} M felavin dozlarında 24. ve 48. saatte yaşayan hücre sayısında hafif bir artış gözlenirken 72. saatte bu iki dozda yaşayan hücre sayısında düşüş tespit edilmiştir. 10^{-5} M felavin dozundan sonraki artan dozlarda ise hücre yaşayabilirliğinde ani düşüş görülmüş ve IC50 dozu olarak 10^{-4} M felavin dozu belirlenmiştir (Şekil 3. 2).

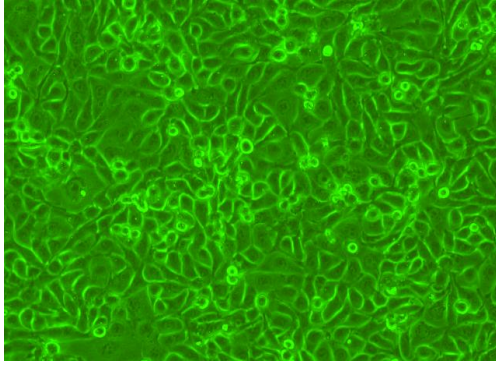


Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlardaki felavinin MCF-7 hücre canlılık oranları üzerindeki etkisi (* için en yüksek 2 konsantrasyon (10^{-3} M, 10^{-4} M) 24, 48 ve 72. saatlerde $p < 0,001$; # için 10^{-5} M felavin konsantrasyonu 72. saatte $p < 0,05$), (n=3).

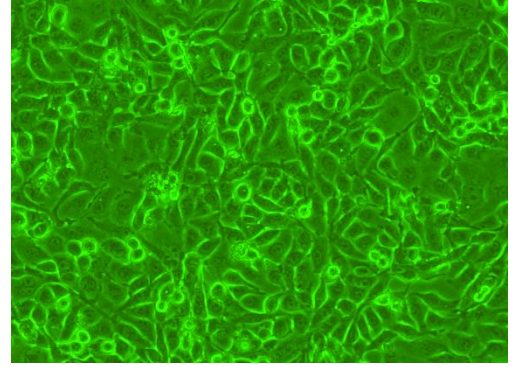
4.1.3. Hücre proliferasyonunun morfolojik olarak değerlendirilmesi

Felavin'in IC50 dozu olan 10^{-4} M'lık konsantrasyonu ve karşılaştırma amaçlı seçilmiş düşük konsantrasyonlardan biri olan 10^{-7} M hücrelerin ortamına eklendi 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda faz kontrast mikroskobunda morfolojileri değerlendirildi.

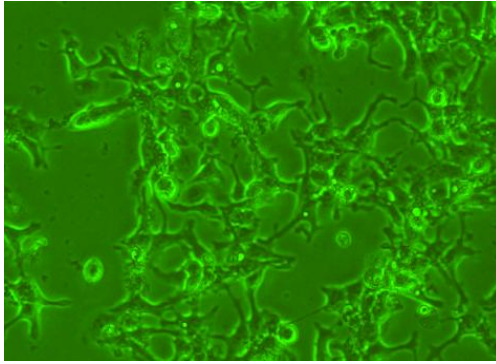
Üç zaman diliminde de mikroskobik incelemelerde kontrol grubuyla DMSO grubu arasında farklılık görülmedi, her iki gruptaki hücrelerinde sağlıklı ve düzgün morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. En çok hücre kaybının 10^{-4} M'lık dozda olduğu gözlemlendi. 10^{-4} M Felavin konsantrasyonunda hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu, deforme olarak daha yuvarlak şekilli, koyu renkte oldukları ve canlı hücre sayısının oldukça azaldığı görüldü. MTT ve hücre sayımı testlerinde 10^{-7} M Felavin dozunda hücre sayısında azalma görülmemesine rağmen mikroskobik görüntülerde, bu dozda hücrelerin bir kısmının tutunma kabiliyetlerini yitirmelerine bağlı olarak hücreler arası boşlukların arttığı, hücre yoğunluğunun azaldığı görüldü. (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



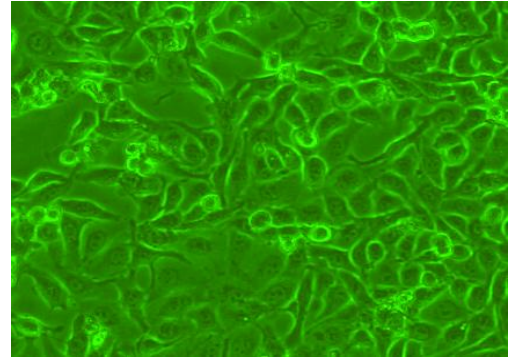
A) Kontrol (24.sa.)



B) DMSO (24.sa.)

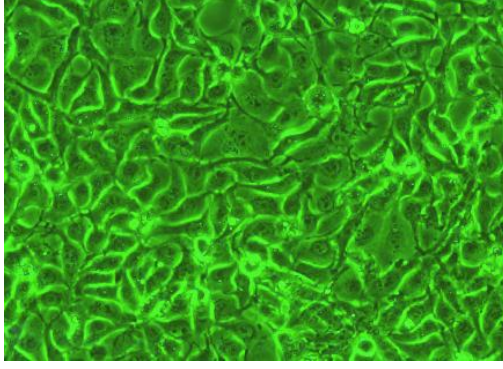


C) 10^{-4} M Felavin (24.sa.)

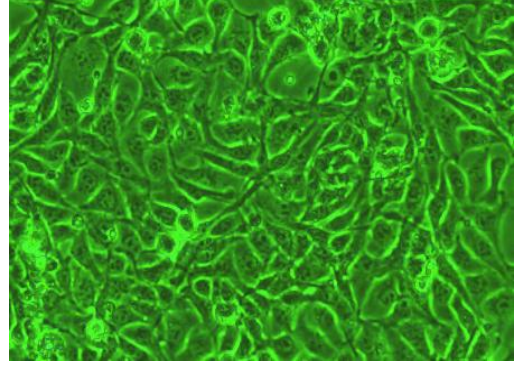


D) 10^{-7} M Felavin (24.sa.)

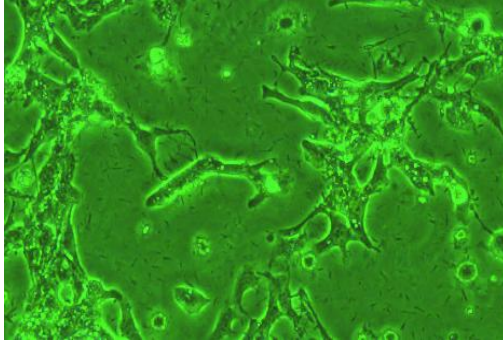
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 24. saatte faz kontrast mikroskopunda alınan görüntüleri (20x). Kontrol grubu (A), DMSO grubu (%1) (B) ve 10^{-4} M felavin (C) 10^{-7} M felavin (D)



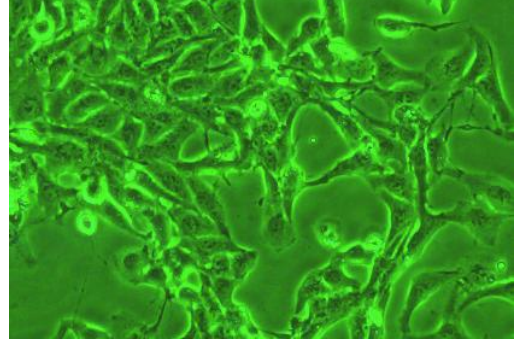
A) Kontrol (48.sa.)



