

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÖKNAR ÖZÜTLERİNİN MDA-MB-231 HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİ**

Zeynep TUNCEL

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU
Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU
Dr. Öğr. Üyesi Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Zeynep TUNCEL tarafından hazırlanan "Gökmar Özütlerinin MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU Bartın Üniversitesi	

02/07/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza
Zeynep TUNCEL



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKNAR ÖZÜTLERİNİN MDA-MB-231 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİSİ

Zeynep TUNCEL
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanserdir. Moleküler biyoloji ve farmakolojideki gelişmeler, meme kanserinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, kanseri hedef alan ve daha akıllı terapötiklerin tasarımını mümkün kılmıştır. Ülkemiz için endemik bir tür olan *Abies nordmanniana* subsp. *Bornmulleriana* (Uludağ göknarı), Batı Karadeniz Bölgesinde, Kızılırmak ile Uludağ arasında bulunmaktadır. Birinci sınıf orman ağacı olup, 30-40 m boya sahiptir. Bu çalışmanın amacı göknarın biyolojik aktivitelerini değerlendirmektir. Göknar öz ve diri özütleri anti-kanser özellik açısından test edilmiştir. MTT hücre canlılığı testinde, öz ve diri özütlerinin MDA-MB-231 üçlü negative meme kanseri hücre hattına karşı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak artan sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur. Göknar öz ve diri özütleri MDA-MB-231 hücrelerinde *Bax/Bcl-2* apoptotik gen ifadelerini değiştirerek apoptozun uyarılmasını sağlamıştır. Bu bulgular, göknar özütlerinin yeni kanser önleyici ilaçların geliştirilmesinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Göknar, MDA-MB-231, apoptoz

2019, 28 sayfa

Bilim Kodu: 203

ABSTRACT

MSc. Thesis

THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF FIR EXTRACTS ON MDA-MB-231 CELLS

Zeynep TUNCEL
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Aslı UĞURLU

Breast cancer is the most common cancer among women. Advances in molecular biology and pharmacology have enabled a better understanding of breast cancer and providing the design of smater cancer-targeting therapeutics. *Abies nordmanniana* subsp. *Bornmulleriana* (Uludag fir) is located in the Western Black Sea Region, between Kizilirmak and Uludag. It is a first class forest tree and has 30-40 m height. The aim of this study is to evaluate the biological activities of fir extracts. Heartwood and sapwood extracts were tested for their anti-cancer properties. According to the MTT cell viability analysis, heartwood and sapwood extracts demonstrate cytotoxicity on triple-negative MDA_MB_231 breast cancer cells in a time and dose dependent manner. Both heartwood and sapwood extract treatments have increased *Bax/Bcl-2* apoptotic gene expression ratio and stimulated apoptosis.

Key Words: Fir, MDA-MB-231, apoptosis

2019, 28 pages

Science Code: 203

TEŞEKKÜR

Eđitimimde ve tezimin gerçekleŐmesinde desteklerinden dolayı Biyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Doç. Dr. Talip ETER'e, tez çalıŐmam sÜresince destek olan danıŐmanım Dr. Öğr. Üyesi Aslı UğURLU'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum bÜtÜN arkadaşlarıma, tez çalıŐmam boyunca bana inanan ve maddi manevi desteklerini esirgemedен yanımda olan canım annem Vahide TUNCEL, babam Rıza TUNCEL, abim Ahmet TUNCEL'e sonsuz sevgi ve teŐekkürlerimi sunarım.

Zeynep TUNCEL
Kastamonu, Mayıs, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kanser Tedavisi.....	2
1.3. Meme Kanseri.....	3
1.4. Apoptoz.....	4
1.4.1. Dışsal Hücre Ölüm Reseptörü Yolağı.....	5
1.4.2. İçsel Mitokondriyal Yolak.....	5
1.5. Apoptoz ve Kanser.....	6
1.6. Bitki Özütlerinin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	7
2. KURAMSAL ÇERÇEVE.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Hücre Kültürü.....	11
3.2. Bitki Özütlerinin Hazırlanışı.....	12
3.3. MTT Analizi.....	12
3.4. RNA İzolasyonu.....	13
3.5. cDNA Sentezi ve qPZR Analizi.....	13
3.6. İstatistiksel Analiz.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. Hücre Morfolojisi ve Sitotoksik Etki.....	15
4.2. Apoptotik Etki.....	19
5. TARTIŞMA.....	22
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	24
KAYNAKLAR.....	25
ÖZGEÇMİŞ.....	28

KISALTMALAR VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler
°C

Santigrad

Kısaltmalar

cDNA

Komplementer DNA

cm

Santimetre

CO₂

Karbondioksit

Ct

Döngü Eşiği

DMEM

Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO

Dimetil Sülfoksit

DNA

Deoksiribonükleik Asit

EDTA

Etilendiamintetraasetik Asit

FBS

Fetal Sığır Serumu

g

g-kuvveti

GAPDH

Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrojenaz

HCl

Hidroklorik Asit

mg

Miligram

ml

Mililitre

mM

Milimolar

NaCl

Sodyum Klorür

PBS

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

qPZR

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA

Ribonükleik Asit

SDS

Sodyum Dodesil Sülfat

µg

Mikrogram

µl

Mikrolitre

µM

Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Kanser Oluşumuna Yol Açan Mekanizmalar	2
Şekil 1.2. Meme Kanseri Oluşumu	4
Şekil 1.3. Apoptoz Yolakları.....	6
Şekil 1.4. Apoptozdan Kaçış Mekanizmaları.....	7
Şekil 2.1. <i>Abies nordmanniana subspecies bornmulleriana</i>	10
Şekil 3.1. MTT analizi sonunda çözünmüş formazan kristalleri	12
Şekil 4.1. Öz Özüdü ile 24 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	15
Şekil 4.2. Diri Özüdü ile 24 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	16
Şekil 4.3. MTT Analizi Sonuçları-24 Saat.....	16
Şekil 4.4. Öz Özüdü ile 48 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	17
Şekil 4.5. Diri Özüdü ile 48 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	17
Şekil 4.6. MTT Analizi Sonuçları-48 Saat.....	18
Şekil 4.7. Öz Özüdü ile 72 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	18
Şekil 4.8. Diri Özüdü ile 72 Saat Muamele Sonrası Hücre Morfolojisi	19
Şekil 4.9. MTT Analizi Sonuçları-72 Saat.....	19
Şekil 4.10. IC ₅₀ Değerleri.....	20
Şekil 4.11. Apoptotik Gen İfadeleri	21

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	11
Tablo 3.2. qPZR Deneylerinde Kullanılan Primerler.....	13
Tablo 3.3. Kullanılan Cihazlar	14

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Normal hücrelerin genomunda meydana gelen mutasyonlar kanser hücresine dönüşümüne sebep olmaktadır. Genomda meydana gelen bu hasar, DNA replikasyonundaki hatalar, bazı DNA bazlarının kimyasal kararsızlığı veya metabolizma sırasında ortaya çıkan serbest radikallerin saldırısı gibi endojen mekanizmaların sonucu olabilir. DNA hasarı ayrıca iyonlaştırıcı radyasyon, UV radyasyonu ve kimyasal kanserojenler gibi dışsal ajanlarla etkileşimlerden de kaynaklanabilir. Hücreler, bu hasarı onarmak için çeşitli yöntemler geliştirse de, hataların tamir edilemediği durumlarda genomda mutasyonlar kalıcı değişimlere sebep olmaktadır (Bertam, 2001).

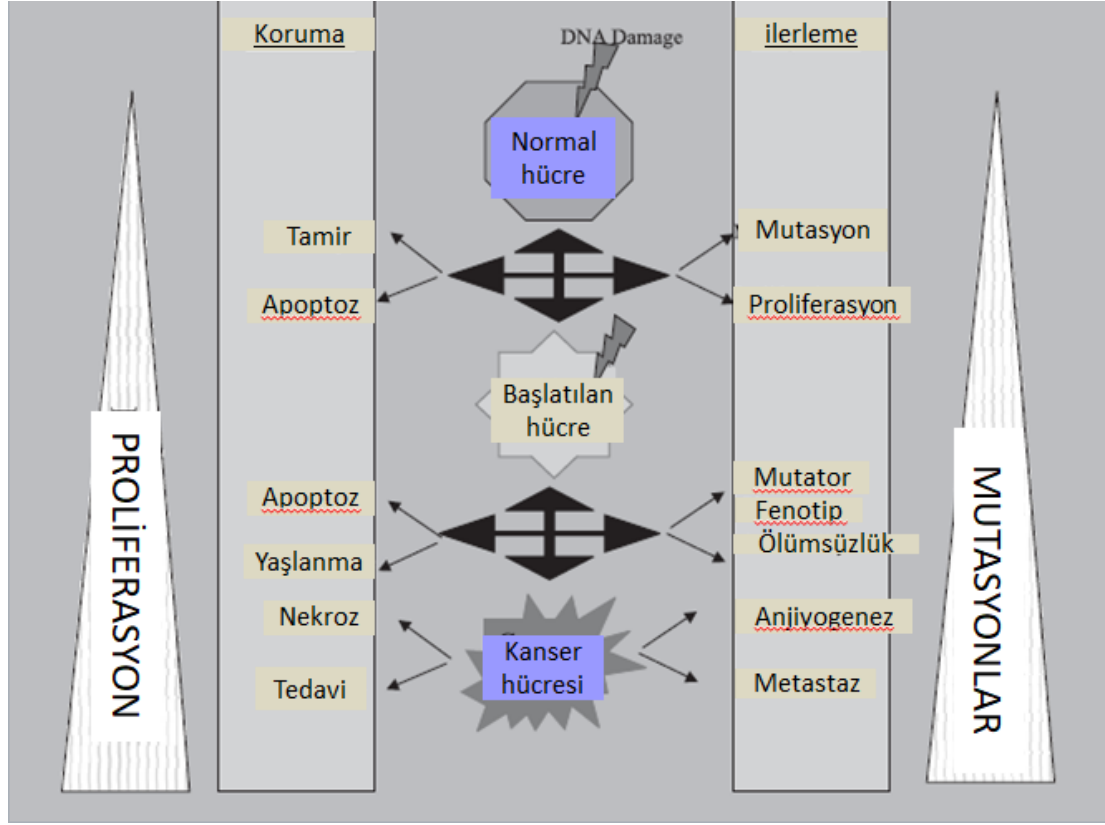
Yetişkin insan, dokuları çoğaltmak için bölmesi ve farklılaştırması gereken yaklaşık 10^{15} hücreden oluşur. Hücre bölünmesi ve proliferasyonu mutasyonların oluşumunda ve bu mutasyonları taşıyan hücrelerin klonlarının genişlemesinde önemli bir faktördür. Bu klonal genişleme süreci çoklu mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır (Klein, 2000). Kanser artan büyüme hızı, komşu normal dokuları istila etme ve metastaz yapma kabiliyetinin kazanılması ve kemoterapötik ajanların uygulanmasından sonra ilaca dirençli hale gelmesi ile karakterize edilmektedir.