B) DMSO (48.sa.)

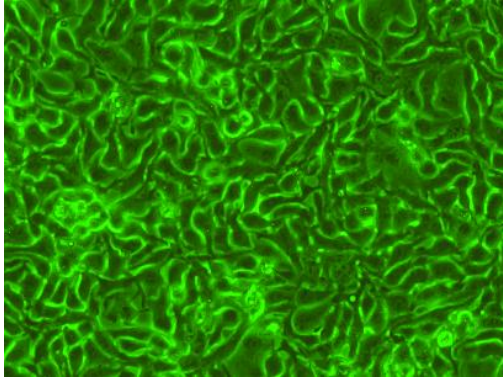


C) 10⁻⁴M Felavin (48.sa.)

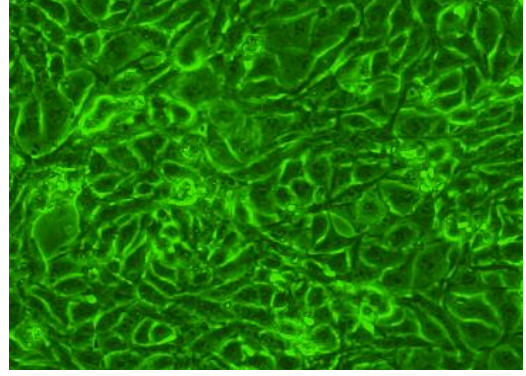


D) 10⁻⁷M Felavin (48.sa.)

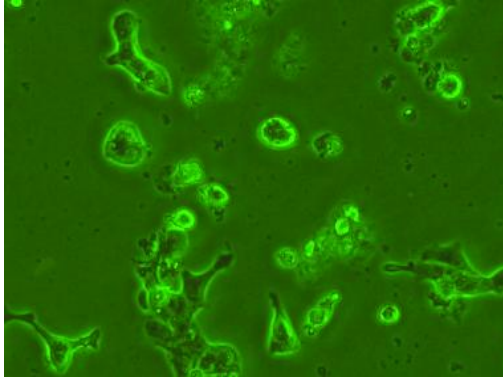
Şekil 4.4: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 48. saatte faz kontrast mikroskopunda alınan görüntüleri (20x). Kontrol grubu (A), DMSO grubu (%1) (B) ve 10⁻⁴M felavin (C) 10⁻⁷M felavin (D)



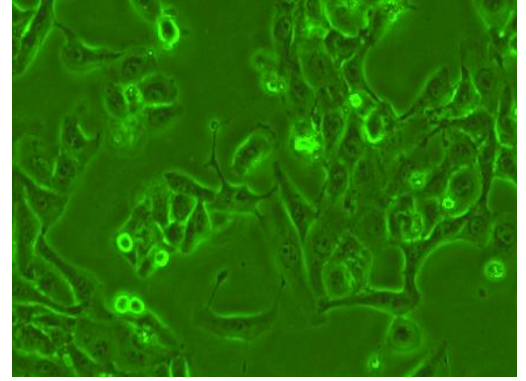
A) Kontrol (72. sa.)



B) DMSO (72.sa.)



C) 10^{-4} M Felavin (72. sa.)



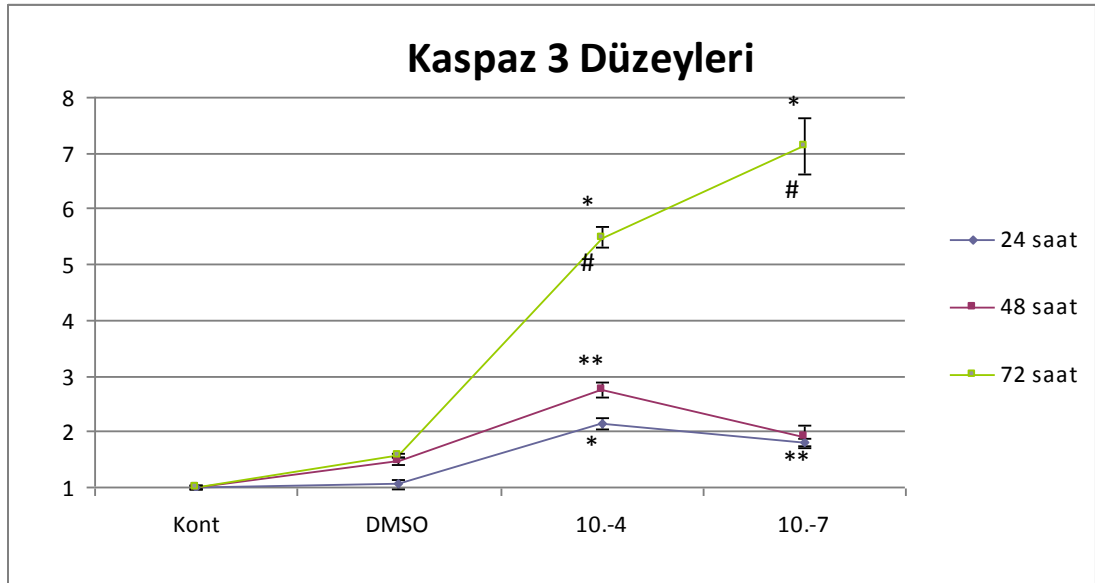
D) 10^{-7} M Felavin (72.sa.)

Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda Felavin uygulanan MCF-7 hücrelerinin 72. saatte faz kontrast mikroskopunda alınan görüntüleri (20x). Kontrol grubu (A), DMSO grubu (%1) (B) ve 10^{-4} M felavin (C) 10^{-7} M felavin (D)

4.2. Kaspaz- 3 Aktivasyonu Sonuçları

Hücrelerde apopitozisi belirlemek için ELİSA yöntemiyle hücrelerin kaspaz-3 seviyeleri ölçüldü. Felavin' in seçilen IC50 dozu olan 10^{-4} M ve düşük dozlarından olan 10^{-7} M dozlarının 24, 48 ve 72. saatlerdeki kaspaz-3 düzeylerine bakıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kaspaz-3 ELİSA sonuçlarında, 24 ve 48. saatlerde 10^{-4} M Felavin dozu verilen grupların DMSO'lu gruba göre kaspaz-3 seviyelerinin yaklaşık 2 katı arttığı gözlemlendi. 72. saatte ise bu oran yaklaşık 4 kat olarak tespit edildi. 10^{-7} M Felavin dozu'na maruz bırakılmış grupların 24 ve 48. saatlerinde yaklaşık 2 katı bir artış görülüp anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak $p < 0,05$ çıktı. Aynı dozun 72 saatlik uygulamasında kaspaz- 3 düzeyinde ciddi bir artış olup bu artış yaklaşık 5 kat olarak tespit edildi. Bu sonucun ise anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde $p < 0,001$ olarak çıktı. (Şekil 4.6)