Bir kanser hücresinin oluşumunda beş ana yol etkinleştirilmeli veya etkisizleştirilmelidir (Şekil 1.1.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).

- Büyüme uyarıcı sinyallerin artışı;
- Büyüme engelleyici sinyallere karşı direnç;
- Programlanmış hücre ölümüne, yani apoptoza karşı direnç;
- Yaşlanmanın engellenmesi;
- Yeni kan damarları ve kılcal damarlar oluşturma kapasitesi.

Kanser vakaları son yıllarda artmakta ve kanser hastalarının fiziksel aktivitelerini, ve sosyal hayatlarını da etkilemektedir. Kanserın görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde yüzde beşin altında değişmektedir. Dünyada yedi milyondan fazla insanın kanserden

öldüğü tahmin edilmektedir. 2020 yılına kadar bu oranın yüzde yetmiş oranında artacağı öngörülmektedir.



Şekil 1.1. Kanser oluşumuna yol açan mekanizmalar (Bertram, 2001)

1.2. Kanser Tedavisi

Kanser, dünya çapında en yaygın ölüm nedenlerinden biridir (McGuire, 2016). Kemoterapi ve radyoterapi, kanser tedavisi için en etkili ve kapsamlı yaklaşımlardır. Kemoterapi ve radyoterapiye bağlı olarak oral mukozit, gastrointestinal toksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, hematopoetik sistem hasarı, kardiyotoksisite ve nörotoksisite dahil olmak üzere ortaya çıkan olumsuz etkiler bu yöntemlerin klinikte kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu olumsuz etkiler genellikle kanser hastalarında yaşam kalitesini azaltır ve tedavinin sonlandırılmasına yol açabilir (Shapiro, 2016). Bu nedenle, kemoterapi ve radyoterapinin neden olduğu yan etkilere karşı etkili yönetim stratejileri geliştirmek önemlidir.

Ham özütler, biyoaktif bileşenlerle zenginleştirilmiş fraksiyonlar ve bitkilerden elde edilen saf bileşikler içeren doğal ürünler, kanserleri önlemekte ve tedavi etmektedir (Sanders vd., 2016). Klinik çalışmalar ve prelinik çalışmalar bazı doğal ürünlerin kemoterapi ve radyoterapiye bağlı olumsuz yan etkileri azaltabileceğini göstermektedir (Zhang vd., 2018).

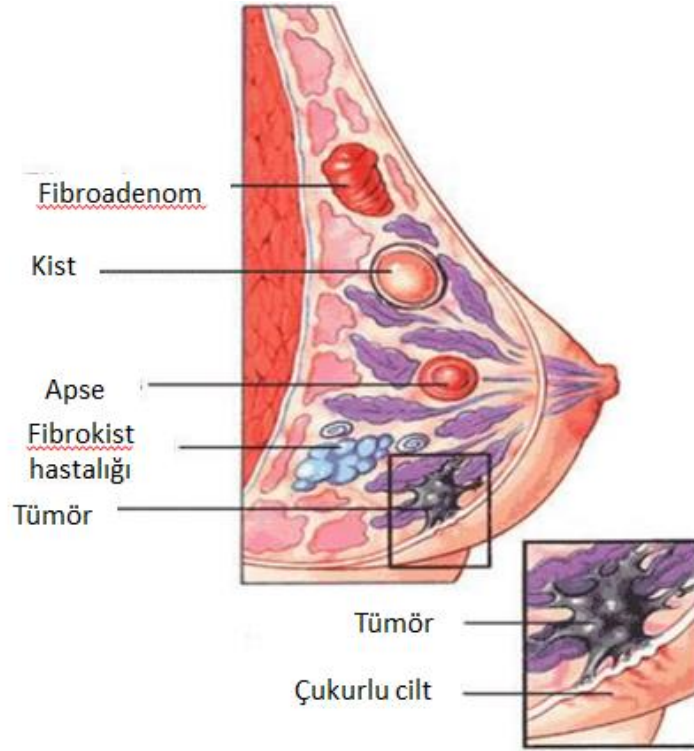
1.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, en yaygın kanser türü ve kanser ilişkili ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konması ile birlikte kadınlarda en sık görülen kanser çeşididir. Meme kanseri, süt bezleri, lobüller ve süt kanallarından ortaya çıkmaktadır (Şekil 1.2.). Meme kanseri için en önemli risk faktörleri, yaş, hormon düzeyleri ve iyot yetersizliği olarak gösterilmektedir.

Meme kanserleri moleküler karakterizasyonlara göre luminal A, luminal B, HER2 aşırı ifadesi, bazal ve normal benzeri tümörler olarak beş alt tipte sınıflandırılmaktadır (Dai vd., 2015). Luminal benzeri tümörlerde, hormon reseptörleri (östrojen reseptörü ER ve progesteron reseptörü PR) ifadesi vardır ve ekspresyon profilleri, memenin luminal epitel bileşenine benzemektedir. Luminal A benzeri tümörler ER veya PR pozitifliği ve HER2 (insan epidermal büyüme faktörü) negatifliği olan tümörlerken, Luminal B tipi tümörler ER veya PR pozitifliği ve HER2 pozitifliği olan tümörlerdir. HER2 aşırı ifadesi olan tümörlerde hormon reseptörleri ifadesi yoktur (ER-, PR-). Bazal alt tip, vücudun diğer bölümlerinin bazal epitel hücrelerine ve normal meme epitel hücrelerine benzer ekspresyon profillinde (ER-, PR-, HER2- üçlü negatif) tümörlerden oluşmaktadır.

Meme kanseri için başlıca tedavi türleri cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, endokrin (hormon) tedavisi ve hedefe yönelik tedavidir. Göğüs koruma cerrahisi, lokalize meme kanseri tedavisinde genellikle başvurulan yaklaşımdır. Cerrahiye genellikle tam iyileşmeyi sağlamak ve metastaz riskini en aza indirmek için yardımcı adjuvan tedaviler izler. Ameliyat sırasında görülmeyen kanser hücreleri, kanserin yerel nüks riskini azaltmak için radyasyonla öldürülebilir. Radyasyon tedavisi, kanser

hücrelerinin doğrudan yüksek düzeyde radyasyona maruz kaldığı bir süreçtir. Endokrin tedavi hormonları dengelemek veya engellemek için uygulanmaktadır. ER- pozitif hastalarda genellikle belirtilmiştir. Kemoterapi uygulaması ile ER-negatif tümörlerde daha etkin sonuçlar vermektedir. Triple Negatif Meme Kanseri (TNBC), HER2 pozitif meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda ve yüksek riskli lümen tümörlerinde kemoterapi önerilmektedir. Günümüzde uygulanan çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen, meme kanserinin heterojen yapısı tedaviyi zorlaştırmakta, kanser tekrarı metastaz ve ilaç direnci görülebilmektedir (Cazzaniga ve Bonanni, 2012).



Şekil 1.2. Meme kanseri oluşumu (URL-1,2014)

1.4. Apoptoz

Apoptoz, Kerr, Wyllie ve Currie (1972) tarafından 1972’de tanımlanmış ve o günden itibaren biyolojik çalışmalarda en çok araştırılan süreçlerden biri olmuştur (Kerr, vd., 1972). Çok seçici bir süreç olan apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda önemlidir. Apoptoz mekanizmalarını anlamak çok önemlidir ve düzensiz apoptoz çeşitli patogenezlere yol açmaktadır. Bu da, belirli apoptotik genleri veya yolları

hedef alan ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Kaspazlar başlatıcılar ve uygulayıcılar olmak üzere apoptoz mekanizmasının merkezindedir (Goldar vd., 2015). Kaspazların aktive edilebileceği üç apoptoz yolağı vardır. En yaygın olarak bilinen apoptozun içsel (veya mitokondrial) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yolaklarıdır (Şekil 1.3.). Daha az bilinen bir üçüncü yolak ise, içsel endoplazmik retikulum yolağıdır.