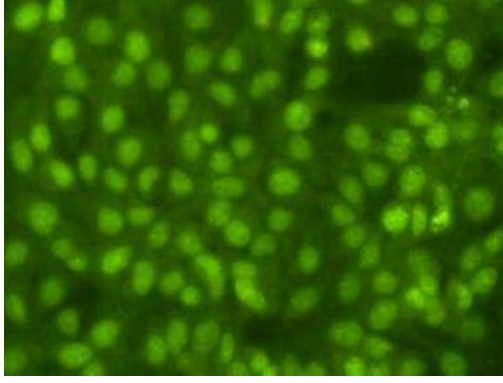


Şekil 4.6: Farklı Felavin konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki kaspaz-3 seviyelerine etkisi (* için felavin konsantrasyonlarının DMSO'ya göre kıyaslanması $p < 0,001$; ** için felavin konsantrasyonlarının DMSO'ya göre kıyaslanması $p < 0,05$; # için aynı konsantrasyonlardaki (10^{-4} ve 10^{-7} M) felavinin 24, 48 ve 72 saatlik gruplarının birbirine göre kıyaslanması $p < 0,001$), (n=3).

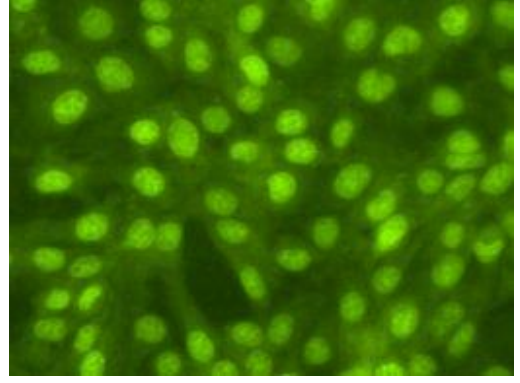
4.3. Akridin Oranj ve Etidiyum Bromit ile Boyama Sonuçları

MTT ve hücre sayımı ile belirlenmiş IC50 dozu olan Felavin'in 10^{-4} M konsantrasyonu ve 72. saatte kaspaz seviyesinde ciddi bir artışa neden olan 10^{-7} M konsantrasyonu hücrelere verilerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Felavin uygulaması biten hücrelere akridin oranj ve etidiyum bromit ile hazırlanan boya karışımı eklendikten sonra floresan mikroskobunda apoptotik hücreler tespit edildi.

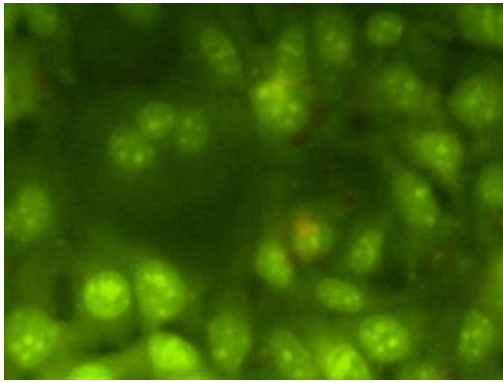
Her üç zaman diliminde de kontrol ve DMSO uygulanan grupta apoptotik hücre gözlenmedi. İlk 24 ve 48. saatlerde 10^{-7} M'lık Felavin konsantrasyonları verilmiş hücrelerde neredeyse hiç apoptotik hücre gözlenmezken 48. saat sonunda 10^{-4} M'da apoptotik hücre sayısında artış gözlemlendi. 72 saatlik uygulamada ise 10^{-7} M Felavin konsantrasyonu uygulanan grupta akridin oranj ile turuncu renk boyanan apoptotik hücre sayısında DMSO verilmiş gruba göre ciddi bir artış tespit edildi. 72. saatte 10^{-4} M'da ise hücre sayısının diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Toplam hücre sayısına göre akridin oranj ile turuncu boyanan apoptotik hücrelerin ciddi artış gösterdiği fakat etidiyum bromit ile kırmızı renkli boyanan hücrelerin sayısının 10^{-7} M Felavin konsantrasyonu ile muamele edilmiş gruba göre kıyaslandığında fazla olduğu gözlemlendi.



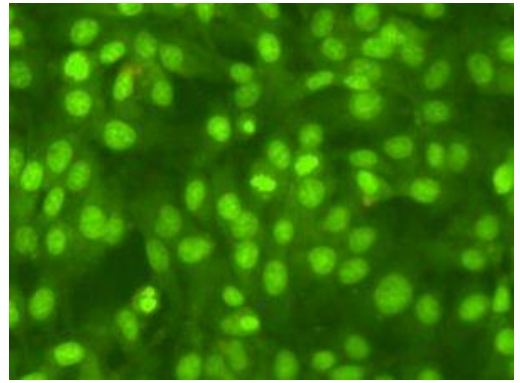
A) MCF-7 kontrol (24. saat)



B) MCF-7 DMSO (24. saat)

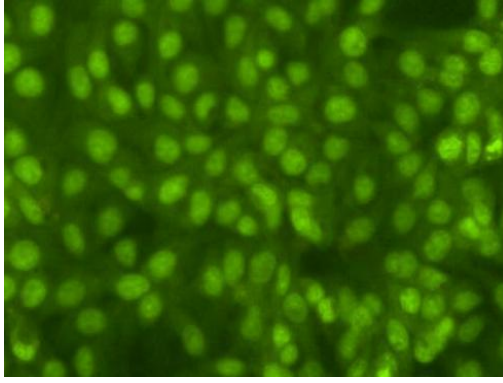


C) MCF-7 10^{-4} M felavin (24. saat)

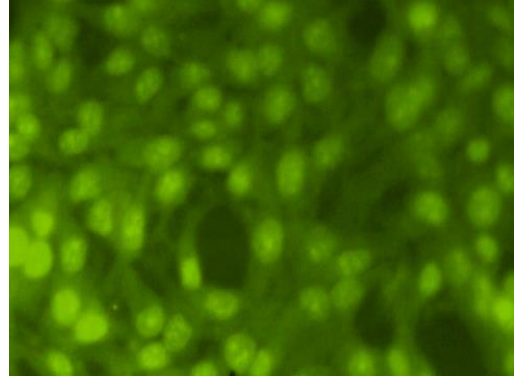


D) MCF-7 10^{-7} M felavin (24. saat)

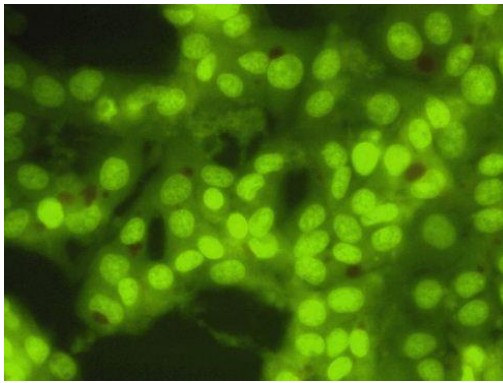
Şekil 4.7: Felavin uygulanan hücrelerin 24. saatte akridin orange ve etidiyum bromit ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri (20x). (A) Kontrol, B) DMSO grubu (%1), C) 10^{-4} M Felavin D) 10^{-7} M Felavin) Canlı hücreler etidiyum bromit ile yeşil renkli, ölü hücreler ise akridin oranj ile turuncu renkli görülmektedir. İleri apoptotik evrede ise ölü hücreler etidiyum bromit ile kırmızı renkli görülmektedir.



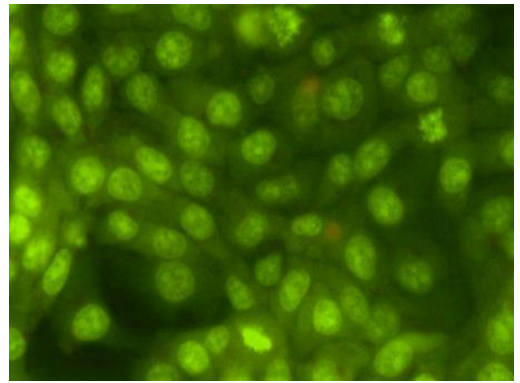
A) MCF-7 48. saat kontrol



B) MCF-7 48. saat DMSO

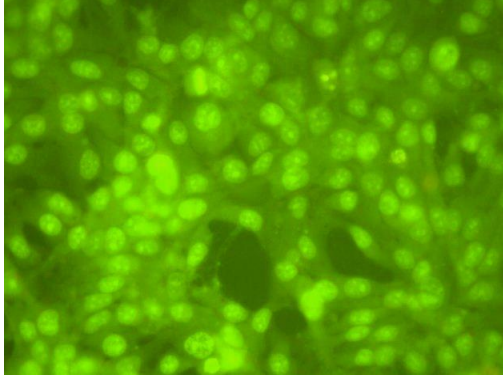


C) MCF-7 48. saat 10^{-4} M felavin

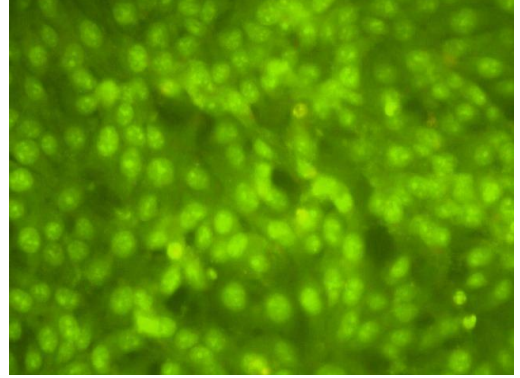


D) MCF-7 48. saat 10^{-7} M felavin

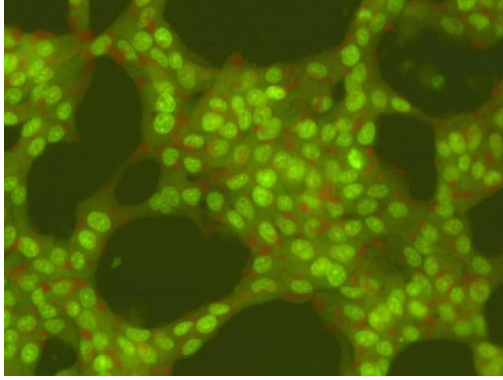
Şekil 4.8: Felavin uygulanan hücrelerin 48. saatte akrinin oranj ve etidiyum bromit ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri (20x). (A) Kontrol, B) DMSO grubu (%1), C) 10^{-4} M Felavin D) 10^{-7} M Felavin). Canlı hücreler etidiyum bromit ile yeşil renkli, ölü hücreler ise akrinin oranj ile turuncu renkli görülmektedir. İleri apoptotik evrede ise ölü hücreler etidiyum bromit ile kırmızı renkli görülmektedir.



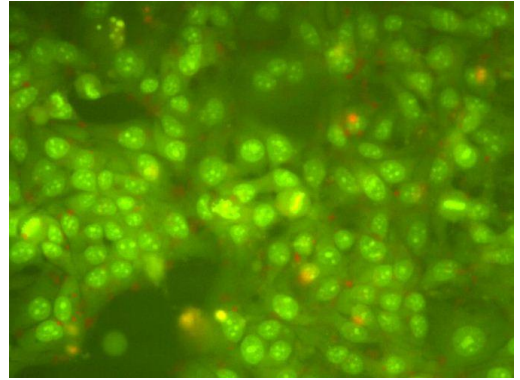
A) MCF-7 kontrol (72.saat)



B) MCF-7 DMSO (72. saat)



C) MCF-7 10^{-4} M felavin (72.saat)



D) MCF-7 10^{-7} M felavin (72. saat)

Şekil 4.9: Felavin uygulanan hücrelerin 72. saatte akridin oranj ve etidiyum bromitle boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri (20x). (A) Kontrol, B) DMSO grubu (%1), C) 10^{-4} M Felavin D) 10^{-7} M Felavin). Canlı hücreler etidiyum bromit ile yeşil renkli, ölü hücreler ise akridin oranj ile turuncu renkli görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Phellodendron, berberin, aphorpine alkaloid, flavonoid ve çeşitli kumarinler, lignan ve limonoidlerce zengin bir kaynaktır (105, 106). Rutaceae familyasına ait *Phellodendron* bitki türlerinden elde edilen bileşiklerin son yıllardaki çalışmalarda bağışıklık düzenleyici, antitümör, antibakteriyel ve glomerüler bazal gangliyon hastalığına karşı etkileri bulunmuştur (107-110).

Literatürde PL bitkisi ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Ekstresinin farmakolojik in vivo testleri Tbilisi State Medical Üniversitesi Farmakoloji departmanında yapılmış ve hipoglisemik aktivitesi belirlenmiştir (116-119). Son yıllarda, *Phellodendron* türüne ait bitkilerden *Phellodendron amurense* (PA) ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Kumar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PA bitkisinin ağaç kabuğundan elde edilen ekstresinin prostat kanseri hücre serisindeki etkilerini araştırmışlardır. Hem androjene bağımlı hem de androjenden bağımsız insan prostat kanseri hücre serisinde PA ekstresinin NFκB inhibisyonu yaparak ve apoptozu uyarak proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir. (125, 126). Wei Wang ve arkadaşları, PA bitkisinin antioksidan, antimikrobial ve antiherpes aktivitesini in vitro ortamda değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında PA ekstresindeki flavonoid miktarını ölçmüşler ve serbest oksijen radikallerini süpürücü antioksidan etkisini tespit etmişlerdir. Ayrıca Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal ve herpes virus tip 1 üzerinde de antiviral etkisini bulmuşlardır (127). Yapılan çalışmalar bize *Phellodendron chinense schneid* ve *Phellodendron amurense* bitkilerinden izole edilen berberin saf maddesinin apoptozu uyarıcı, hücre siklusunu durdurucu ve metastazı önleyici antineoplastik özelliklerini düşündürmüştür. Berberinin insan meme kanseri, nöroblastoma, akciğer kanseri kolon kanseri gibi birçok hücre serilerinde etkilerine bakılmış ve apoptoza neden olarak ciddi bir antiproliferatif etki oluşturduğu saptanmıştır. (128-131).