1.4.1. Dışsal Ölüm Reseptörü Yolağı

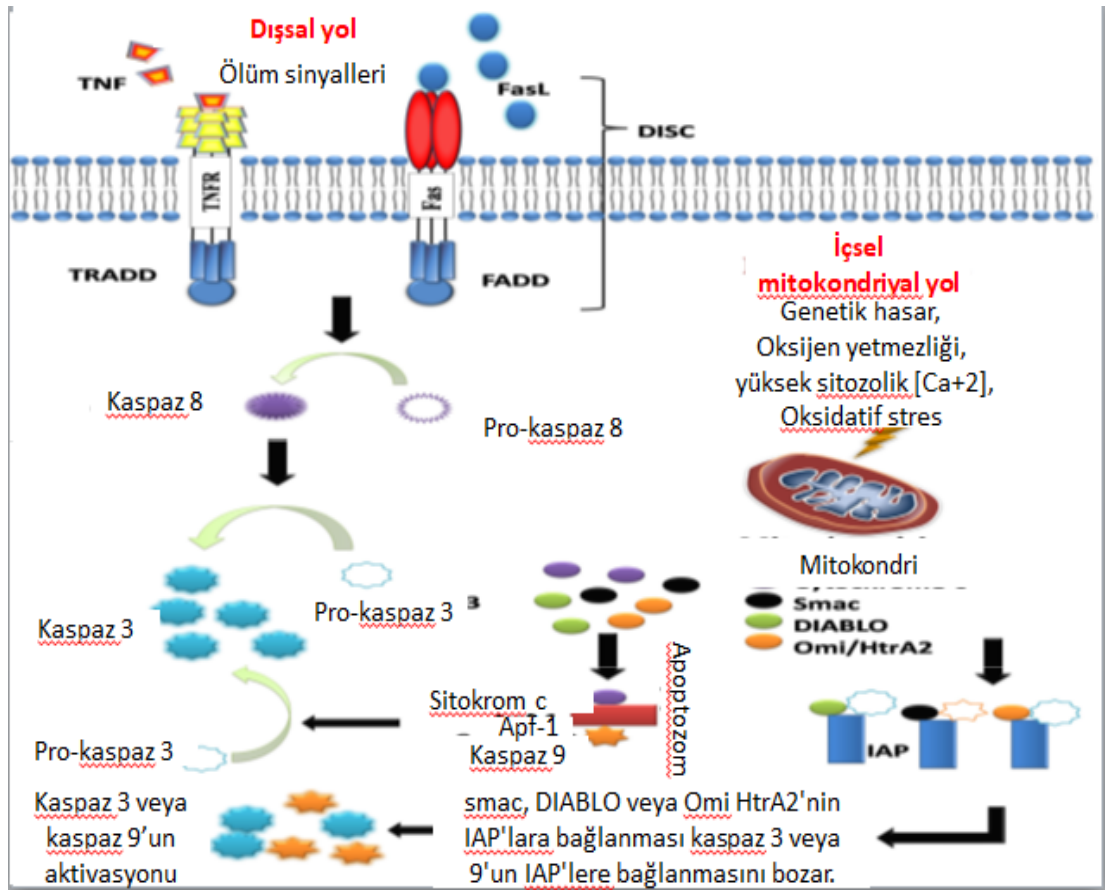
Dışsal ölüm reseptörü yolağı, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlamaktadır. TNF ve FasL en yaygın olarak bilinen ölüm ligandlarıdır ve sırasıyla Tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas reseptörlerine bağlanarak dışsal ölüm reseptörü yolağını aktifleştirmektedirler. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanıp adaptör protein ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturmaktadır. DISC daha sonra pro-kaspaz 8'in aktivasyonunu sağlamaktadır (Fulda ve Debatin, 2006). Kaspaz 8 enziminin aktif hali diğer uygulayıcı kaspazların parçalanmasıyla apoptozu başlatmaktadır.

1.4.2. İçsel Mitokondriyal Yolak

DNA hasarı, oksijen eksikliği, oksidatif stres gibi içsel uyarılar, iç mitokondriyal yolağın başlatılmasını tetiklemektedir. Uyarılara bakılmaksızın, bu yol, mitokondriyal geçirgenliğin artması ve sitokrom-c gibi proapoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının sonucudur. Bu yol, Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından düzenlenmektedir. Bcl-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır: pro-apoptotik proteinler (örneğin, *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bcl-xS*, *Bik*, *Bim* ve *Hrk*) ve anti-apoptotik proteinler (örneğin, *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Bfl-1* ve *Mcl-1*). Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını engelleyerek apoptozu düzenlerken, proapoptotik proteinler, bu salınımı teşvik ederek etki etmektedir (Chipuk ve Green, 2008). Apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını belirleyen pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir. Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı, sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive etmektedir.

1.5. Apoptoz ve Kanser

Kanser, normal bir hücrenin malign bir hücreye dönüştüğü bir genetik değişimin sonucu olarak görülebilirken, hücre ölümü kaçışı bir hücrede bu kötü huylu dönüşüme neden olan temel değişikliklerden biridir. 1970'lerin başlarında, Kerr, Wyllie ve Currie (1972) apoptozu potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin, hiperplazi ve tümör ilerlemesinin ortadan kaldırılmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Dolayısıyla, azalmış

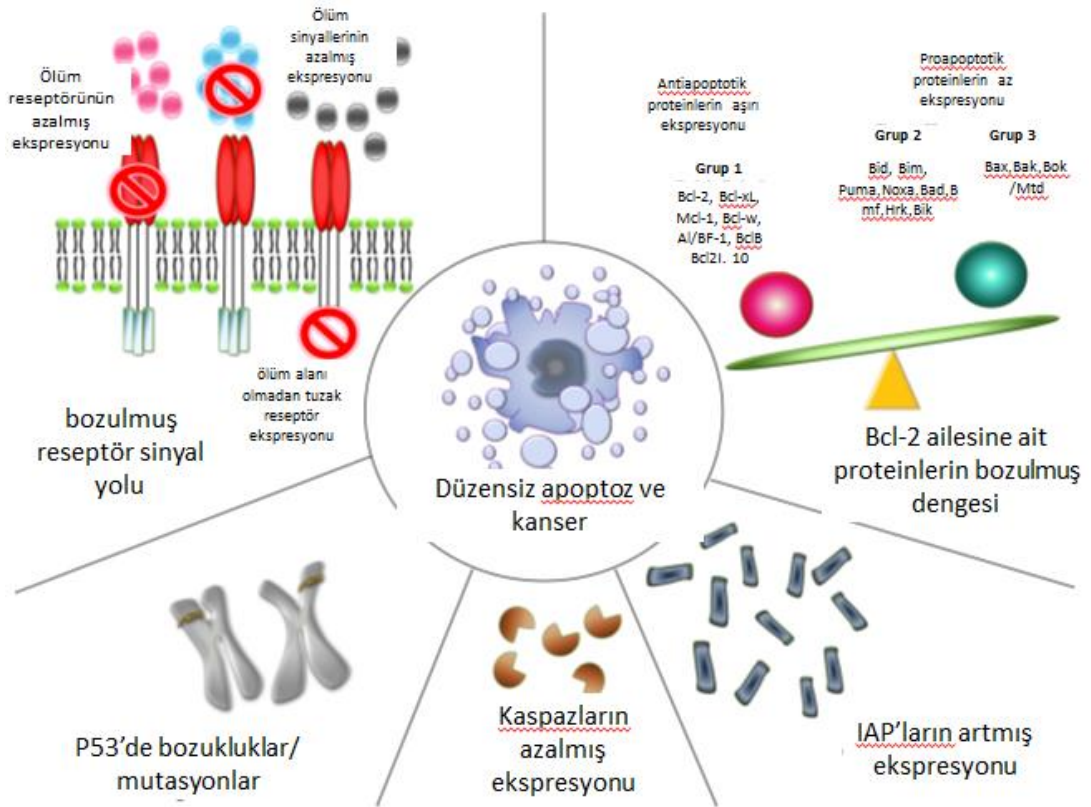


Şekil 1.3. Apoptoz yolları (Wong, 2011)

apoptoz veya direnci karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Malign bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma sağlayabileceği birçok yol vardır. p53 mutasyonları, pro-apoptotik protein seviyesinin azalması, anti-apoptotik proteinlerin

artması, ölüm reseptörü ifadesinin azalması, kaspaz aktivitesinin azalması apoptoz mekanizmasında bozukluklara yol açarak kanser hücrelerinin ölümden kaçmasını sağlayan mekanizmalar arasındadır (Şekil 1.4.) (Wong, 2011).

Birçok araştırmacı, hedef kanser hücrelerde apoptozu arttırmak için moleküler ve kimyasal ajanlar geliştirmektedir. Seçici olarak mitokondriyi hedef alan ilaçlar geliştirilmektedir. *Bax*'ın tümör hücrelerinde aşırı ifadesinin, kemoterapi duyarlılığını arttırdığı ve fare modellerinde tümör büyüme oranlarının azaldığı gösterilmiştir. Bir aday ilaç olan HA14-1, insan akut miyeloid lösemi (HL-60) hücrelerinde apoptozu uyarmıştır (Lickliter vd., 2003).



Şekil 1.4. Apoptozdan kaçış mekanizmaları (Wong, 2011)

1.6. Bitki Özütlerinin Kanser Tedavisinde Kullanımı

En ölümcül hastalık türlerinden biri olan kanser, düzensiz hücre popülasyonu genişlemesini içeren geniş bir sendrom grubunu kapsar. Taksol, kamptotesin, combrestatin, epipodofilotoksin liganlar ve vinka alkaloidleri gibi bitki kaynaklı

bileşikler kanser tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu bileşikler, 1997'den önce piyasaya sürülmüş olup, hala kanser tedavisinin temel bir parçasıdır. Ek olarak, bazı diyet bileşenlerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak anti-kanser etkileri bildirilmiştir. Doğal ürünlerin çeşitliliği nedeniyle, kanser karşıtı mekanizmalar farklı bileşenlerde belirgindir. Örneğin, curcumin, sülforafan, soya izoflavon ve resveratrol gibi bazı diyet bileşikleri, kanser kök hücrelerinin kendini yenileme yollarını etkileyebilir. Bazı çalışmalar ayrıca bitkilerden elde edilen metabolitlerin proapoptotik özelliklere sahip olabileceğini rapor etmiştir. Bu tür çalışmalar kemoterapötik ajanların hem dış hem de iç apoptotik yolların aktivasyonu ile hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Çeşitli tümör tipleri üzerinde test edilen bitki kaynaklı bileşikler, daha ileri kanser tedavisi için stratejiler sağlayabilir (Ouyang vd., 2014).

2. KURAMSAL ÇERÇEVE

Dünyadaki ölümlerin ana nedenlerinden biri olan kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu ortaya çıkan ve diğer dokulara yayılma potansiyeli olan bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2015 yılında 8,8 milyon kansere bağlı ölüm bildirilmiştir ve yeni kanser vakalarının gelecek 20 yılda % 70 artacağı tahmin edilmektedir. Tedavide kullanılan kemoterapi ve radyoterapinin hastanın yaşam kalitesini büyük ölçüde azaltan yan etkileri vardır. Bitki kaynaklı doğal bileşenler kanser tedavisinde tümör büyümesini engellemekte, kemoterapi ve radyoterapinin yan etkilerini hafifletebilmekte ve kanser hastalarının ömrünü uzatabilmekte rol oynamaktadır (Ouyang vd., 2014).

Pinaceae familyasına ait *Abies* cinsi, Asya, Avrupa, Kuzey ve Orta Amerika ve Kuzey Afrika dağlarında bulunan 50 farklı tür içermektedir. *Abies* türleri, terpenoidler, flavonoidler, liganlar, fenoller, steroidler, yağ asitleri ve yağ alkolleri gibi çeşitli fitokimyasallar içerir (Yang vd., 2008). *Abies* özütlerinin, anti-bakteriyel (Richardson vd., 1992; Bağci ve Diğrak, 1996; Dığrak, vd., 1999), anti-fungal (Aoyama, 1992), anti- inflamatuvar, anti-hipertansif (Singh vd., 1998), anti-depresan ve anksiyolitik faaliyetler (Singh vd., 1998; Kumar vd., 2000) olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır. Birçok çalışmada da *Abies* türlerinin anti-kanser aktivitesi olduğu rapor edilmiştir. *Abies alba* ve *Viscum album* özütleri karışımının L-1210 fare lösemi hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu ve tedavi edilen sıçanlarda tümör büyümesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Stefanou ve Evangelou, 2000). *Abies koreana*'dan izole edilen bir triterpenoid bileşik, insan akciğer karsinomu (A549), yumurtalık karsinoması (SK-OV-3), malign melanom (SK-MEL-2) ve kolon karsinomu (HCT-15) hücre hatları üzerinde sitotoksik etki göstermiştir (Kim vd., 2001). *Abies marocana*'dan izole edilen bileşikler için P-388, A-549, HT-29 ve MEL-28 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite rapor edilmiştir (Barrero vd., 1996). Literatürde *Abies nordmanniana* subspecies *bornmulleriana* biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi eksikliği tespit edilmiştir (Tumen vd., 2011) (Şekil 2.1.). Bu çalışmada amacımız, servikal kanser ve karaciğer kanseri hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki gördüğümüz *Abies nordmanniana*

subspecies *bornmulleriana* öz ve diri özütlerinin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser aktivitesini değerlendirmektedir.



Şekil 2.1. *Abies nordmanniana* subsp. *bornmulleriana* (Savill vd., 2016)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 meme kanser hücresi hattı, Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü tarafından hediye edilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri nemli ortamda, %5 CO₂ inkübatöründe 37°C'de büyütülmüştür. Hücreler % 90 yoğunluğa ulaştığında PBS ile yıkandıktan sonra 37°C'de 5 dakika boyunca % 0.25 tripsin-EDTA çözeltisi ile inkübe edilip kazınmıştır. Hücreler, 500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüş, taze besi yeri ile çözülerek üç petriye bölünmüştür. Hücre stoklama işlemi için hücreler dondurucu solüsyon içerisinde çözünerek -80°C'de saklanmıştır. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

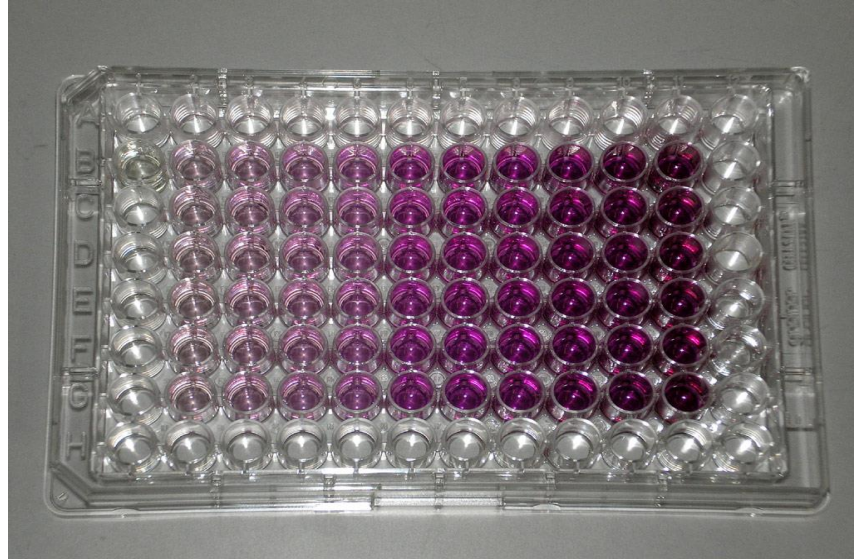
MDA-MB-231 Besi Yeri	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) % 10 FBS 0.01 mg/ml İnsan İnsülini % 1 Esansiyel Olmayan Amino Asit % 0.1 Penisilin/Streptomisin
MDA-MB-231 Dondurucu Solüsyon	% 50 DMEM % 40 FBS % 10 Dimetil Sülfoksit (DMSO)
10X Tripsin-EDTA	2.5% Tripsin 7mM Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) 0.9% NaCl

3.2. Bitki Özütlerinin Hazırlanışı

Gökmar öz ve diri özütleri % 0.1 DMSO içerisinde çözüldükten sonra filtrelenerek sterilize edilmiştir. Özütler, hücre kültürü ve gen ifadesi çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.3. MTT Analizi

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla MTT analizi yapılmıştır. 104 MDA-MB-231 hücresi 96 kuyucuklu petrilere ekilip 24 saat boyunca büyümeye bırakılmıştır. Hücreler gökmar özütlerinin farklı konsantrasyonlarıyla (0.1, 1, 10, 100, 1000 µg/ml) 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilmiştir. Sonrasında besiyeri % 0.5 FBS, 0.5 mg/ml MTT içeren DMEM'le değiştirilmiş ve 4 saat 37°C'de inkübasyon yapılmıştır (Şekil 3.1.). Elde edilen formazan kristalleri, %3 SDS ve 40 mM HCl/izopropanol ile çözülmüş mikropilaka spektrofotometresi (Multiskan Go, Thermo Scientific) kullanılarak 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Yarı maksimal inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri, GraphPad Prism 7 programı ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. MTT analizi sonunda çözülmüş formazan kristalleri

3.4. RNA İzolasyonu

2x10⁶ MDA_MB-231 hücresi petri kaplarına ekilip büyütüldükten sonra IC50 değerlerinin dozlarında göknar öz ve diri özütleriyle muamele edilmiştir. Total RNA, GeneJET RNA Isolation Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilmiştir. Kit ile sağlanan 600 µl lizis tamponu kullanılarak hücreler homojenize edilmiştir. 360 µl %100 etanol ilave edildikten sonra örnekler kolonlara yüklenmiş ve 12000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Yıkama tamponları ile yıkanan kolonlardan 30 ul DNaz/RNaz içermeyen su kullanılarak RNA izolasyonu tamamlanmıştır. RNA izolasyonu sonrasında olası DNA kontaminasyonundan arındırmak için RNA örnekleri DNaz enzimi (Thermo Scientific, ABD) ile 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometre (Multiskan Go, Thermo Scientific) kullanılarak ölçülmüştür.

3.5. cDNA Sentezi ve qPZR Analizi

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ABD) ile rasgele primerler kullanılarak 1 µg total RNA'dan cDNA sentezlenmiştir. qPZR reaksiyon karışımı, 10 µl SYBR Green (Biorad, ABD), 1 µl cDNA, 1 µl ileri ve geri yönlü primer (5 µM) (Tablo 3.2.), 7 µl distile sudan oluşmaktadır. Amplifikasyonlar 95°C'de 5 dakika denatürasyon sonrasında 40 döngü 95°C'de 10 saniye denatürasyon ve 57°C'de 30 saniye primer bağlanması ve zincir uzaması şeklinde Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3.) mRNA seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. *GAPDH* referans gen olarak kullanılmıştır ve hedef gen sonuçları *GAPDH* sonuçlarına normalize edilmiştir.

Tablo 3.2. qPZR deneylerinde kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
<i>GAPDH</i> -İleri	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC
<i>GAPDH</i> -Geri	AACATGTAAACCATGTAGTTGAGGT
<i>Bax</i> -İleri	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG
<i>Bax</i> -Geri	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>Bcl-2</i> -İleri	GGTGGGGTCATGTGTGTGG
<i>Bcl-2</i> -Geri	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC

3.6. İstatistiksel analiz

MTT analizleri 3 bağımsız örnek ile tekrarlanmıştır. Standart sapma ve hata değerleri hesaplanmış, verilerin istatistiksel önemi Student's t-test ile belirlenmiştir.