Çalışmamızda *Phellodendron* türlerinin kanser hücreleri üzerinde yapılmış çalışmalarından yola çıkarak PL'den izole edilmiş Felavin maddesinin MCF-7 hücre serisindeki sitostatik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Yapılan hücre sayımlarının ve MTT testlerinin sonuçları birbirleriyle uyumlu bulunmuş olup IC₅₀ dozu olarak 10⁻⁴M Felavin konsantrasyonu belirlenmiştir. 10⁻⁷M Felavin dozunda uzun süreli

uygulama sonunda hücre yaşayabilirliği oranlarında çok az bir düşüş gözlenmesi bize bu dozun kronik kullanımda hücreler üzerinde toksik etkilerinin olabileceğini düşündürdüğünden bu doz sub-toksik doz olarak kullanılmıştır. Hücrelerin morfolojileri bu iki doz kullanılarak değerlendirilmiştir. Faz kontrast mikroskopunda yapılan değerlendirmede kontrol grupları ve %1 DMSO gruplarının hücre morfolojilerinde farklılıklar görülmemiş olup, ayrıca yapılan kaspaz- 3 aktivasyon testi ve floresan boyamalarda da herhangi bir apoptotik ya da nekrotik durum tespit edilmemiştir. 10^{-7} M ve 10^{-4} M Felavin konsantrasyonlarının olduğu gruplardaki morfolojik değerlendirmelerde yüksek dozda hücre yapısının parçalanarak bozulduğu, düşük konsantrasyonda ise hücrelerin diğer hücrelerle bağlantılarını kaybettiği fakat hala membran bütünlüğünü korudukları gözlenmiştir. Yapılan hücre canlılığı testlerinden elde edilen sonuçlar, Felavin'in hücre sayısında aşırı bir azalmaya sebep olması nedeniyle sitostatik değil de sitotoksik bir etkisinin olduğunun göstergesidir. Fakat bazı sitotoksik ajanlar düşük dozlarda verildiklerinde sitostatik ve bazı sitostatik ajanlar yüksek dozlarda verildiklerinde sitotoksik olabilmektedir (85). Bu sebeple, Felavin maddesinin 10^{-8} M'dan daha düşük konsantrasyonlarda 72 saatten daha uzun kronik uygulamalarında sitostatik etkisinin olabileceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır.

Felavin'in sitotoksik etkisinin apoptozla mı yoksa nekrozla mı olduğunu anlamak amacıyla kaspazların apoptotik hücre ölümünde önemli bir yere sahip olduğu bilindiğinden kaspaz-3 aktivasyonu testi yapılmıştır. Kaspaz-3, spesifik proteinleri katalize ederek hücre ölümüne neden olan proteazların aktiflenmesinde önemli rol oynar. Hem ekstrinsik, hem intrinsik yolda apoptoz indüksiyonu için kritik önem taşır (132,133). Sean Tracy ve arkadaşlarının akciğer kanseri hücre kültüründe yaptığı bir çalışmada, epidermal büyüme faktörü reseptör inhibitörü olan Gefitinib'in hücrelerde ölümüne neden olduğu ve Western blot yöntemi ile kaspaz seviyeleri ölçülerek buradaki hücre ölümünün apoptoz ile olduğu bulunmuştur (134). Ayrıca Hyo Won Jang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da Phellodendron türlerinden olan Phellodendri cortex (PC) ekstresinin sıçan feokromositoma PCI2 hücre serisi üzerinde doz-zaman bağımlı apoptotik etkisine bakılmıştır. PC ekstresinin bax/bcl-2 oranını artırdığı ve böylece sitokrom c'nin sitoplazmaya geçişine neden olup, kaspaz-3 aktivasyonunu artırarak apoptozu

indüklediği gösterilmiştir (135). Meme kanseri hücre serisi üzerinde yapılan başka bir çalışmada da kaspaz-3'ün, apoptozdaki rolünün yanında hücre ölümü sırasında hücredeki morfolojik değişimlerden de sorumlu olduğu gösterilmiştir (136).

Çalışmamızda, kaspaz-3 aktivasyonu testi sonuçlarına bakıldığında, en yüksek kaspaz-3 değerinin 3. günde düşük doz olan 10^{-7} M Felavin verilen gruba ait olduğu görülmüştür. Ayrıca ilk 24 ve 48. saatlerde bu dozda kaspaz-3 aktivasyonunun kontrole göre yaklaşık iki kat artarken bu oranın 72. saatte ciddi bir artışla 5 kata kadar çıkması bize Felavin'in hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin uzun süreli uygulamada maksimuma çıktığını göstermiştir. Benzer şekilde Aso ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan histiositik lenfoma U937 hücre serisi üzerinde Brezilya Propolis'i'nin etanollü ekstraktından izole edilen CB Propolis'in inhibitör etkilerini araştırmışlardır. Bu propolis'in doz-zaman bağımlı olarak hücrelerin büyümesini ve makromoleküler sentezini inhibe ettiğini ve ayrıca apoptozun en yoğun olarak 72. saatte indüklendiğini bulmuşlardır (137). Biray Ç. ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise Propolis ve etken maddelerinin insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre serisinde propolis'in artan dozlarının apoptotik etkilerine 24, 48, 72 ve 96. saatlerde bakılmış ve apoptozun maksimuma ulaştığı süre 48. saat olarak belirlenmiştir (138). Yapmış olduğumuz araştırmada da benzer şekilde 48. saatten sonra apoptozda ani bir artış olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda kaspaz-3 aktivasyonu testini doğrulamak için floresan boyama testi de kullanılmıştır. Yüksek dozda 24 saat sonundaki kaspaz-3 seviyelerinde artış gözlenmiş olmasına rağmen aynı gruptaki akrinin oranj ve etidiyum bromit ile boyanan hücrelerin floresan mikroskobu altında elde edilen görüntüleri incelendiğinde etidiyum bromit ile boyanan hücrelerin fazlalığı bize, hücre membran bütünlüğünün bozulduğunu ve hücrelerin ölüm sebebinin nekrotik sürece daha yakın olduğunu göstermiştir. Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde en fazla apoptotik hücrenin, 10^{-7} M Felavin dozunun 72 saatlik uygulaması sonucunda olduğu gözlenmiştir.

Felavin'in etkisiyle meydana gelen apoptozda, Felavin'in bu etkiyi meme kanseri hücreleri üzerinde, düşük dozlarda uzun sürede kaspaz aktivitesinin artışı ile gerçekleştiği gösterilmiştir.

İnsan kanserlerinin gelişmesine sebep olan moleküler mekanizmalar konusunda bugün ulaştığımız bilgi düzeyine rağmen kanser, pek çok insanın hayatını elinden alan korkutucu bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu yüzden günümüzde kansere karşı etkili ilaç gelişiminde farklı maddelerin etkinliği konusundaki araştırmalara ilgi artmaktadır.