Tablo 3.3. *Kullanılan cihazlar*

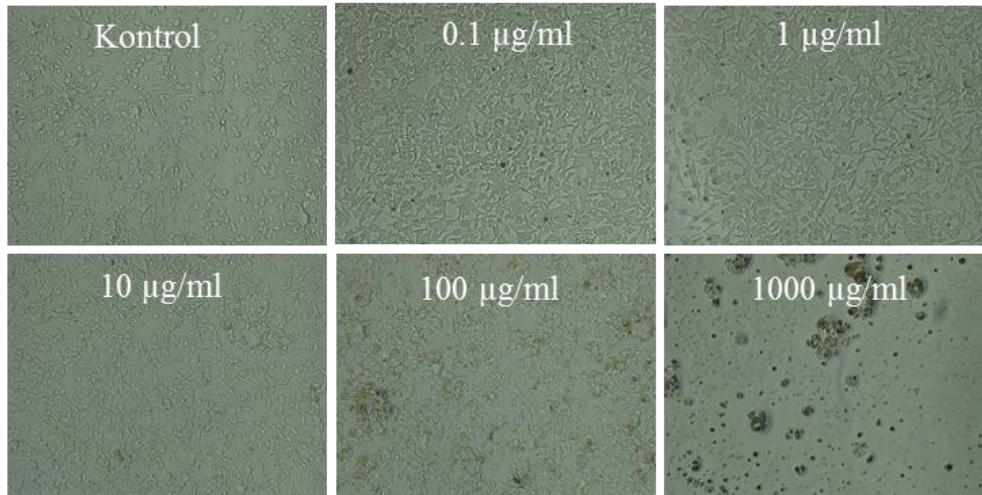
Cihaz Adı	Marka/Model
CO ₂ İnkübatörü	Nüve EC 160
Laminar Kabin	Hedlab
Inverted Mikroskop	Leica
Santrifüj	Nüve NF 800
qPCR Cihazı	Qiagen Rotor-Gene Q
PCR Cihazı	Techne TC-512
Mikroplaka Spektrofotometre	Thermo Scientific
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat
Otoklav	WiseCave
-80°C Derin Dondurucu	Nuaire NU 9668E
-20°C Derin Dondurucu	Arçelik
pH Metre	Isolab
Vortex Mixer	WiseMix
Buz Makinası	Hoshizaki
Manyetik karıştırıcı	WiseStir
Hassas terazi	Precisa

4. BULGULAR

4.1. Hücre Morfolojisi ve Sitotoksik Etki

Göknar öz ve diri özütlerinin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile test edilmiştir. Hücreler, 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda göknar öz ve diri özütleri ile muamele edilmiştir. Özüt ile inkübasyon sonrası mikroskop incelemelerinde sitotoksik etki gözlemlenen hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.7., Şekil 4.8.)

Göknar Öz - 24 saat



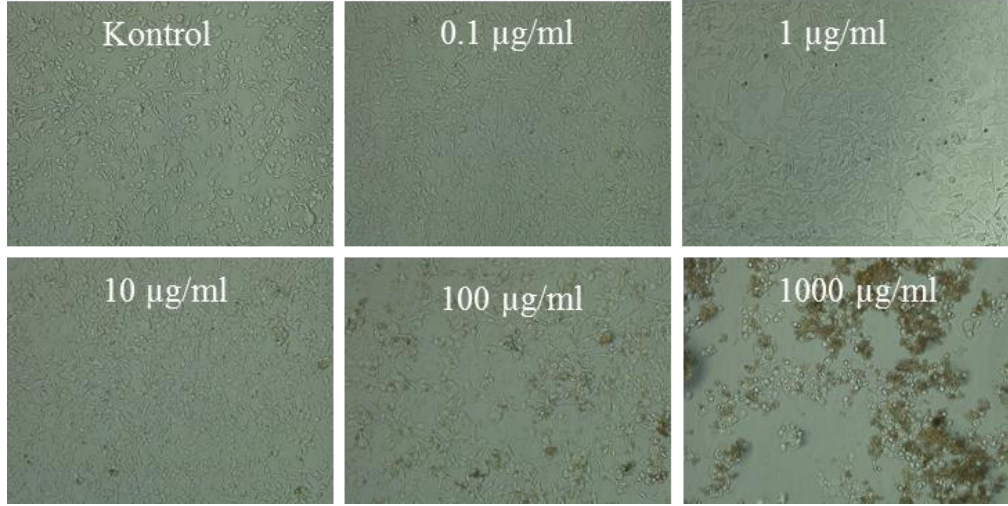
Şekil 4.1. Öz özütü ile 24 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.

24 Saatte hücre canlılığı 0-100 µg/ml arası konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik göstermemiştir. 1000 µg/ml'de öz özütünde % 70 oranında, diri özütünde % 73 oranında hücre canlılığında düşüş gözlemlenmiştir ve bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.3.).

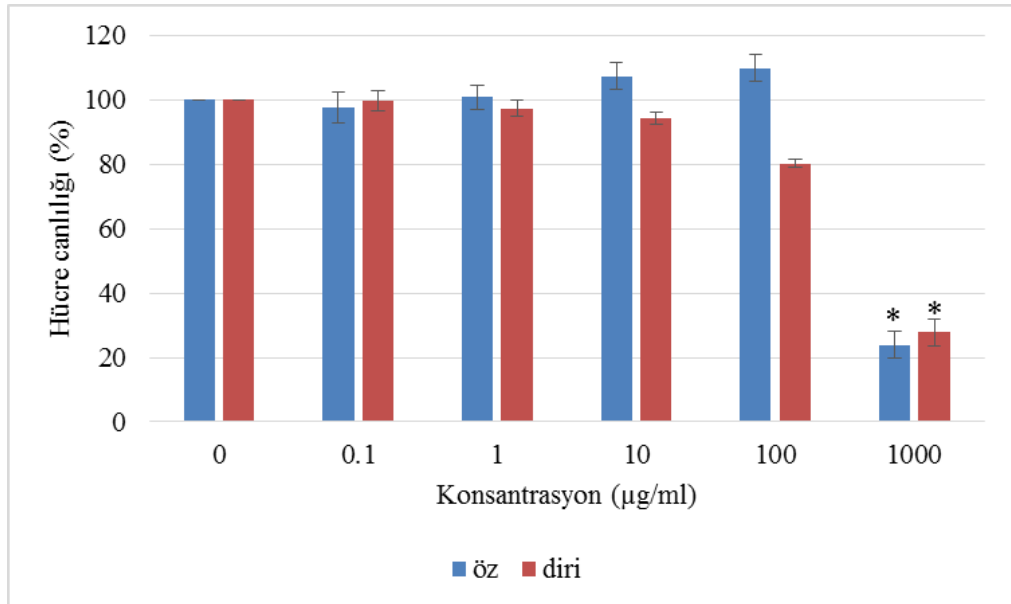
48 Saatte 0-100 µg/ml arası konsantrasyonlarda hücre canlılığında düşüş gözlemlenmemiştir. 1000 µg/ml'de ise öz özütünde % 93, diri özütünde % 92

oranında hücreler ölmüştür. 1000 µg/ml özüt konsantrasyonu ile 48 saat inkübasyon sonucu elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.6).

Gökmar Diri- 24 saat

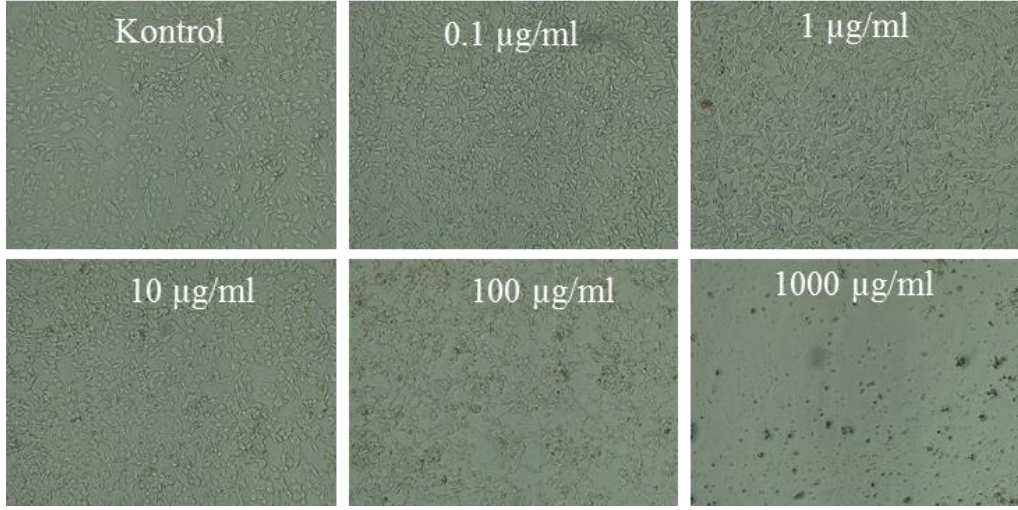


Şekil 4.2. Diri özütü ile 24 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.