İleride yapılacak moleküler ve enzimatik çalışmalar ile Felavin'in sadece diğer kanser hücre tipleri üzerindeki öldürücü etkileri değil, aynı zamanda normal hücre tipleri üzerindeki değişik etkilerinin de aydınlatılması mümkün olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; Felavin' in MCF-7 hücre serisi üzerinde kanser önleyici etkisi olduğu düşünülmektedir. Hücre sayısında ciddi azalmaya neden olması sitostatik değil sitotoksik bir madde olduğunun göstergesidir fakat daha düşük dozlarında kronik uygulama ile etkisine bakılarak sitostatik bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmalıdır. Çalışmamız, Felavin'in düşük dozlarında uzun süreli uygulama sonrasında, hücre içindeki apoptotik markerları arttırarak apoptozu indüklemesiyle bize kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ilacın üretiminde ön madde olabileceğini göstermiştir.

İleride yapılacak çalışmalarda, Felavin'in tümör invazyonu ve anjiogenezi üzerine etkilerinin in vivo ve in vitro tümör modelleri kullanılarak, moleküler ve genetik çalışmaların ışığı altında, kanser tedavilerine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics. *A Cancer Journal For Clinicians* **2005**;55:74-108.
2. Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Personel ve Eğitim Şube Müdürlüğü.
(<http://www.bsmgov.tr. duyuru.docs.memekanserierkentani.pdf>, erişim tarihi: 09.05.2006).
3. **Hamzaoglu O, Özcan U.** Türkiye Sağlık İstatistikleri. Ankara: Türk Tabipler Birliği Yayınları, **2006**.
4. American Cancer Society. Cancer Reference Information. How Is Breast Cancer Found?
(<http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI>, erişim tarihi: 04.04.2007).
5. **Baltzell K, Wrench MR.** Strengths and limitations of breast cancer risk assessment. *Oncology Nursing Forum* **2005**;32(3):606-613.
6. **Devita VT.** Principles of chemotherapy. In Devita VT, Hellman S, Rosenberg S, Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: JB Lippincott, **1997**.
7. **O'Prey J, Brown J, Fleming J and Harrison.** Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelia cells. *J. Biochemical Pharmacol.* **2003**; 66(11):2075-88.
8. **Harris JR, Morrow M, Banadonna G.** Cancer of the breast. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Cancer, Principles and Practice of Oncology. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, **1993**; 1264-1332.
9. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts R, Walter P.** Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: *Garland Science*. **2002**; 1313-1362.
10. **Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE.** Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*. **1990**; 50: 7415-7421.
11. **Connor M, Ferguson Smith M.** Essential Medical Genetics. 5th ed. Oxford: *Blackwell Science*, **1997**; 162-176.
12. **Pecorino L.** Molecular biology of cancer, Oxford University Press, **2005**
13. **Demirelli, F.H.** Kanserinin moleküler genetik temelleri, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi. **2003**; 37: 9-15.
14. **Lowitz, B.B, Casciato, D.A.** Medical oncology & principles of cancer biology. Lippincott Williams & Wilkins pres. **2004**.
15. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE.** Molecular Cell Biology. 4.edition: WHFreeman and Co, New York, **2000**.
16. **Björklund M, Taipale M, Varjosalo M, Saharinen J, Lahdenperä J, Taipale J.** Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature*. **2006**; 439: 1009-1013.
17. **Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N.** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. **2003**; 36: 131-149.
18. **Vermeulen K, Berneman ZN, VanBockstaele DR.** Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. **2003**; 36: 165-75.

- 19. Öndağ Cabadak H.** İnsan periferel kan ve fibroblast hücre kültürlerinin sinkronizasyonu ve sinkronize hücre kültürlerinden kromozom analizi ve karyotip hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, **1987**.
- 20. Bellamy Coc.** p53 and apoptosis. *British Medical Bulletin*. **1996**;53(3): 522-38.
- 21. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA.** Cancer: principles and practice of oncology. 5 edition: Lippincott-Raven, Philadelphia, **1997**.
- 22. Foster I.** Cancer: A cell cycle defect. *Radiography journal*. **2008**; 14: 144-9.
- 23. Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ.** p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. **2007**; 450(7170): 721-4
- 24. Kearns WG, Liu JM.** Cell cycle check point genes and aneuploidy. *Current Genomics*. **2001**; 2: 171-80.
- 26. Zong WX, Thompson CB.** Necrotic death as a cell fate? *Genes Development*. **2006**; 20: 1-15.
- 27. Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A.** Molecular biology in reproductive medicine; Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, **1999**; 80-87
- 28. Thompson CB.** Apoptosis. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers, **1999**.
- 29. Wyllie AH, Duvall E.** Cell death. Oxford Textbook of Pathology, vol 1. USA, *Oxford University Press*. **1992**; 142-147.
- 30. Norbury CJ, Hickson ID.** Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2001**; 41:367–401.
- 31. Gewies A.** Introduction to apoptosis. *Cancer research*. **2003**; 1-26.
- 32. Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins **2001**.
- 33. Choen GM.** Caspases, the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*. **1997**; 326: 1-16.
- 34. Lee D, Scott AL, Jerry AL.** Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionally. *Biological Chemistry*. **2000**; 275: 16007-16014.
- 35. Akdaş A, Çevik D.** BPH-Benign Prostat Hiperplazisi. Hekimler Yayın Birliği, Ankara **1996**.
- 36. Ozawa H, Keone RW, Marcilla AE.** Therapeutic strategies targetting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*. **2002**; 177: 306-313.
- 37. Wang KK.** Calpain and caspase can you tell the difference? *Trends Neuroscience* **2000**; 23: 20-26.
- 38. Lilja II.** A kallikrein like serin protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *Clinical Investigation*. **1985**;76: 1889-1892.
- 39. Christensson A, Björk T, Nilsson O.** Serum prostate specific antigen complexed to 1 antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J. Urology*. **1993**; 150: 100-105.
- 40. Gleason DF.** Histologic gradeing of prostate cancer. A perspective. *Human Pathology*. **1992**; 23: 273-279.