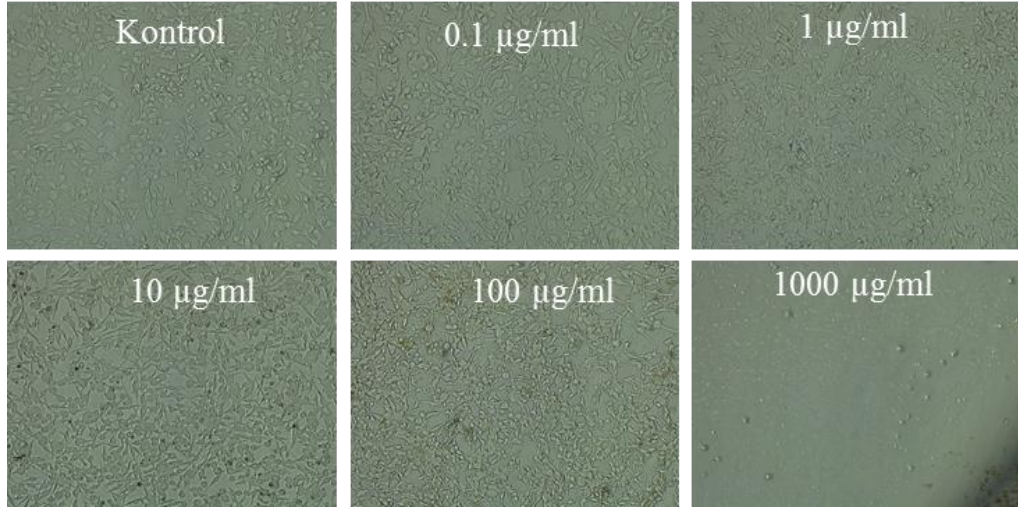
Şekil 4.3. MTT analizi sonuçları-24 saat. MDA-MB-231 hücreleri, 24 saat, artan dozlarda gökmar özütleri ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Grafikte ortalamalar ± SH datası gösterilmiştir (n = 3). * p < 0.05.

Gök nar Öz-48 saat



Şekil 4.4. Öz özütü ile 48 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.

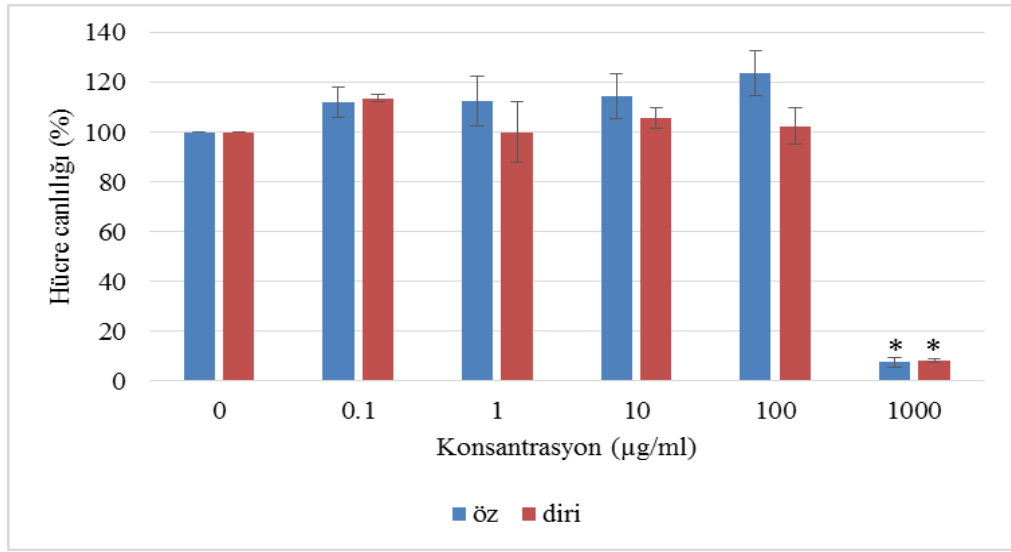
Gök nar Diri-48 saat



Şekil 4.5. Diri özütü ile 48 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.

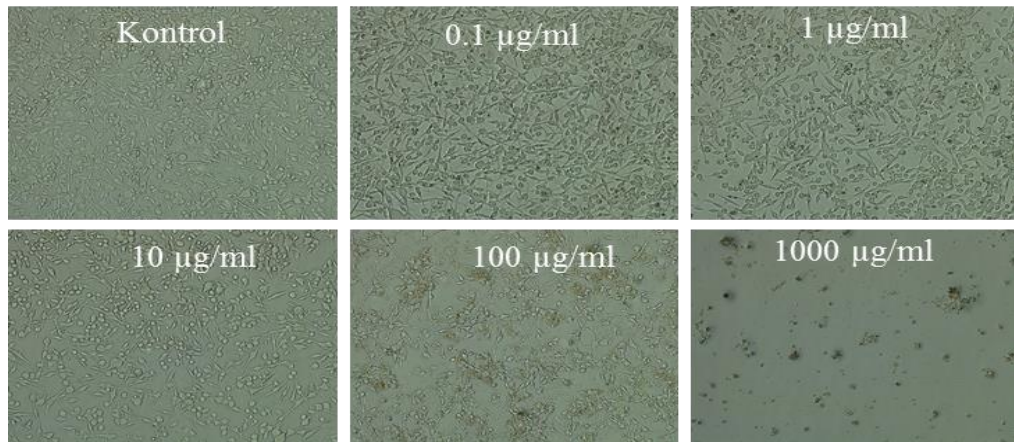
72 Saatte 0-100 µg/ml arasında hücre ölümü görülmezken 1000 µg/ml'de öz özütü % 98, diri özütü ise % 97 oranında hücre ölümüne sebep olmuştur. Öz ve diri özütlerinin 72 saat sonundaki güçlü sitotoksik etkisi de istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.9.).

Göknar öz özütü için 24 saatte IC₅₀ değeri 849 µg/ml, 48 saatte 789.9 µg/ml, 72 saatte 595.3 µg/ml olarak hesaplanmıştır. En düşük IC₅₀ değeri 72 saatte elde edilmiştir (Şekil 4.10.). Bu sebeple apoptoz deneylerinde 72 saatlik öz özütü inkübasyonu yapılmıştır. Göknar diri özütü için 24 saatte IC₅₀ değeri 388.2 µg/ml, 48 saatte 710.6 µg/ml, 72 saatte ise 264 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10.). En düşük IC₅₀ değeri 72 saatte elde edildiği için apoptoz deneylerinde 72 saatlik diri özütü inkübasyonu yapılmıştır.



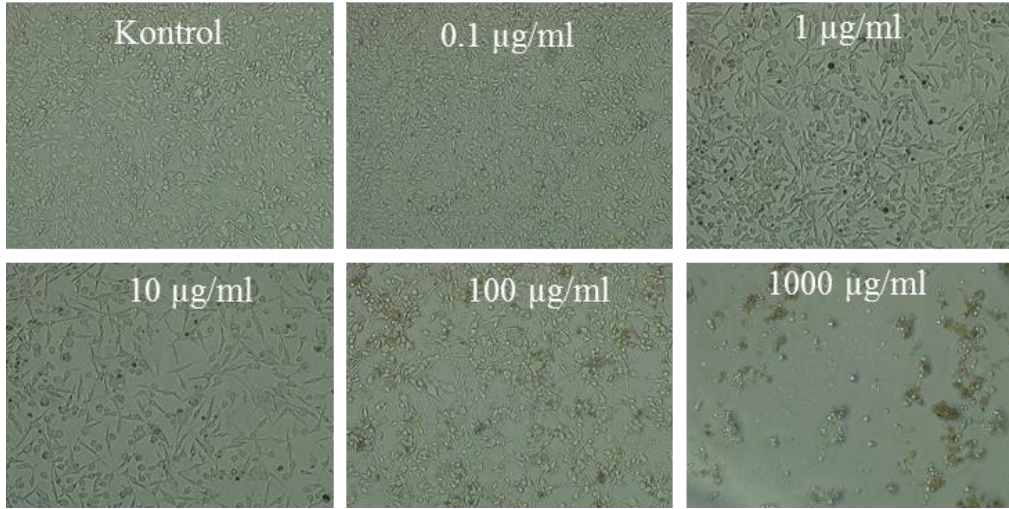
Şekil 4.6. MTT analizi sonuçları-48 saat. MDA-MB-231 hücreleri, 48 saat, artan dozlarda göknar özütleri ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Grafikte ortalamalar ± SH datası gösterilmiştir (n = 3). * p <0.05.

Göknar Öz-72 saat

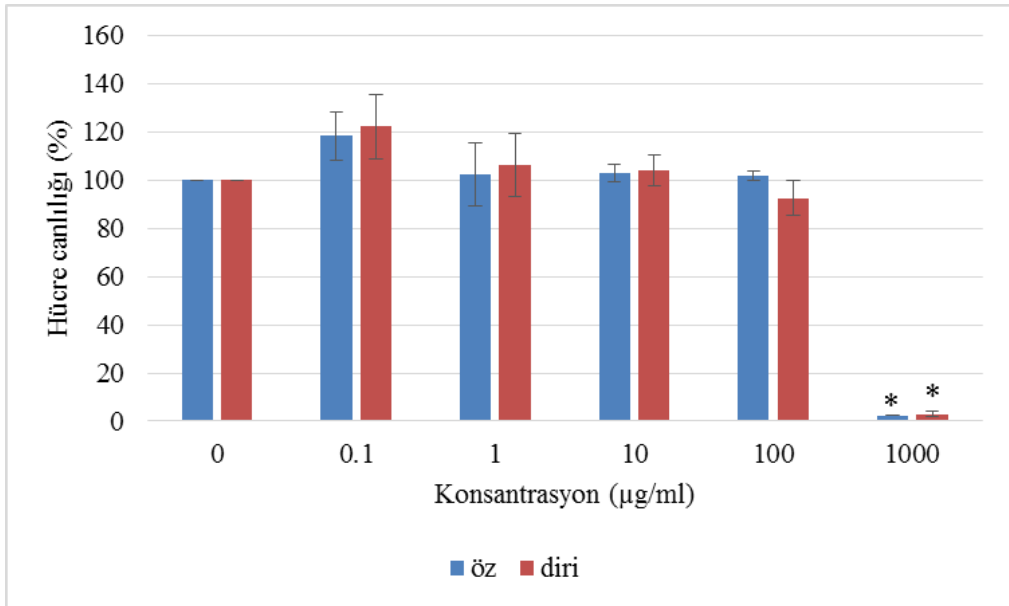


Şekil 4.7. Öz özütü ile 72 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.