41. **Keane RW, Kraydieh S, Lotock G.** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Neuropathology Experimental Neurology*. **2001**; 60: 422-429.
42. **Li M, Ona Vo, Chen M.** Functional role and theropetic implications of neuronal caspase 1 and 3 in a mause model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* **2000**; 99: 333-342.
43. **Chu TM, Kawinski E, Hibi N.** Prostate specific antigen domain of human prostate specific antigen identified with monoclonal antibodies. *J Urology*. **1989**;141:152-156.
44. **Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B.** Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research*. **2010**; 396: 95-100.
45. **Shen MM, Abate-Shen C.** Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Development*. **2010**; 24: 1967-2000.
46. **Ricci JE, Gottlieb RA, Gren DR.** Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biology*. **2003**; 160: 65-75.
47. **Sanmartin C, Plano D, Palop JA.** Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **2008**; 8: 1020-1031.
48. **Ulukaya E.** Apoptozis Ders Notları Ankara, **2003**.
49. **Wei Q, Kazimierz S, Kadiiska M.** Mechanism of arsenic-induced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicit and apoptosis in rat liver epithelial cells. *Toxicological Sciences* **2001**; 63: 189-195.
50. **Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P.** Advances in spinal cord injury: Role of apoptosis. *J. Spine* **2000**; 25: 1859-1866.
51. **Helts SW.** To die or not to die: An overwievof apoptosis and its role in disease. *JAMA* **1998**; 278: 300-307.
52. **Kiess W, Gallaher B.** Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* **1998**; 18: 482-491.
53. World Health Organization. Draft 15-08-06 global program on evidence for health policy (gpe) global burden of disease **2000**.
54. <http://www.cancer.gov/>. Erişim tarihi: 22.11.11
55. **Topuz E. ve ark.** Meme Kanser Biyoloji, Tanı, Evreleme,Tedavi, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları. **1997**; 2: 12-17.
56. **Seidman H, Mushinski M, Gelb S.et al.** Probabilities of eventually developing or dying of cancer united states. 1th edition, **1985**; 35-37.
57. **MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J.et al.** Age at Menarche Probability Of Ovulation and Breast cancer, *International Journal of Cancer*. **1982**; 29: 13-20.
58. **Jennifer A. Harvey.** Use and cost Of Before Imaging for Postmenopausal Women Undergoing Hormone Replacement Therapy, *American Journal Of Radiology*. **1999**; 172: 1615-1619.
59. **Schairer C.et al.** Menapausal Estrojen and Estrojen Progestin Replacement Therapy and Breast Cancer Risk, *JAMA*, **2000**, 283: 485-91.
60. **Cardenosa G, Eklund GW.** Benign Papillary Neoplasms of the Breast: Mammographic Findings, *Radiology*. **1991**; 181:751-55.

61. **Handel E, Reynolds E.** Fixed Facility Workplace Screening Mammography. *American Journal Of Radiology*. **1997**; 168: 507-10.
62. Genetic Screening for Breast Cancer, *New England Medical Journal*. **1997**; 336: 1409-15.
63. **Nancy A.** Fatty and Fibroglandular Tissue Volumes in Breasts of Women 20-83 Years Old. Comparison of X-Ray Mammography and Computer-Assisted MR Imaging. *American Journal of Radiology*. **1997**; 168: 501-6.
64. **Tuncel E.** Klinik Radyoloji Güne & Nobel Tıp Kitapevleri. **1999**; 29-47.
65. **Bray GA.** The underlying basis for obesity relationship to cancer. *Journal of Nutrition*. **2002**; 132: 3451S-3455S.
66. **Murray P.A, Barrett-Lee P, Travers M, Luqmani Y, Powles T, Coombes R.C.** The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. *British of Journal Cancer*. **1993**; 67: 1408-12.
67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13081/figure/A30836/>. Erişim tarihi: 10.11.11
68. **Dickson RB, Lipman ME.** Oncogenes and Suppressor Genes In: Disease of the Breast Ed. Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-NewYork **1996**:221-235.
69. **Gelmann EP.** Oncogenes in human breast Cancer. In: The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA, **1998**: 499-517.
70. **Klijn JGM, Berns PMJJ, Schmits PLM, Foekens JA.** The Clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Reviews*. **1992**; 13: 3-17.
71. **DicksonRB, Lippman ME.** Cancer of the breast. In Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition, Ed: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **1997**: 1541-1557.
72. **Perren TJ.** CerbB2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *British of Journal Cancer*. **1991**; 63: 328-332.
73. **Kurebayashi JJ.** Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Research*. **2001**; 8: 45-51.
74. **Van Der Burg B, De Groot RB, Isbruk L, Kruijer W, DeLaat SWJ.** Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. *J Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **1992**; 43: 111-115.
75. **Von Lintig FC, Dreilinger AD, Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR.** Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research*. **2000**; 62: 51-62.
76. **Sirvent JJ, Fortuno Mar A, Olona M, Orti A.** Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Histology and Histopathology*. **2001**; 16: 99-106.
77. **Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF.** p53 mutation in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science*. **1990**; 250: 1233-1238.

78. **Swift M, Morrell D, Massey R.B and Chase C. L.** Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med.* **1991**; 325(26): 1831-6.
79. **Polyak K. Breast cancer gene discovery.** Erişim: <http://www.expertreviews.org/>. **2002**.
80. **Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D ve ark.** Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q- 12-13. *Science.* **1994**; 30(265)5181: 2088-90.
81. **Lemone P, Burke KM.** Medical Surgical Nursing -Critical Thinking in Client Care. Second ed. Multi Media California. **1996**; 2039-2057.
82. **Carpenter L.C.** Nursing Care of Clients with Breast Disorders. Clinical Management for Continuity of Care- 5. Ed. Black J.M, Jacobs E.M, W.B. Saunders Comopany, London **1998**.
83. **Doizer KJ, Mahon S.M.** Cancer Prevention, Detection and Control, A Nursing Perspective, Oncology Nursing Society Pittsburg, PA, **2002**; 389-444.
84. **Jatoi I.** Manual of Breast Diseases. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. **2002**.
85. **Pizzo PA, Poplack DG.** Principles and Practice of Pediatric Oncology. Third ed. Lippincott & Raven. **1997**; 215-272.
86. **Harris AL.** Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet.* **1997**; 349: 13-15.
87. **Gelmon KA, Eisenhauer EA, Harris AL, ve ark.** Anticancer agents targeting signaling molecules and cancer cell environment: challenges for drug development? *J Nationall Cancer Institute.* **1999**; 91: 1281-1287.
88. **Rusznayk SP, Szent-Gyorgyi A.** Vitamin P: favonols as vitamins. *Nature.* **1936**; 138, 27.
89. **Ross JA, Kasum CM.** Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Efects, and Safety. *Annual Review of Nutrition.* **2002**; 22, 19–34.
90. **Mustafa RA, Hamid AA, Mohamed S, Bakar FA.** Total phenolic compounds, favonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *J Food Science.* **2010**; 75 (1): 28-35.
91. **Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J.** Antioxidant activity of natural favonoids is governed by number and location of their aromatic hydoxyl groups. *Chemistry Physics of Lipids.* **1996**; 79: 157-163.
92. **Serafni M, Villano D, Spera G, Pellegrini N.** Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr Cancer.* **2006**; 56 (2): 232-240.
93. **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J Nutritional Biochemistry.* **2002**; 13: 572–584.
94. **Erlund I.** Review of the favonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.* **2004**; 24, 851–874.
95. **Halliwel B, Gutteridge J. M. C.** In Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press: Oxford, **1998**.
96. **Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine.* **1994**; 16: 845-850.
97. **Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G.** A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine.* **1994**; 16: 547-553.