Göknar Diri-72 saat



Şekil 4.8. Diri özütü ile 72 saat muamele sonrası hücre morfolojisi. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücreler, ters mikroskop (Leica, Almanya) ile 10x objektif büyütme kullanılarak incelenmiştir.

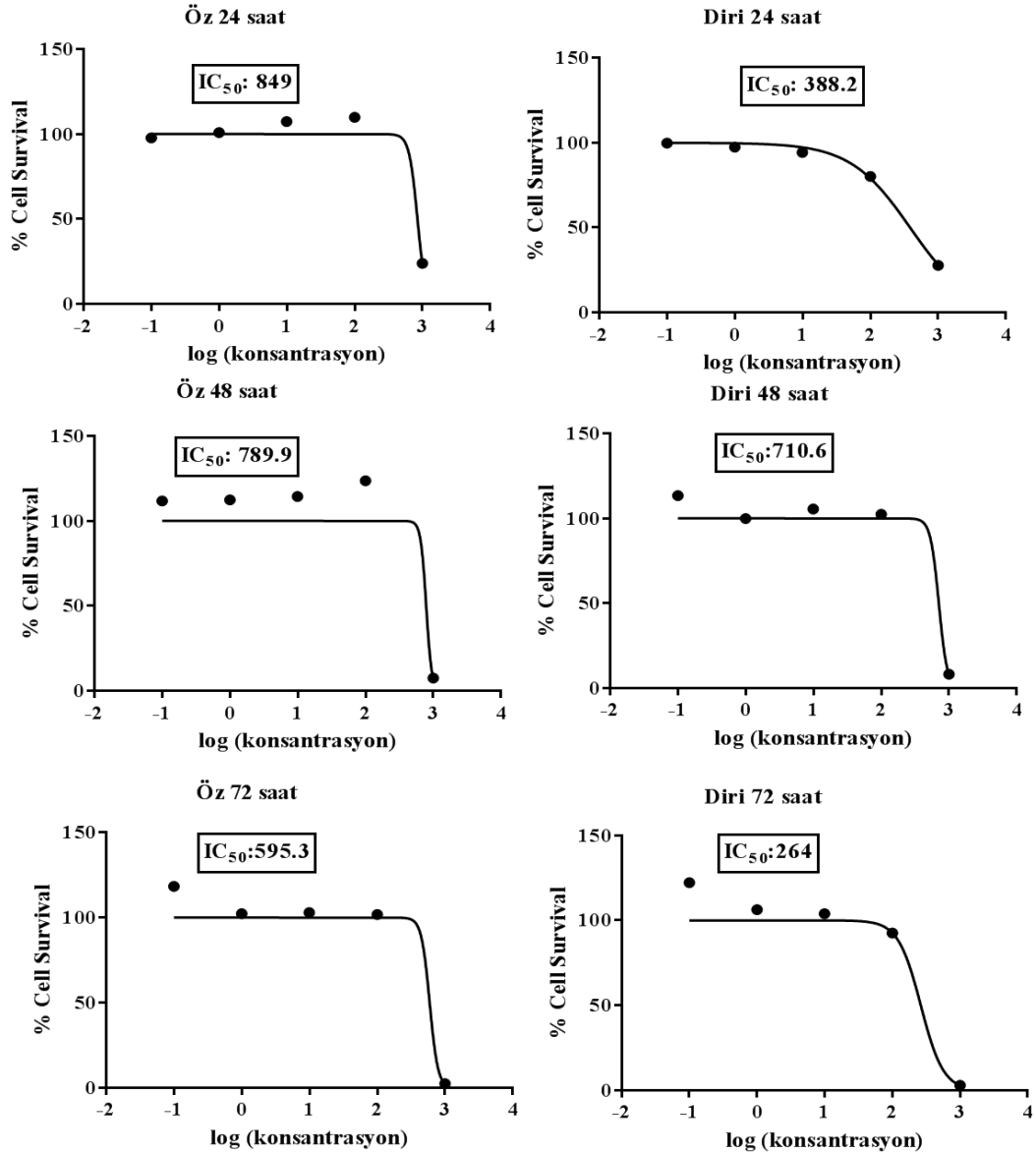


Şekil 4.9. MTT analizi sonuçları-72 saat. MDA-MB-231 hücreleri, 72 saat, artan dozlarda göknar özütleri ile muamele edilmiştir. Kontrol hücreleri % 0.1 DMSO ile muamele edilmiştir. Grafikte ortalamalar \pm SH datası gösterilmiştir (n = 3). * p < 0.05.

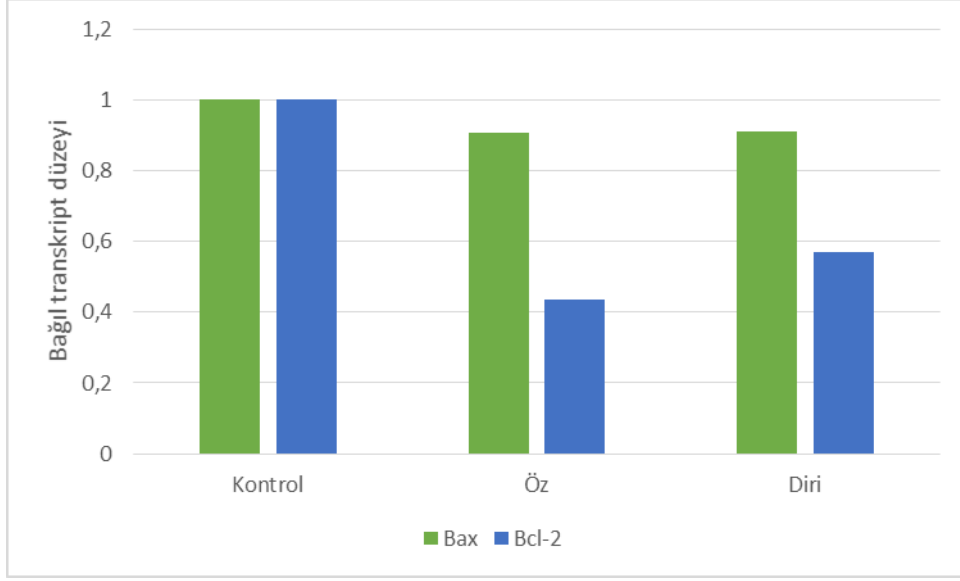
4.2. Apoptotik Etki

Sonuçlarımıza göre *Bax* transkript düzeyinde her iki özüt için de önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir. *Bcl-2* transkript seviyesi öz özütü ile muamele edildiğinde % 53 oranında azalırken, diri özütü ile muamele edildiğinde %46

oranında düşmüştür. Apoptozun pro- ve anti-apoptotik genler arasındaki dengeye bağlı olarak gerçekleştiği göz önünde bulundurulursa hem öz hem göknar özütlerinde artan pro/anti apoptotik gen oranı, bu özütlerin apoptozu tetiklediğini göstermektedir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.10. IC_{50} değerleri. Göknar öz ve diri özütlerinin IC_{50} değerleri, GraphPad Prism 7 programı yardımıyla verilere doğrusal olmayan bir doz-yanıt eğrisi uygulanarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Apoptotik gen ifadeleri. MDA-MB-231 hücreleri, göknar öz ve diri özütleri IC_{50} ile 72 saat boyunca muamele edilmiştir. *Bax* ve *Bcl-2* genlerinin transkript seviyeleri qPCR ile analiz edilmiştir. *GAPDH* referans geni olarak kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Kanser, çok sayıda hastanın ölümüne neden olan ciddi bir sağlık sorunudur. En yaygın kullanılan kanser tedavilerinden kemoterapide sitotoksik ilaçlar kullanılmakta ve bu ilaçların hastanın refahını azaltacak mide bulantısı, ağrı, sindirim sistemi problemleri gibi yan etkileri olmaktadır. Bu sebeple yan etkisi olmayan doğal kaynaklı bileşenlerden türetilen ilaçlar son zamanlarda yoğun ilgi görmektedir. Bu çalışmada, *A. nordmanniana* öz ve diri özütlerinin üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkisinin analizi amaçlanmıştır. Zaman ve doza bağlı toksisite olup olmadığını belirlemek için hücreler öz ve diri özütlerinin beş farklı konsantrasyonuyla 3 farklı zaman periyodunda (24, 48, 72 saat) muamele edilmiştir. Mikroskop incelemeleri özüt konsantrasyonuna bağlı olarak hücre morfolojisinde değişimler olduğunu göstermiştir. MTT analizi sonuçlarına göre, hem öz hem diri özütleri için MDA-MB-231 hücrelerinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Özütler maximum konsantrasyonda (1000 µg/ml) zamana bağlı bir şekilde MDA-MB-231 hücre yoğunluğunu azaltmıştır. 0-100 µg/ml konsantrasyon uygulamalarında önemli bir sitotoksik etki tespit edilmemiştir. En etkili hücre ölümü 72 saat özüt inkübasyonları sonucunda gözlemlenmiştir ve dolayısıyla en düşük IC50 değerleri 72 saat inkübasyon sonuçlarıyla elde edilmiştir (öz: 595,3 µg/ml, diri: 264 µg/ml).