98. **Morris C. J, Earl J. R, Trenam C. W, Blake D. R.** *J Biochemistry & Cell Biology*. **1995**; 27: 109-122.
99. **Bors W, Heller W, Michel C, Saran M.** Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzimology*. **1990**; 186: 343-355.
100. Ankara Üniversitesi Eczalık Fakültesi Yayınları, ders kitapları **1998**, 78.
101. **Lam LKT, Zhang J, ve Hasegawa S.** Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis. *J Food Technology*. **1994**; 48: 104-109.
102. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Phellodendron+lavallei>. Erişim tarihi: 12.10.11
103. **Shiao P. G.** Photocatalogue of Chinese Traditional Medicine. Taiwan Business Publication Company, Taipei, Taiwan, **1990**; 10: 86.
104. **Hsu K.J.** “Chinese Traditional Medicine,” Chinese Pharmaceutical Science and Technology Publication Company, Beijing, China, **1996**; 802.
105. **Gray A.I, Bhandari P, Waterman PG.** New protolimonoids from the fruits of *Phellodendron chinense*. *Phytochemistry*. **1988**; 27: 1805-1808
106. **Chiu CY, Li CY, Chiu CC, Niwa M, Kitanaka S, Damu AG, Lee EJ, Wu TS.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **2005**; 53: 1118-112.
107. **Mori H, Fuchigami M, Inoue N, Nagai H, Koda A, Nishioka I.** Principle of the Bark of *Phellodendron amurense* to Suppress the Cellular Immune Response. *Planta Medica*. **1994**; 60: 445-449.
108. **Park SD, Lai YS, Kim CH.** Immunopotentiating and antitumor activities of the purified polysaccharides from *Phellodendron chinense* SCHNEID. *Life sciences*. **2004**; 75: 2621-2632
109. **Yu HH, Kim KJ, Cha JD, Kim KH, Lee YE, Choi NY, and You YO.** Antimicrobial Activity of Berberine Alone and in Combination with Ampicillin or Oxacillin Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food*. **2005**; 8(4): 454-461.
110. **Hattori T, Yamada S, Furuta K.** Studies on the antinephritis effects of plant components(6) : antinephritic effects and mechanisms of phellodendrine (OB-5) on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats. *Folia Pharmacologica. Japon* **1992**; 99: 391-399.
111. **Min YD, Kwo HC, Yang MC, Lee KH, Choi SU, Lee KR.** Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Archives of Pharmacol Research*. **2007**;30: 58-63.
112. **Niklas KJ.** The mechanical role of bark *American Journal of Botany*. Flora of China**1999**; 86: 465-469
113. **Kim SJ, Kim YY, Ko KH, Hong EY, Han YB, Kang BH, ve ark.** Butanol extract of 1: 1 mixture of *Phellodendron* cortex and *Aralia* Cortex stimulates PI₃-kinase and ERK2 with increase of Glycogen Levels in Hen g2 cells. *Phytotherapy Research*. **1998**;12: 255-60.
114. **Atkimockin NG.** [in Russian]: Trials with *Phellodendron* spp. at the Forest- Steppe experiment Station [abstract]. Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada [Moskva]. **1960**; 37: 30-33.
115. **Dirr MA.** Manual of woody landscape plants: their identification, oramental characteristics, culture, propagation, and uses. *Champaign, IL: Stipes Publishing* **1990**.

- 116. Punitha IS, Shirwaikar A.** Antidiabetic activity of benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine in streptozotocin-nicotinamide induced type2 diabetic rats. *Diabetologia Croftica* **2005**;34: 117-27.
- 117. Ko BS, Choi SB, Park SK, Jang JS, Kim YE, Park S.** Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cortidis rhizoma*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **2005**;28: 1431-7.
- 118. Leng SH, Lu FE, Xu LJ.** Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacologica Sinica*. **2004**;25: 496-502.
- 119. Kim HJ, Kong MK, Kim YC.** Beneficial effects of Phellodendri Cortex extract on hyperglycemia and diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *BMB Reports*. **2008**;41: 710-5.
- 120. Barnaulov OD, Manicheva OA, Shelyuto VL, Konopleva MM, Glyzin VI.** Effect of flavonoids on development of experimental gastric dystrophies in mice. *Khim Farm Zh*. **1985**;18: 935-941.
- 121. Özçimen A.** Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) hücre hattında, apoptoz ve farklılaşma üzerindeki etkisi. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı, Ankara **2005**.
- 122. Tiftik RN.** Sıçan koroner mikrovasküler endotel hücre kültüründe Rho/Rho-kinaz yolağı ve nitrik oksid ilişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin, **2005**.
- 123. www.mcf7.com.** Erişim tarihi: 29.10.11
- 124. CABADAK H.** Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* **2008**; 9(3) : 51 - 61
- 125. Kumar AP, Garcia GE, and Slaga TJ.** 2-Methoxyestradiol blocks cell-cycle progression at G(2)/M phase and inhibits growth of human prostate cancer cells. *Mol Carcinog*. **2001**; 31: 111 – 124.
- 126. Kumar AP, Garcia GE, Ghosh R, Rajnarayanan RV, Alworth WL, and Slaga TJ.** 4-Hydroxy -3-methoxybenzoic acid methyl ester: a curcumin derivative targets Akt/NF kappa B cell survival signaling pathway: potential for prostate cancer management. *Neoplasia*. **2003**; 5: 255 – 266.
- 127. Wei W, Yuangang Z, Yujie F, Jürgen R, Ulrike S, Silke N, Yuhong Z.** In vitro Antioxidant, Antimicrobial and 5 Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Phellodendron amurense Rupr. from China. *The American Journal of Chinese Medicine*. **2009**; 37: 1–9
- 128. Singh T, Vaid M, Katiyar N, Sharma S, Katiyar SK.** Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase -2, prostaglandin E and prostaglandin E receptors. *Carcinogenesis*. **2011**;32(1):86–92.
- 129. Li-Weber M.** Targeting apoptosis pathways in cancer by Chinese medicine. *Cancer Lett*. August 2, **2010**.
- 130. Tsang CM, Lau EP, Di K, et al.** Berberine inhibits Rho GTPases and cell migration at low doses but induces G2 arrest and apoptosis at high doses in human cancer cells. *J Molecular Medicine*. **2009**;24(1):131–138.
- 131. Zhang X, Gu L, Li J ve ark.** Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells. *Cancer Research*. **2010**;70(23):9895–9904.
- 132. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K.** Many cuts toruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death & Differentiation*. **2003**; 10:76–100.

- 133. Porter AG, Janicke RU.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. **1999**; 6:99–104.
- 134. Sean Tracy, Toru Mukohara, Mark Hansen ve ark.** Gefitinib induces apoptosis in the EGFR^{L858R} non- small cell lung cancer cell line H32255. *Cancer research*. **2004**;64:7241-7244.
- 135. Hyo WJ, Guang ZJ, Sung YK, Yeong SK, Yong KP.** Neuroprotective effect of methanol extract of Phellodendri Cortex against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis in PC-12 cells. *Cell biology international*. **2009**; 33: 957-963.
- 136. Reiner U. Janicke, Michael L. Sprengart, Mas R. Wati, and Alan G. Porter.** Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J Biological chemistry*. **1998**; Vol. 273, No. 16: 9357–9360.
- 137. Aso K, Kanno S, Tadano T, Satoh S, Ishikawa M.** Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **2004**; 27: 727-30
- 138. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Nejat T.** Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)’de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi* **2006**; 45(2): 83–92.