Doğal bir bileşenin kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeye kabiliyeti, bir anti-kanser ajanı olarak kullanılma potansiyelini göstermektedir. Bu nedenle, göknar özütlerinin apoptoz uyarma potansiyeli apoptoz ile ilişkili genlerin ifade profili irdelenerek analiz edilmiştir. Bunun için MDA-MB-231 hücreleri göknar öz (595,3 µg/ml) ve diri özütleriyle (264 µg/ml) 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Her iki özüt için de, pro-apoptotik gen *Bax* seviyesinde değişiklik olmazken, anti-apoptotik *Bcl-2* gen seviyesinde yaklaşık %50 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Sonuç olarak *Bax/Bcl-2* oranındaki toplam artış özüt muamelesi ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde apoptoz aracılığıyla hücre ölümü gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Ek olarak, bu bitki türlerinin aktif içerikleri ve fitokimyasalları çeşitli analitik yöntemlerle tanımlanmış ve göknar öz ve diri özütlerinde benzoik asit, kaempferol ve apigenin yüksek oranda tespit edilmiştir. Göknar özütlerinde yüksek oranda bulunan bileşiklerden apigenin ve kaempferol, apoptozu uyarma ve çeşitli sinyal yollarını modüle etme kabiliyetlerinden dolayı son yıllarda ümit verici bir anti-kanser ajan olarak dikkat çekmiştir. Birçok çalışma, *in vitro* ve *in vivo* olarak çok çeşitli kanser türlerine karşı apigenin için anti-kanser aktivite olduğunu rapor etmiştir. Apigenin, hücre döngüsünü engelleyerek, apoptozu uyararak ve tümör metastazını engelleyerek anti-kanser etkinlik göstermektedir. Ayrıca, ilaç direncini, metastazı ve kanserin tekrarlanmasını önleme açısından kritik öneme sahip olan kanser kök hücrelerini de inhibe etmektedir (Yan vd., 2017). MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan çalışmalarda apigeninin siklin A, siklin B ve sikline bağlı kinaz-1 (CDK1) ifadesini baskılayarak hücre döngüsünü durdurduğu ve hücre çoğalmasını azalttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, apigeninin ksenograft modelinde tümör büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir (Tseng vd., 2017). Kaempferol, apoptoz, hücre döngüsü, anjiyogenez ve metastaz mekanizmalarını düzenlemektedir. Diğer kemoterapi ilaçlarıyla karşılaştırıldığında daha az toksik etki göstermekle birlikte kombinasyon olarak diğer kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kullanıldığında kemoterapi etkinliğini arttırmaktadır. (Chen ve Chen, 2013). *Gynura medica* özütlerinden izole edilen kaempferol, *Bcl-2* ifadesini düzenleyerek apoptoz indüklemiş ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir (Yi vd., 2016). Benzoik asit, kaspaz-3 aracılı apoptoz yoluyla kanser hücresi büyümesini inhibe etmektedir (Anantharaju vd., 2017). Benzoik asit bazlı inhibitör SH4-54 *in vitro* insan glioma, meme ve prostat kanseri hücrelerinde STAT3 DNA bağlanma aktivitesini ve STAT3'e bağımlı gen transkripsiyonu ile birlikte Bcl-2, BclxL, Mcl-1, Cyclin D1, c Myc ve Survivin ifadesini bloke etmiştir. SH4-54 glioma, meme ve prostat kanseri hücrelerinin sağkalımını ve çoğalmasını azaltmış, fare ksenograft glioma ve meme kanseri modellerinde ise tümör büyümesini engellemiştir (Yue vd., 2016). Literatürde belirtilen apigenin, kaempferol ve benzoik asit bu çalışmada elde edilen verileri desteklemektedir. Göknar özütlerinin anti-kanser etkinliği içeriğinde bulunan apigenin, kaempferol ve benzoik asidin kombine etkisine dayandırılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Birçok araştırmacı, toksik olmamaları nedeniyle bitki kökenli kanser önleyici ilaçlara odaklanmıştır. Bu çalışmada, göknar öz ve diri özütlerinin MDA-MB-231 üçlü negative meme kanseri hücrelerine karşı anti-kanser etkinliği olduğu gösterilmiştir. Öz ve diri özütlerinin MDA-MB-231 hücrelerine karşı yakın derecede sitotoksik etkisi vardır. Ayrıca hem öz hem diri özütleri pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ifade seviyesinde değişiklik sağlayarak apoptozu uyarmıştır. Göknar özütleri için çalışmamızda tanımlanan yeni biyolojik aktivite anti-kanser ajan olarak geliştirilmesine dair umut vermektedir. Etki mekanizmalarının anlaşılması için hücre döngüsü, anjiyogenez, metastaz test edecek detaylı moleküler analizler yapılmalı ve *in vivo* deneylerle doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Anantharaju, P. G., Reddy, B. D., Padukudru, M. A., Kumari Chitturi, C. M., Vimalambike, M. G., and Madhunapantula, S. V. (2017). Naturally occurring benzoic acid derivatives retard cancer cell growth by inhibiting histone deacetylases (HDAC). *Cancer biology and therapy*, 18(7), 492-504.
- Aoyama, M. (1992). Antifungal activities of wood extractives of todomatsu, *Abies sachalinensis* Masters, against pathogenic fungi causing turfgrass diseases. *Journal of the Japan Wood Research Society* (Japan).
- Bağci, E., and Diğrak, M. (1996). Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey. *Flavour and fragrance journal*, 11(4), 251-256.
- Barrero, A. F., Haïdour, A., Dorado, M. M., and Cuerva, J. M. (1996). Two sesquiquilignans from the wood of *Abies marocana*. *Phytochemistry*, 41(2), 605-609.
- Bertram, J. S. (2001). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- Cazzaniga, M., and Bonanni, B. (2012). Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *BioMed Research International*, 2012.
- Chen, A. Y., and Chen, Y. C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138(4), 2099-2107.
- Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in cell biology*, 18(4), 157-164.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *American journal of cancer research*, 5(10), 2929.
- Diğrak, M., İlçim, A., and Hakkı Alma, M. (1999). Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(7), 584-587.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798.

- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., and Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- Kim, H. J., Le, Q. K., Lee, M. H., Kim, T. S., Lee, H. K., Kim, Y. H. and Lee, I. S. (2001). A cytotoxic secocycloartenoid from *Abies koreana*. *Archives of pharmacal research*, 24(6), 527.
- Klein, G. (2000). Better understanding of the biology of cancer cells. *Ugeskrift for laeger*, 162(39), 5199-5204.
- Kumar, V., Singh, R. K., Jaiswal, A. K., Bhattacharya, S. K., and Acharya, S. B. (2000). Anxiolytic activity of Indian *Abies pindrow* Royle leaves in rodents: an experimental study. *Indian journal of experimental biology*, 38.
- Lickliter, J. D., Wood, N. J., Johnson, L., McHugh, G., Tan, J., Wood, F. and Wickham, N. W. (2003). HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia*, 17, 2074–2080
- McGuire, S. (2016). World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015.
- Ouyang, L., Luo, Y., Tian, M., Zhang, S. Y., Lu, R., Wang, J. H. and Li, X. (2014). Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell proliferation*, 47(6), 506-515.
- Richardson, M. D., Peterson, J. R., and Clark, A. M. (1992). Bioactivity screenings of plants selected on the basis of folkloric use or presence of lignans in a family. *Phytotherapy Research*, 6(5), 274-278.
- Sanders, K., Moran, Z., Shi, Z., Paul, R., and Greenlee, H. (2016, August). Natural products for cancer prevention: Clinical update 2016. In *Seminars in oncology nursing* (Vol. 32, No. 3, pp. 215-240). WB Saunders.
- Savill, P., Wilson, S. M., Mason, B. and Jinks, R. (2016). Silver Firs (*Abies* spp) of Europe and the Near East. 18-30.
- Shapiro, C. L. (2016). Highlights of recent findings on quality-of-life management for patients with cancer and their survivors. *JAMA oncology*, 2(11), 1401-1402.

- Singh, R. K., Nath, G., Goel, R. K., and Bhattacharya, S. K. (1998). Pharmacological actions of *Abies pindrow* Royle leaf. *Indian journal of experimental biology*, 36(2), 187-191.
- Stefanou, D., and Evangelou, A. (2000). Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. *Anticancer research*, 20, 4391-4396.
- Tseng, T. H., Chien, M. H., Lin, W. L., Wen, Y. C., Chow, J. M., Chen, C. K. and Lee, W. J. (2017). Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylation-mediated p21WAF1/CIP1 expression. *Environmental toxicology*, 32(2), 434-444.
- Tumen, I., Akkol, E. K., Süntar, I., and Keleş, H. (2011). Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: Preclinical experimental research in animal models. *Journal of ethnopharmacology*, 137(3), 1215-1220.
- URL1. Erdim, A., Meme Kanseri, M.Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi Cerrahi Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı, 25/07/2019 tarihinde http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/anasayfalinkler/belge/meme_ca_2014.pdf sitesinden alınmıştır.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
- Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., and Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell and bioscience*, 7(1), 50.
- Yang, X. W., Li, S. M., Shen, Y. H., and Zhang, W. D. (2008). Phytochemical and biological studies of *Abies* species. *Chemistry and Biodiversity*, 5(1), 56-81.
- Yi, X., Zuo, J., Tan, C., Xian, S., Luo, C., Chen, S. and Luo, Y. (2016). Kaempferol, a flavonoid compound from *Gynura medica* induced apoptosis and growth inhibition in mcf-7 breast cancer cell. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 13(4), 210-215.
- Yue, P., Lopez-Tapia, F., Paladino, D., Li, Y., Chen, C. H., Namanja, A. T. and Turkson, J. (2016). Hydroxamic Acid and Benzoic Acid-Based STAT3 Inhibitors Suppress Human Glioma and Breast Cancer Phenotypes In Vitro and In Vivo. *Cancer research*, 76(3), 652-663.
- Zhang, Q. Y., Wang, F. X., Jia, K. K., and Kong, L. D. (2018). Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Frontiers in pharmacology*, 9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep TUNCEL
Doğum Yeri ve Yılı : Kastamonu, 1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : zeynep7xx@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Orhan Şaik Gökyay Lisesi
Lisans : Kastamonu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü