T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAÇLI FİĞ (*Coronilla varia*) VE GAZELBOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİ EKSTRAKTLARININ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE *In Vitro* SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER SEVİYEDE İNCELENMESİ

Şerife YERLİKAYA

Danışman	**Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU**
Jüri Üyesi	**Prof. Dr. Ekrem GÜREL**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Songül GÜREL**
Jüri Üyesi	**Dr. Öğr. Üyesi Mahmut GÜR**

DOKTORA TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Şerife YERLİKAYA tarafından hazırlanan "**Taçlı fiğ (*Coronilla varia*) ve Gazelboynuzu (*Lotus corniculatus*) Bitki Ekstraktlarının Meme Kanseri Hücrelerinde *In vitro* Sitotoksik Etkilerinin Moleküler Seviyede İncelenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ekrem GÜREL Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Songül GÜREL Abant İzzet Baysal Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut GÜR Kastamonu Üniversitesi	.....

05/08/2019

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

Şerife YERLİKAYA



ÖZET

Doktora Tezi

TAÇLI FİĞ (*Coronilla varia*) VE GAZELBOYNUZU (*Lotus corniculatus*) BİTKİ EKSTRAKTLARININ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE *In Vitro* SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER SEVİYEDE İNCELENMESİ

Şerife YERLİKAYA
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Kanser gelişimi, genetik olaylar, anjiyogenez, metastaz ve mutasyonları içeren bir dizi olaylar nedeniyle ortaya çıkar. Bu çalışmada, *Lotus corniculatus* ve *Coronilla varia* adlı iki bitki türünün toprak üstü parçalarının EA, MeOH ve su ekstraktlarının DNA koruma aktiviteleri, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotik, otofajik ve telomeraz gen aktivitelerinin belirlenmesi ve bu hücreler üzerindeki anti-metastatik aktiviteleri araştırılmıştır.

Lotus corniculatus EA ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz tespit edilmiştir. Ayrıca *Lotus corniculatus* EA ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde ise *Bcl-2* gen ifadesinin artışıyla otofaji belirleyen gen ifadelerinin arttığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, sıvı kromatografi, Dionex Ultimate 3000RS UHPLC sistemi ile belirlenmiş olan bitki ekstraktları içerisindeki fenolik içeriklerle ilişkilendirilmiştir. *Lotus corniculatus* EA içerisinde diğer ekstraktlarda var olmayan linoleamid maddesi tespit edilmiş, antikanser sonuçların bu maddeyle ilişkili olduğu literatür araştırmasında doğrulanmıştır. Ayrıca, *Coronilla varia* EA ve su ekstraktları ile muamele edilen sırasıyla MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde *Bax* gen ifadesinin artışı ve *Bcl-2* gen ifadesinin azalmasıyla apoptotik hücre ölümünün başladığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada yüksek aktiviteye sahip linoleamid maddesinin ilaç direncini tersinir ederek potansiyel ilaç ham maddesi olması ile ilgili kapsamlı çalışmalara katkısı olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekstrakt, antikanser, apoptoz, otofaji, metastaz

2019, 147 sayfa
Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

MOLECULAR INVESTIGATION OF *In Vitro* CYTOTOXIC EFFECTS OF CROWNVETCH (*Coronilla varia*) AND BIRD'S-FOOT TREFOIL (*Lotus corniculatus*) PLANT EXTRACTS ON BREAST CANCER CELLS

Şerife YERLİKAYA
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

Cancer development is caused by a series of events involving genetic events, angiogenesis, metastasis and mutations. In this study, plasmid DNA protection activities, apoptotic, autophagic and telomerase gene activities and anti-metastatic activities of aerial parts of two plant species *Lotus corniculatus* and *Coronilla varia* EA, MeOH and water extracts on MCF-7 and MDA-MB-231 cells were investigated.

Apoptosis was determined in MDA-MB-231 cells treated with *Lotus corniculatus* EA extract. In addition, it was found that in the MCF-7 cells, treated with *Lotus corniculatus* EA extract, the expression of *Bcl-2* gene was increased and the expression of autophagy genes was increased. Results were associated to phenolic contents in extracts determined by Dionex Ultimate 3000RS UHPLC analysis. In *Lotus corniculatus* EA, linoleamide substance was detected and it was confirmed that anticancer results were related with this substance in literature review. In addition, after treatment of MCF-7 cells with *Coronilla varia* EA and MDA-MB-231 cells with *Coronilla varia* water, *Bax* gene expression increased and *Bcl-2* gene expession decreased due to apoptotic mechanism.

In this study, it is predicted that linoleamide will contribute to the comprehensive studies by making drug resistance reversible for being the potential raw material of the drug.

Key Words: Extract, anticancer, apoptosis, autophagy, metastasis

2019, 147 pages
Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmaları ve bilimsel çalışmalar boyunca her türlü bilgi birikimi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve bundan sonraki akademik hayatım boyunca da destek ve danışmanlığına her zaman ihtiyaç duyacağım çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, her zaman akademik tecrübelerini benimle paylaşan, yönlendiren ve rehberlik eden değerli amcam Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya, Doç. Dr. Gökhan ZENGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Aslı UĞURLU ve Tez Takip Komitesi hocalarım Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU ve Doç. Dr. Nesrin ŞENER'e, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve çalışanlarına, laboratuvar arkadaşlarıma ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kastamonu Üniversitesi BAP projeleri kapsamında, KÜ-BAP01/2018-7 kodlu "Taçlı fiğ ve Gazelboynuzu Bitkilerinin Antikanser, Antimikrobiyal ve DNA Koruma Özelliklerinin İncelenmesi" ve KÜ-BAP01/2019-21 kodlu "Taçlı Fiğ ve Gazelboynuzu Bitki Özütlerinin Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antikanser Etkisinin Moleküler Seviyede İncelenmesi" isimlerindeki projeleri ile laboratuvar deneylerimi maddi olarak destekleyen Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve danışmanım Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şerife YERLİKAYA
Kastamonu, Ağustos, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI ii
TAAHHÜTNAME iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
TABLOLAR DİZİNİ xiv
1. GİRİŞ 1
1.1. Kanser Moleküler Biyolojisi 2
1.1.1. Kanser Genleri 2
1.1.2. Kanser Biyokimyası ve Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü 5
1.1.3. Kanserde İlaç Direnç Mekanizmaları 9
1.2. Kanserde Hücre Ölüm Modları 12
1.2.1. Apoptoz 12
1.2.2. Otofaji 19
1.2.3. Nekroptoz 25
1.3. Telomerler ve Kanserde Telomeraz Aktivitesi 28
1.4. Meme Kanseri 32
1.4.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı ve Özellikleri 35
1.4.2. MCF-7 Hücre Hattı ve Özellikleri 36
1.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri 37
1.5.1. *Lotus corniculatus L.*(Gazelboynuzu) 39
1.5.2. *Coronilla varia L.* (Taçlı fiğ) 41
2. KURAMSAL TEMELLER 44
2.1. Kanser Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar 44
3. MATERYAL VE YÖNTEM 48
3.1. Materyal 48
3.1.1. Kullanılan Bitki Türleri 48
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde, Kit ve Ekipmalar 48
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler 49
3.1.4. Kullanılan Hücre Hatları 49
3.1.5. Hücreler için Kullanılan Kimyasal Madde ve Besiyerleri 50
3.1.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar 50
3.2. Yöntem 51
3.2.1. Bitki Ekstraktları Hazırlanışı 51
3.2.2. Bitki Ekstraktları Fenolik İçerik Tayini 51
3.2.3. DNA Koruma Aktivite Analizi 52
3.2.4. Kanser Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi 53
3.2.4.1. *Bitki Ekstraktlarının Hücre Kültürü İçin Hazırlanışı* 53
3.2.4.2. *Hücre Sayımı ve Hücre Ekimi* 53
3.2.4.3. *MTT Hücre Canlılık Testi* 54
3.2.4.4. *Hücreler İçin İnhibitör Ekstrakt Konsantrasyonlarının (IC_{50})*

Belirlenmesi 55
3.2.4.5. *Apoptotik, Otofajik ve Telomeraz Gen İfade Analizleri* 55
3.2.4.5.1. *Hücreden Total RNA İzolasyonu* 55
3.2.4.5.2. *DNaz Muamelesi* 57
3.2.4.5.3. *Komplementer DNA Sentezi* 57
3.2.4.5.4. *Polimeraz Zincir (PZR) Reaksiyonu* 58
3.2.4.5.5. *Gerçek Zamanlı PZR Analizi* 59
3.2.4.6. *DNA fragmentasyon Analizi ile Apoptozun Belirlenmesi* 62
3.2.4.7. *Hücre Göçü Testi* 63
3.3. İstatistiksel Analizler 64
4. BULGULAR 65
4.1. DNA Koruma Aktivitesi 65
4.1.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları DNA Koruma Testi Sonuçları 66
4.1.2. *Coronilla varia L.* Ekstraktları DNA Koruma Testi Sonuçları 66
4.2. Bitki Ekstraktlarının Kanser Hücreleri Üzerindeki Canlılığının MTT Testi ile Belirlenmesi 67
4.2.1. Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücreleri Canlılığına Etkisi 68
4.2.2. Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Canlılığına Etkisi 69
4.2.3. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi 70
4.2.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi 72
4.2.5. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi 73
4.2.6. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi 75
4.3. Gen İfade Analizi Sonuçları 77
4.3.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları 77
4.3.2. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları 79
4.3.3. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları 80
4.3.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları 82
4.4. DNA Fragmentasyon Analizi Sonuçları 83
4.4.1. *Lotus corniculatus L.* EA Ekstraktı MDA-MB-231 Hücresi Fragmentasyon Analizi Sonucu 83
4.4.2. *Coronilla varia.* Su Ekstraktı MDA-MB-231 Hücresi Fragmentasyon Analizi Sonucu 84
4.5. Hücre Göçü Analizi Sonuçları 85
4.5.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri ... 86
4.5.2. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri 88
4.5.3. *Lotus corniculatus* Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri 90

4.5.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri 92
4.6. *Lotus corniculatus* ve *Coronilla varia* Ekstraktları Fenolik İçerikleri..... 94
5. TARTIŞMA 109
6. SONUÇLAR 118
7. ÖNERİLER 120
KAYNAKLAR 121
EKLER 139
EK 1- (*Lotus* (L.) Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları) 140
EK 2- (*Coronilla* (C.) Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları)..... 141
EK 3- (*Lotus* (L.) Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları) 142
EK 4- (*Coronilla* (C.) Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları)..... 143
EK 5- (Apoptotik, Otofajik Ve Telomeraz Aktivite Genlerinin MDA-MB- 231 ve MCF-7 Hücrelerindeki Erime Eğri Grafikleri) 144
ÖZGEÇMİŞ 145

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cDNA	Komplementer DNA
kDa	kilodalton
mg	Miligram
p53	Tümör baskılayıcı protein
µg	Mikrogram
°C	Santigrad
~	Yaklaşık olarak
α	Alfa
µ	Mikro
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
β	Beta

Kısaltmalar

ABC	ATP-bağlayıcı kaset
AMPK	Aktifleştiren Protein Kinaz
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici faktör 1
ATG	Otofaji-ilişkili genler
Bad	Bcl-2-ilişkili ölüm proteini
Bax	Bcl-2-benzeri protein 4
Bcl-2	B-hücresi lenfoma 2
BCRP	Meme Kanseri Direnç Protein
CAD	Kaspaz aktive edici deoksiribonükleaz
CDK	Siklin Bağımlı Kinazlar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EA	Etilasetat
EGRF	Epidermal Büyüme Faktörü reseptörü
ER-α	Östrojen-reseptör alfa
FBS	Fetal Bovine Serum
hTERT	İnsan telomeraz ters transkriptaz
IGF-1	İnsulin büyüme faktörü reseptörü 1
LC3	Mikrotübül-ilişkili Protein 1 Light Chain 3
LCK	Lenfosit-spesifik Protein Tirozin Kinaz
MAPK	Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz
MDR	Multi Drug Resistance
MeOH	Metanol
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
PARP	Poly-ADP Riboz Polimeraz
PDGF	Platelet-kökenli Büyüme Faktörü
P-gp	P glikoprotein
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz

PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma
RIP	Receptor Interacting Protein
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
TACE	TNF-α dönüştürücü enzim
TNF	Tumor nekroz Faktör
TRAIL	TNF- ilişkili apoptoz-indükleyen ligand
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Reseptör tirozin kinazlar 5
Şekil 1.2. P-glikoprotein yapısı 10
Şekil 1.3. Apoptotik hücre morfolojisi 13
Şekil 1.4. Apoptotik sinyal iletim yolu aktivasyonu 15
Şekil 1.5. Memelilerde otofaji regülasyonun moleküler mekanizması 21
Şekil 1.6. Kanser hücrelerinde nekroptoz ve apoptozun morfolojik özellikleri . 26
Şekil 1.7. Kromozom uçlarında bulunan telomer yapısı 29
Şekil 1.8. Telomeraz holoenzimi 30
Şekil 1.9. Telomer uzunluklarının mikroskobik görüntüleri 31
Şekil 1.10. MDA-MB-231 hücre morfolojisi 36
Şekil 1.11. MCF-7 hücre morfolojisi 37
Şekil 1.12. *Lotus corniculatus L.* bitkisi ve tohum tanesi 40
Şekil 1.13. *Coronilla varia L.* bitkisi ve tohum tanesi 42
Şekil 2.1. Polifenollerin hücre döngüsü düzenleyici proteinler üzerindeki etkisi 47
Şekil 4.1. *Lotus* EA, MeOH ve su ekstraktlarının pUC19 plazmit DNA'sını fenton karışımına karşı koruma aktivitesi 66
Şekil 4.2. *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarının pUC19 plazmit DNA'sını fenton karışımına karşı koruma aktivitesi 67
Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücresi canlılık testi sonucu 69
Şekil 4.4. MCF-7 hücresi canlılık testi sonucu 70
Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücreleri *Lotus (L.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri 71
Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücreleri *Coronilla (C.)* EA, MeOH ve su ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri 72
Şekil 4.7. MCF-7 hücreleri *Lotus (L.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri 74
Şekil 4.8. MCF-7 hücreleri *Coronilla (C.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri 76
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücreleri *Lotus* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri 78
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücreleri *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri 79
Şekil 4.11. MCF-7 hücreleri *Lotus* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri 81

Şekil 4.12. MCF-7 hücreleri *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri 82
Şekil 4.13. *Lotus* EA ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücreleri apoptotik DNA fragment analizi 84
Şekil 4.14. *Coronilla* su ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücreleri apoptotik DNA fragment analizi..... 85
Şekil 4.15. *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri 87
Şekil 4.16. *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri 89
Şekil 4.17. *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri 91
Şekil 4.18. *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri 93

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Kanserogenezde rol alan oksidatif stresin başlıca eksojen nedenleri 8
Tablo 1.2. Programlanmış hücre ölümleri (apoptoz-otofaji) karşılaştırması 24
Tablo 3.1. DNaz reaksiyon bileşenleri ve miktarları 57
Tablo 3.2. Komplementer DNA sentezi bileşenleri 58
Tablo 3.3. PZR reaksiyon koşulları ve sıcaklıkları 59
Tablo 3.4. PZR reaksiyonu için gereken bileşen ve miktarları 59
Tablo 3.5. PZR reaksiyonu için kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları.. 60
Tablo 3.6. Eş zamanlı PZR için kullanılan maddeler ve miktarları 61
Tablo 3.7. Eş zamanlı PZR reaksiyonu şartları 61
Tablo 4.1. *L. corniculatus* etil asetat (EA) ekstraktının kimyasal içerik profili . 95
Tablo 4.2. *L. corniculatus* metanol (MeOH) ekstraktının kimyasal içerik profili 97
Tablo 4.3. *L. corniculatus* su ekstraktının kimyasal içerik profili 99
Tablo 4.4. *C.varia* etil asetat (EA) ekstraktının kimyasal içerik profili..... 101
Tablo 4.5. *C.varia* metanol (MeOH) ekstraktının kimyasal içerik profili 104
Tablo 4.6. *C.varia* su ekstraktının kimyasal içerik profili 107

1. GİRİŞ

Kanser, klinik belirtileri ortaya çıkmadan evvel uzun bir geçmişi olan kronik bir hastalıktır. 1775 yılında başlayan kanser çalışmaları, ilk olarak kanser hücrelerinin neoplastik özelliklere sahip olduğunun saptanmasıyla ortaya çıkmıştır. Neoplazma, basitçe normal hücrelerin malign (kötü huylu) tümör veya kanserli hücrelere dönüşümüyle meydana gelen transformasyondur [1]. Kanser, genel olarak normal hücrelerin gen ifadelerinde meydana gelen anormal değişimlerle hücrelerin diğer organ ve dokulara metastaz yoluyla yayılım göstermesidir [2].

Çeyrek asır süren hızlı gelişmelerden sonra, kanser araştırmaları kanserin genomda dinamik değişimler içeren bir hastalık olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanser hücre genotiplerinin birçoğunu kapsayan ve malign büyümeyi dikte eden kanserin hücre fizyolojisindeki 6 temel özelliği; büyüme sinyallerini kendi büyümesi için yeterli hale getirmesi, büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsız olması, apoptozdan kaçması, sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli olarak anjiyogenez (yeni kan damarları oluşturma kapasitesi) ve doku invazyonu ve metastaz yapmasıdır [3].

Kanser, ölümcül hastalıklar arasında yer aldığı için araştırma sahasında önemli bir yere sahip olmuştur. Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de görülme sıklığı artan kanser hastalığı, Ulusal Hastalık Yükü ve Maliyet Etkililik Çalışması ve Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) ölüm nedeni istatistiklerine göre kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır [4].

Kötü huylu tümör, karmaşık bir gelişimle insan vücudunu ele geçirdiği için tedavi için farklı alternatiflere yönelim gerçekleşmiştir. Tıbbi ve aromatik bitkiler bunlar arasındadır. Bu bitkilerin sekonder metabolitlerinden üretilen ilaçlar tedavide kullanılmak üzere önemli bir hammadde haline gelmiştir. Sekonder metabolitler, primer mtabolitlerden farklı olarak bitkinin büyüme ve gelişimde rol oynayan maddelerin dışında hayatta kalmasını devam ettiren maddelerin üretiminden sorumlu metabolitlerdir. Familya ve tür bazında dağılım göstermek koşuluyla bitkilerden asıl şifanın alındığı kısmı, bu metabolitler oluşturur. Fitokimyasal olarak adlandırılan bu metabolitler, alkaloid, glikozit, polifenoller, saponinler, terpenler ve antrakinonlar

olarak sınıflandırılabilirler [5]. Fitokimyasallar arasında, flavonoidler en iyi bilinenlerdir ve kimyasal olarak, heterosiklik bir piren halkası ile bağlanmış iki benzen halkası içeren onbeş karbonlu bir iskeletten oluşur. Flavonlar (flavon, apigenin ve luteolin vb.), flavonoller (quercetin, kaempferol, myricetin ve fisetin vb.), flavanonlar (flavanon, hesperetin ve naringenin vb.), flavanonol (taxifolin), izoflavonlar (genistein, daidzein) ve flavan-3-ol (kateşin, epicatechin) olarak sınıflandırılırlar [6].

Bitkilerden elde edilen bu hammaddelerin ilaç olma potansiyelleri ile ilgili çalışmalara olan ilgi çarpıcı bir şekilde bir şekilde artış göstermiştir. Özellikle, kanser kemoterapi ilacı olabilmesi yönündeki moleküler çalışmalar hız kazanmıştır. Kanser tedavisinde en önemli sorun kemoterapi ilaçlarının direncidir. Bununla başa çıkabilmek için araştırmacılar, düşük toksisite ve maksimum etki ile doğal kökenli bileşikler üzerinde çalışmaya başlamışlardır.

Bu çalışmada, Fabaceae familyasına ait iki bitki türü olan *Lotus corniculatus L.* ve *Coronilla varia* bitki ektraktlarının oksidatif strese karşı DNA koruma özellikleri ile MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin moleküler seviyede analiz edilmesi ve anti-metastatik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Kanser Moleküler Biyolojisi

1.1.1. Kanser Genleri

Kanser gelişim sürecinde değişime uğrayan üç çeşit hücresel gen vardır. Bunlar; “onkogenler” adı verilen pozitif büyüme düzenleyicileri, “tümör baskılayıcı genler” olarak adlandırılan negatif düzenleyiciler (p53, Rb ve p21) ve stabilite genleridir [7]. Hücresel onkogenlerin varlığı, ilk olarak retrovirüslerin çalışılmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Özellikle tümör baskılayıcı genler, DNA tümörü ile etkileşimleriyle bilinen virüslerdir [8]. Onkogen aktivasyonları, kromozomal translokasyonlardan, gen amplifikasyonlarından veya gen ürünün aktivitesini düzenleyen kritik noktaları etkileyen gen içerisindeki mutasyonlardan kaynaklanabilir. Tümör baskılayıcı genler, genetik değişiklikler ile tersinir çalışırlar yani, mutasyonlar, gen ürününün

aktivitesini azaltır. Bu tür inaktivasyonlar, proteolizle değişime uğrayan bir proteinin sebep olduğu mutasyonlardan, bazı delesyonlardan, insersiyonlardan veya epigenetik susturmadan kaynaklanır. Onkogen ve tümör baskılayıcı gen mutasyonlarının hepsi fizyolojik seviyede birlikte çalışırlar. Hücre döngüsünün tutulmasını veya hücre ölümünü inhibe ederek, hücre çoğalmasını stimule ederek neoplastik sürecin gelişmesine sebep olurlar. Böylece anjiyogenez mekanizması geliştirerek hücrelerin apoptozdan kaçmasına sebep olurlar. Stabilite genleri olarak adlandırılan üçüncü kanser genleri sınıfı ise, mutasyona uğradığında genlerde farklı bir yolla tümör oluşuma sebep olur. Bu sınıf, normal DNA replikasyonu sırasında yapılan veya mutajenlere maruz kalmanın sebep olduğu hataların onarımından sorumlu olan yanlış eşleşme onarımı (mismatch repair) (MMR), nükleotit-eksizyon onarımı (NER) ve baz eksizyon onarımı (BER) genlerini içerir. Diğer stabilite genleri, mitotik rekombinasyondan ve kromozomal ayrılmadan sorumlu olan işlemleri kontrol eder [7].

Kanserin somatik genetik değişikliklerden kaynaklandığına dair ilk kanıt Burkitt'in lenfoma çalışmalarından sonra ortaya çıkmıştır. Burkitt'in lenfoma, onkogeni aktive eden bir kromozomal translokasyona sahip olduğu gösterilen ilk tümörlerden biri olan, virüs (HIV) ile ilişkili olan ilk insan tümörüdür (MYC onkogeni ile ilişkili olduğu gösterilmiştir) [9, 10].

Kanserin genetik alterasyonlar sonucu ortaya çıktığını gösteren ikinci kanıt ise fare fibroblastlarıyla yapılan transfeksiyon deneyidir. Bu fibroblastlar insan kanser hücrelerinin DNA'sı ile *in vitro* transfekte edildiğinde hücrelerin malign özellik kazandığı görülmüştür. Daha sonra transforme olan DNA'ların RAS onkogenine dönüştüğü görülmüştür. Bu onkogen, RAS onkogenik proteinin transforme özelliğini aktifleştiren mutasyonlar taşır [9, 11, 12].

Üçüncü kanıt, foliküler lenfomanın karakteristik özelliği olan kromozomal noktaların B-hücresi lenfomalarıyla ilişkili olduğunu gösteren *Bcl-2* onkogeninin ortaya çıkmasıdır. *Bcl-2*'nin aşırı derecede ifade olmasına sebep olan bir kromozom translokasyonu sonucu *Bcl-2* onkogeni oluşmuştur [9, 13, 14].

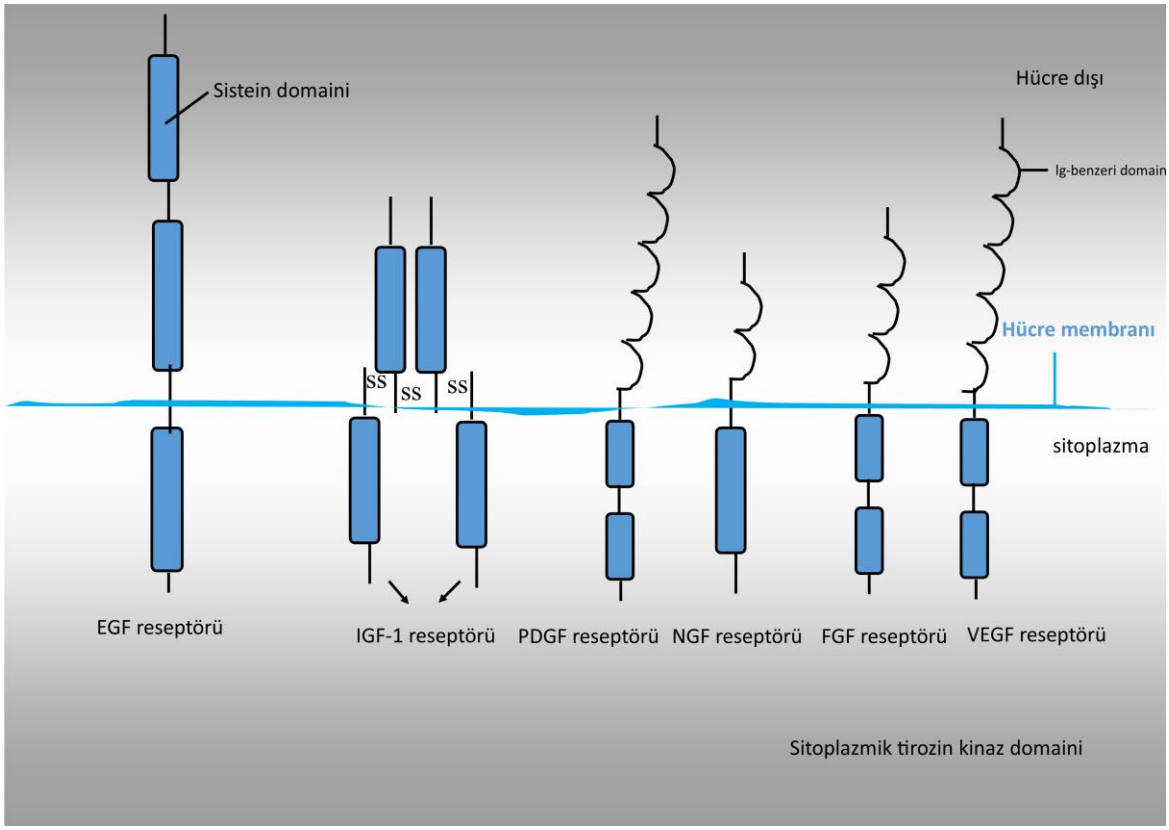
Dördüncü kanıt ise onkogen taşıyan transgenik farelerde insan tümörlerine benzeyen kanserlerin gelişmiş olmasıdır. Uygun koşullar altında, transgenik farelerde *c-myc* geninin aktivasyonu, hücreyi kritik bir büyüme faktörüne bağımlı hale getirmek ve böylece çoklu neoplazmalar geliştirerek onu malign hücreye dönüştürmek için yeterli olabilir [9]. "c-myc" geni, antikor üreten B lenfositlerin tümörü olan insan Burkitt lenfoması ve fare plazmasitomları ile ilişkilidir [15].

Onkogenler, hücre çoğalmasını, apoptozu veya her ikisini kontrol eden proteinleri kodlar. Onkogen ürünleri, transkripsiyon faktörleri, kromatin remodeller, büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal iletim mekanizmaları ve apoptoz düzenleyicileri olarak altı geniş gruba ayrılabilir [9]. Örneğin, Fos transkripsiyon proteini, AP1 (aktivatör protein 1) transkripsiyon faktörünü oluşturmak için Jun transkripsiyon faktörü ile dimerize olur ve bu kompleks, hücre bölünmesini kontrol eden birkaç genin ekspresyonunu arttırır [16].

Büyüme faktörü geninin aktivasyonu da malign transformasyona katkıda bulunabilir. Trombositleşmiş büyüme faktörü (PDGF) α ve β zincirlerinden oluşur ve pıhtılaşma sırasında trombositlerden salınır, bu büyüme faktörü çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu indükleyebilir ve yara iyileşmesine katılmak için fibroblastları uyarabilir [9].

Birçok onkogen, sinyal iletim yolaklarının üyelerini kodlar. Bunlar, reseptör olmayan protein kinazlar ve guanosin-trifosfat bağlayıcı proteinler olmak üzere iki ana gruba ayrılır [17, 18]. Reseptör olmayan protein kinazlar tirozin kinazlar (ABL, LCK ve SRC), serin ve treonin kinazlar (AKT, RAF1, MOS ve PIM1) olarak iki tiptedir. Aktive edici mutasyonları taşıyan sinyal iletim proteinleri mutasyonlardan dolayı onkogenik hale gelirler. Buna en önemli örnek PI3K'dır ve onun tirozin kinaz sinyal yolu iletim mekanizması için kritik rolü olan ve kanserde mutasyona uğrayan AKT ve SGK gibi alt sınıflarıdır. Kanserde PI3K, hücrenin sağ kalımında görev alarak hücreyi apoptozdan korur. Şekil 1.1.'de insan kanserlerine sebep olan reseptör tirozin kinaz büyüme faktörleri gösterilmiştir [9]. Birçok tümörde, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteini olan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) ligand bağlama bölgesinin delesyona uğraması, ligand bağlanmasının

yokluğunda reseptörün aktivasyonuna sebep olur [19]. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ise gen transkripsiyonunun hipoksiye bağlı kontrolünü düzenler [9].



Şekil 1.1. Reseptör tirozin kinazlar

1.1.2. Kanser Biyokimyası ve Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü

Kanser gelişimi kalıtım yoluyla ve çevresel yolla olmak üzere iki türde meydana gelir. Çevresel olarak maruz kalınan kimyasal etkenler kanserin gelişim sürecini genetik faktörler kadar etkilemektedir.

Sağlıklı bir hücrenin kimyasal maddelerden dolayı kanserli hücreye dönüşmesi "kimyasal karsinogenez" olarak adlandırılır. 1775 yılında ilk kez Sir Percival Pott tarafından ortaya çıkan bu tanım, baca temizleyicilerinde is ile alakalı bir kanser olan skrotal kanserinin görülmesiyle belirtilmiştir [20].

Kimyasal maddeler doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı yolla karsinogenez gelişimini tetikler. Örneğin, dimetil sülfat, benzil klorür ve hardal gazı gibi maddeler direkt olarak kanserleşme sürecine katkıda bulunurken benzen, diallil sülfit ve vinil

klorür gibi maddelerin kansere sebep olması için dolaylı yolla önce aktif metabolitlere dönüştürülmesi gereklidir [21].

Metabolik aktivasyonlar vücutta bulunan faz I ve faz II enzimleri tarafından oluşturulmaktadır. Alınan antikanser ilaçlar, hücrenin endoplazmik retikulumunda bulunan bu enzimler tarafından metabolize edilmektedir. Faz I enzimleri sitokrom p450 enziminin birçok izoformunu (CYP2E1, CYP1A1, CYP17) içermektedir. Bu enzim tarafından metabolize edilen yabancı maddeler, karaciğerde detoksifikasyonla polar maddelere dönüştürülerek kolayca atılırlar. Bazı sitokrom p450 ve detoksifikasyon enzimleri polimorfizm yoluyla karsinogeneze katkıda bulunabilir. Yüksek dozda kemoterapi veya radyasyon alarak meme kanseri tedavisine yanıt verdiği görülen bazı kadınlarda yapılan çalışmalara bakıldığında, GSTM1- ve GSTT1 (Glutatyon S-Transferazlar) enzimlerine sahip olduğu, bu enzimleri kodlayan lokuslarının mutasyona uğraması sonucu genotiplerinin tedaviye direnç gösterdiği düşünülmüştür [22].

Epigenetik kanserojenler, kriptojenik olarak transforme olmuş hücrelerden veya direkt olarak neoplazi aktivitesiyle kanser gelişimine katkıda bulunurlar. DNA-reaktif kanserojenlerin çoğu organik sentetik kimyasallar veya doğal olarak oluşan maddelerdir. Epigenetik kanserojenler ise büyük ölçüde sentetik pestisitler, gıda katkı maddeleri ve ilaçlardır. DNA reaktif kanserojenler yapılarında reaktif elektrofilik gruplara sahiptir veya elektrofilik reaktiflerle biyoaktif hale gelebilirler. Epigenetik karsinojenler, elektrofil oluşturmak için gereken moleküler yapılardan yoksundur. Genellikle biyotransformasyondan sonra, neoplazide artmaya neden olan hücresel etkileri ortaya çıkaran çok çeşitli yapılara sahiptirler [23]. Epigenetik ajanlar, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit ve DNA'yı modifiye etme potansiyeline sahip olan lipit peroksidasyon ürünleri gibi hücre içi reaktif türleri arttırarak transformasyona sebep olabilirler [23, 24].

Son zamanlarda, serbest radikallerin, özellikle oksijen radikallerinin, karsinojenezin gelişiminde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bilimsel çalışmalar, doğrudan serbest radikalleri temizleyen veya serbest radikal aracılı olayların oluşumunu engelleyen antioksidanların neoplastik süreci engellediğini ortaya

koymuştur. Serbest bir radikal, bağımsız varolma yeteneğine sahip, bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren bir türdür. Serbest radikallerden biri olan oksijen radikalleri, süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri ve peroksil radikalleri olmak üzere üç gruba ayrılır. Çeşitli kanserojenlerin metabolizmasında oksidatif yolaklardaki bir elektron, organik oksi veya peroksi radikallerinin oluşumuna, dolayısıyla indirgenmiş oksijen türlerinin oluşumuna yol açar [25]. Bu aktif oksijen türleri hücrelere ciddi bir tehdit oluşturur ve hücresel hasar, doku hasarı, DNA modifikasyonu ve birçok hastalığa sebep olur [26]. Oksidatif strese maruz kalan memeli hücrelerde mutagenezin arttığı ve ROS'un p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara neden olduğu bulunmuştur [27]. Tablo 1.1.'de kanserojenezde rol alan oksidatif stresin başlıca eksojen nedenleri gösterilmiştir.

Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun meme kanseri etiyolojisine bağlı olduğuna dair doğrudan kanıtlar vardır. Birçok kanserli dokuda DNA bazlarının oksidatif hasarının arttığı tespit edilmiştir. Serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarı, baz hasarı, tek iplikçik kırılmaları, çift iplikçik kırılmaları, DNA arasında çapraz bağlanma ve kromozomal aberasyon şeklinde ortaya çıkmaktadır [27].

Tablo 1.1. *Kanserogenezde rol alan oksidatif stresin başlıca eksojen nedenleri*

Oksidatif stres	***Serbest radikal çeşidi***	***Kanser türü***
Sigara dumanı	NO-, -OH	Bronkojenik karsinoma
Ultraviyole ışınlar	-OH, organik radikaller	Melanoma ve diğer deri kanseri türleri
Gıdalardaki yağ asitleri	Lipit peroksitleri	Kolorektal kanseri, meme kanseri
Demir ve bakır iyonları	-OH	Kolorektal kanseri
Etanol	Lipit peroksitleri	Hepatoselüler karsinoma, meme kanseri

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve ayrıca Fenton reaksiyonu ile ortaya çıkan ağır metalleri içeren çevresel toksik ajanlar, DNA hasarına ve dolayısıyla mutasyonlara neden olur. Şelatlı demir kompleksleri, süperoksit anyon ve hidrojen peroksitin hidroksil radikal gruplarına dönüştürülmesi Fenton reaksiyonunun oluşumunu katalize edebilir ve hidroksil radikal, lipit peroksidasyonunu başlatır. Fenton reaktifi, DNA, lipid ve proteinler gibi hücresel bileşenlere zarar veren oldukça zararlı hidroksil radikallerini üretir [28, 29].

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\cdot}OH$ (Fenton reaksiyonu)

1.1.3. Kanserde İlaç Direnç Mekanizmaları

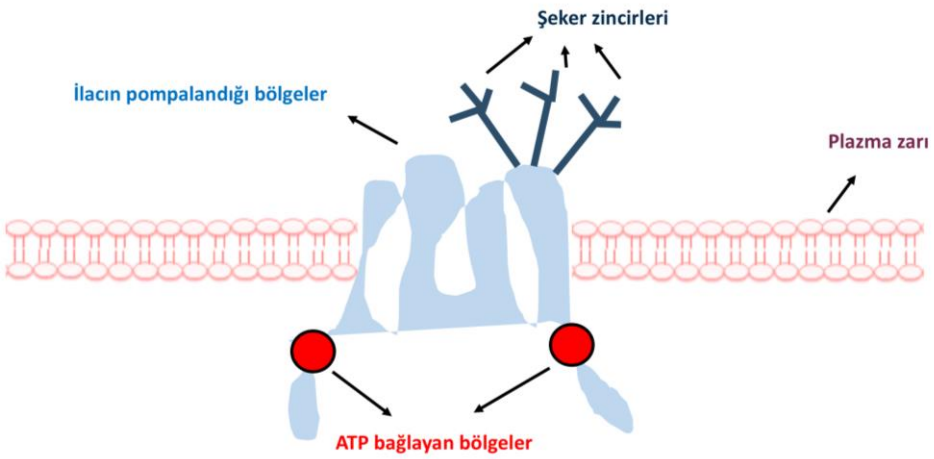
Genel olarak, kanserin kemoterapiye yanıt vermemesinin iki nedeni olabilir. Bunlar epigenetik değişiklikler veya konakçı diğer faktörler olabilir. Konakçı faktörler, düşük serum seviyesi, zayıf emilim veya hızlı metabolizma sebebiyle ilacın dışarı atılımı; ilacın özellikle yaşlı hastalarda dozu optimal seviyelerin altına düşürme ihtiyacı ve asıl tümör bölgesine ilacın ulaşamaması (monoklonal antikorlar ve immünotoksinler gibi yüksek molekül ağırlığı olup düşük penetrasyon özellikteki biyolojik ajanlar) olarak sayılabilir [30, 31].

Son 50 yıldır araştırmacılar, kültürde büyüyen kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara nasıl dirençli hale geldiğini çeşitli mekanizmalarla ortaya koymuşlardır. Kültürlenmiş kanser hücrelerinde çoklu ilaca direnç mekanizmasının temel sebebinin, alternatif olarak P-glikoprotein (P-gp) veya çoklu ilaç taşıyıcısı olarak bilinen enerjiye bağlı bir ilaç akışı pompasının olduğu ortaya çıkarılmıştır [30]. İnsandaki MDR1 gen ürünü ve farede mdr1a ve mdr1b olarak bilinen bu akış pompası, ATP'ye bağlı taşıyıcı ailenin ABC (ATP Binding Cassette) kasetidir. İnsan MDR1 gen ürünü ve insanda bilinen 48 ABC taşıyıcısından biri olan P-gp, her biri altı transmembran alanı içeren iki ATP bağlayıcı kaset ve iki transmembran bölgesinden oluşan 170 kDa moleküler ağırlıklı bir fosfoliglikoproteindir. Şekil 1.2.'de P-gp'nin yapısı gösterilmiştir [30, 32].

P-gp, plazma membranına girerken çok çeşitli hidrofobik doğal ürün ilaçlarını algılayabilir ve bağlanabilir. Doksorubisin, daunorubisin, vinblastin, vinkristin ve taksol gibi antikanser ilaçlar bu doğal ilaçlar arasındadır. Bu ilaçların bağlanması, ATP bağlayıcı alanlardan birinin aktivasyonu ile sonuçlanır ve ATP'nin hidrolizi, P-gp'in şeklinin değişimiyle ilacın hücre dışı boşluğa salınması ile sonuçlanır (toksik maddeler P-gp sayesinde hücre dışına pompalanır) [33]. İkinci bir ATP molekülünün hidrolizi, taşıyıcı maddeyi orijinal durumuna geri döndürmek için gereklidir, böylece ilaç bağlama ve salınma döngüsü tekrarlanabilir hale gelir [34, 35].

İlaç akış mekanizmalarındaki değişiklikler, çoklu ilaç direncinin sonucudur. P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1) ve meme kanseri

direnç proteini gibi ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerinin aşırı ekspresyonu bunlar arasındadır [36]. ABC taşıyıcıları, antikanser ajanları hücre içi ortamdan hücre dışı matris içine pompalayarak etki eder. P-gp substratları antrasiklinleri, taksanları, antimetabolitleri ve vinka alkaloitlerini içerir. Meta analiz hesaplarına göre 31 meme kanseri hastalarında yapılan klinik çalışmalarda P-gp'nin aşırı miktarda eksprese olduğu ve hastaların kemoterapiye cevap vermeme riskinin 3 kat arttığı görülmüştür [37]. MRP1'in antrasiklinlere ve vinka alkaloidlerine direnç gösterdiği, ancak taksanlara direnç göstermediği gösterilmiştir [38].



Şekil 1.2. P-glikoprotein yapısı

P-gp'den dolayı ortaya çıkan ilaç direncinin tersinir edilmesi için araştırmacılar P-gp inhibitörlerine yönelmişlerdir. İnhibisyon mekanizması üç farklı yolla gerçekleşmektedir; (1) substrat bağlanma bölgelerinin yarışmalı, yarışmasız veya allosterik olarak bloke edilmesi, (2) ATP hidrolizine müdahale edilmesi, ve (3) hücre membranı lipidlerinin bütünlüğünün değiştirilmesidir [39]. Kuersetin gibi ATP hidrolizini inhibe eden bileşikler, P-gp tarafından taşınmadıkları ve bağırsak lümeninde lokal olarak daha düşük bir konsantrasyonla etki mekanizması gerçekleştireceklerinden P-gp inhibitörleri arasındadırlar [40].

İlaç dirençlerinin oluşumuna sebep olan P-gp dışındaki mekanizmalar, hücresel düzeyde, adenosin-trifosfat- (ATP-) bağımlı taşıyıcılar, sitokrom p450 gibi detoksifiye edici proteinlerin aktivasyonu, ilacın sebep olduğu DNA hasarını tamir

eden mekanizmaların aktivasyonu ve apoptotik sinyal yolaklarında bozulmalar olarak sayılabilir. Örneğin, Glutatyon ve glutatyon S-transferaz, alkilleyici ajanların ve sisplatinin detoksifikasyonunda rol oynar, bu nedenle etkinliklerinde değişim gerçekleşmesi, bu bileşiklere karşı direnci etkileyebilir [38, 41]. DNA onarımında rol alan veya ilaç hassasiyetini etkileyen enzimlerdeki değişiklikler de ilaç direncine sebep olabilir. Örneğin, DNA replikasyonu ve onarımında rol oynayan kritik bir enzim olan topoizomeraz II'nin ekspresyonunun veya fonksiyonunun azalması, antrasiklinler ve epipodofilotoksinler gibi maddelere karşı direnç sağlayabilir. Ayrıca, topoizomeraz II enzim aktivitesini bloke eden etoposid ilacına karşı da mutasyonların etkisiyle hücreleri duyarsız hale gelir [42]. DNA uyumsuzluğu onarımına ek olarak, hücresel hasarı düzenleyen değişimler de ilaç direncine katkıda bulunabilir. Apoptozun önemli bir düzenleyicisi olan tiyol proteaz kaspaz-3 düzeylerinin, normal doku ile karşılaştırıldığında meme kanserinde anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu artış düzeyi, siklofosfamid içeren kemoterapiye direnç ile korelasyon göstermektedir. MDR (Multi Drug Resistance), hücrelerin DNA hasarı veya diğer hücresel hasarı takiben apoptoz geçirememesinden kaynaklanabilir [42]. Birçok meme kanseri hücre hattında p53 tümör baskılayıcı genin mutasyona uğradığı ve bu mutasyon türünün meme kanserinde doksorubisin ilacına karşı direnç göstermesiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir [42, 43]. *Bcl-2* ve *bcl-x* gibi apoptotik yolu düzenleyen diğer genlerdeki değişiklikler de tübülin inhibitörlerine (Taxol ilacı türevleri) karşı direnci artırabilir [44].

Bazı flavonoidlerin, P-gp, MRP1 ve MRP2 gibi ABC taşıyıcıları ile etkileşime girdiği ve yarışmalı bir şekilde taşıyıcıları inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu bağlamda, genistein, naringenin, akasetin, kaempferol, kuersetin ve ksavopiridol gibi flavonoidlerin önceki çalışmalarda BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) aracılı ilaç direncine karşı tersinir etki gösterdiği anlaşılmıştır [45-47].

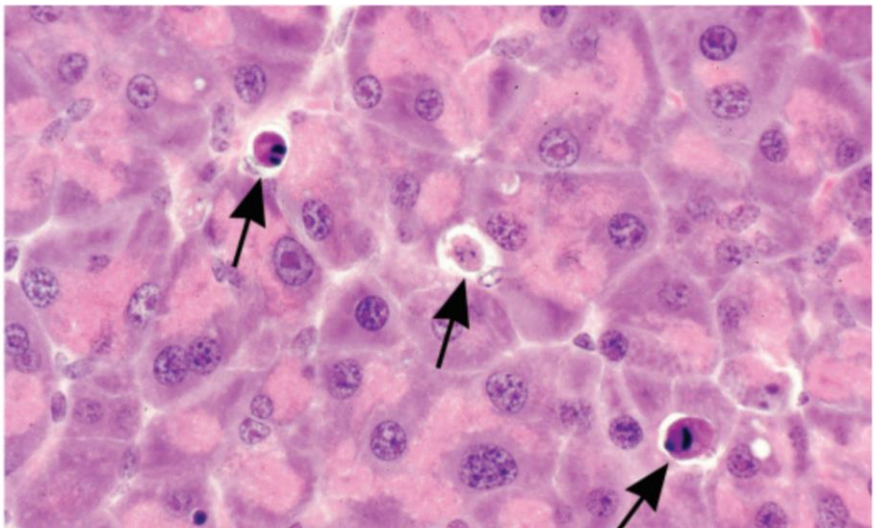
1.2. Kanserde Hücre Ölüm Modları

1.2.1. Apoptoz

Apoptoz kavramının bileşenleri yıllar önce tanımlanmış olmasına rağmen, apoptoz terimi (a-po-toe-sis), morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü olarak ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır [48]. Memeli hücrelerinde apoptoz sürecinde yer alan mekanizmaların anlaşılması, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın embriyonik gelişimi sırasında ortaya çıkan programlanmış hücre ölümünün araştırılmasından doğmuştur. Bu organizmada 1090 somatik hücreler, yetişkin kurtçuk oluşumunda üretildiği; bunlardan 131 tanesinin apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü" geçirdiği anlaşılmıştır. Apoptoz, o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak elimine edilmesini içeren "programlanmış" hücre ölümünün farklı ve önemli bir modu olarak tanımlanmış ve kabul edilmiştir [48, 49]. Apoptoz normal gelişim ve yaşlanma sırasında meydana gelir ve dokularda homeostazisi sağlar. Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda veya hücreler zarar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, tüm hücrelerin mutlaka aynı uyarıcıya yanıt olarak ölmesi gerekmez. Kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar veya radyasyon bazı hücrelerde DNA hasarına sebep olur, bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme neden olabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, diğer hücreler etkilenmeden bazı hücrelerde apoptotik ölüme yol açabilir (örneğin timositler) [48].

Apoptozda meydana gelen morfolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu sayesinde tanımlanmıştır [50]. Apoptozisin erken evresinde hücre öncelikle küçülmeye ve pinoz olmaya başlar, hücre büzülmesiyle, hücreler daha küçük, sitoplazma yoğun ve organeller daha sıkı paketlenmiş olarak görülür. Apoptozisin en karakteristik özelliği pinozdur ve kromatin kondensasyonu sonucu meydana gelir. Hematoksilen ve eozin boyası ile yapılan histolojik incelemede apoptoz, tekli hücreleri veya küçük hücre kümelerini içerir. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazmaya ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanlarına sahip yuvarlak veya oval bir kütle olarak görünür. Şekil 1.3.'te B6C3F1 faresinden elde edilen ekzokrin

pankreasın bir kısmının hücre morfolojisi gösterilmektedir. Çekirdekler pinotikleşmiştir ve parçalanmıştır, inflamasyon görülmemiştir [48].



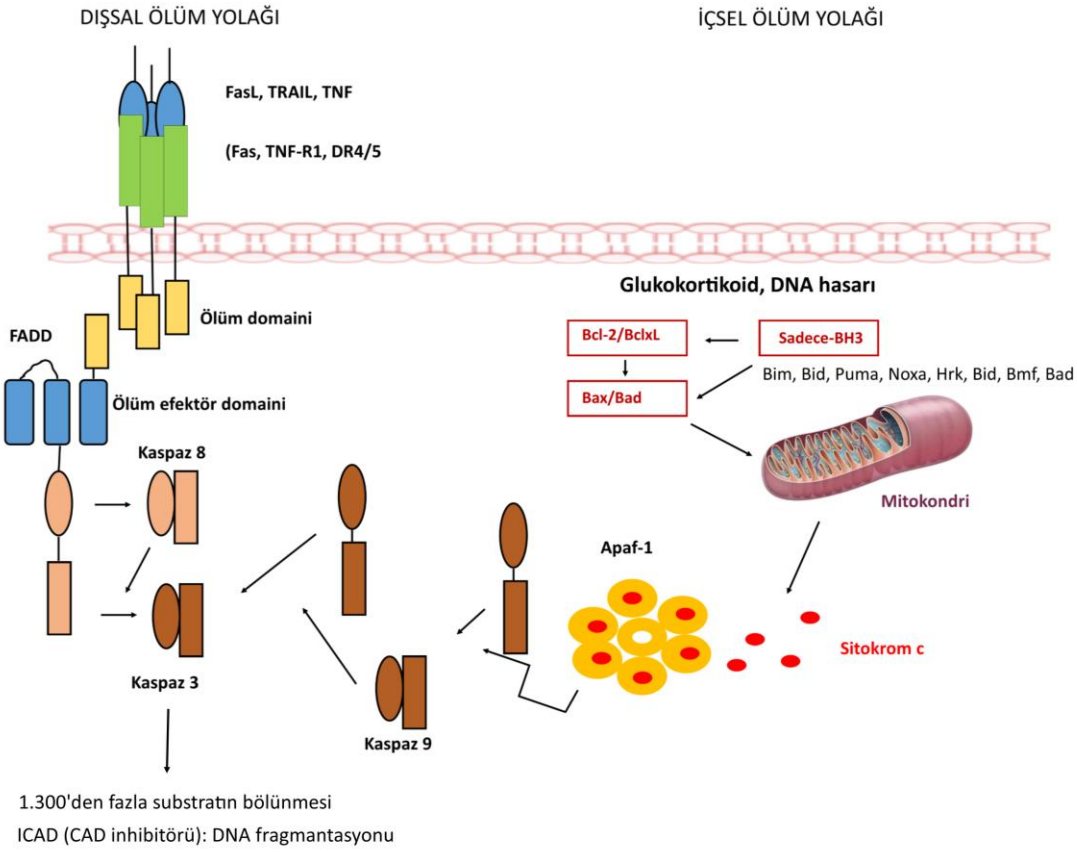
Şekil 1.3. Apoptotik hücre morfolojisi

Apoptoz mekanizması, enerjiye bağlı moleküler olaylar dizisini içeren oldukça karmaşık bir olaydır. Apoptoza, kaspaz 3 veya 7 gibi spesifik hücre ölümünden sorumlu kaskadlar aracılık eder. Kaspazlar, hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) uyaran proteazlardır. Zimojenler olarak sentezlenir. İki pozisyondaki spesifik ayrılmalar, N terminalindeki prodomain'i uzaklaştırır ve iki büyük ve iki küçük alt birimden ($a_2\beta_2$) oluşan aktif bir enzim oluşturur. İnsanlarda 12 farelerde 11 tane kaspaz vardır. Bir grup kaspaz (insan kaspazları 2, 3 ve 6-10) apoptoza, diğer grup (insan kaspazları 1, 4 ve 5) inflamasyona neden olan piroptoza aracılık eder [51].

Şekil 1.4.'te görüldüğü gibi, memeli sistemlerinde içsel ve dışsal olmak üzere iki apoptoz yolağı tanımlanmıştır. Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan içsel yolak, gelişimsel olarak kontrol edilen ve genotoksik ajan aracılı apoptozda çalışır ve *Bcl-2* aile üyeleri tarafından düzenlenir [51, 52]. *Bcl-2* ailesi, tek-BH3 üyeler (*Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf* ve *Bad*), proapoptotik efektör molekülleri (*Bax* ve *Bak*) ve antiapoptotik *Bcl-2* ailesi proteinleri (*Bcl-2, Bcl-xL, Mc1, A1* ve *Bcl-B*) olmak üzere üç alt aileden oluşur [52]. Sağlıklı hücrelerde, *Bax/Bak*, antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri tarafından tutulur (arrested). Bir apoptotik uyarıcıya (gelişimsel işaret,

büyüme eksikliği veya hayatta kalma faktörü veya genotoksik ajan) cevap olarak, tekli-BH3 üyeleri transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel olarak yukarı doğru regüle edilir. Tekli-aktif BH3 proteinleri *Bak* ve *Bax*'a etki ederken antiapoptotik *Bcl-2* aile üyelerini antagonize eder. *Bax* ve *Bak* daha sonra sitokrom c'nin mitokondriden salınımını uyarır ve sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte, dATP/ATP'ye bağımlı bir şekilde apoptozom denilen heptametrik bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, monomerik pro kaspaz 9'u devreye sokar ve daha sonra aktif bir heterotetramerik kompleks oluşturmak üzere otokatalitik bölünmeye maruz kalan bir dimer oluşturmasına yardımcı olur. Aktif kaspaz 9 da daha sonra kaspaz 3'ü kesip aktive eder. Böylece apoptoz uyarılmış olur [53].

Ekstrinsik apoptoz yolağı, TNF (FasL, Fas ligand; TNF-a, tümör nekroz faktörü; TRAIL, TNF ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand) ailesinin ölüm faktörleri tarafından uyarılır. Bu faktörler, homotrimerik bir yapıya sahip tip II membran proteinleri olarak sentezlenir ve çözünür bir form oluşturmak için zardan ayrılabilir. TNF-α, ağırlıklı olarak ADAM17 (bir disintegrin ve metaloproteaz) veya TACE (TNF-α dönüştürücü enzim) olarak adlandırılan bir metaloproteaz ile parçalanırken, FasL, ADAM10 ile bölünür. [51].



Şekil 1.4. Apoptotik sinyal iletim yolu aktivasyonu (kaspaz-bağımlı)

Dışsal ve içsel ölüm yolakları, apoptoziste ölüm yolağının son adımında kaspazlarla birleşirler. Bu ölüm kaspazları, nükleer maddeyi parçalayan sitoplazmik endonükleaz ve nükleer ve hücre iskeleti proteinleri parçalayan proteazları aktive eder. Efektör veya "uygulayıcı" kaspazlar olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7; sitokeratinler, PARP, plazma zarı hücre iskeleti proteini alfa fodrin, nükleer protein NuMA ve diğerleri de dahil olmak üzere çeşitli substratları parçalayarak morfolojik ve apoptotik hücrelerde görülen biyokimyasal değişikliklere sebep olurlar. Kaspaz-3, efektör kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspazların herhangi biri tarafından aktive edilir (kaspaz-8, kaspaz-9 veya kaspaz-10). Kaspaz-3 spesifik olarak endonükleaz CAD'i aktive eder. Proliferatif hücrelerde CAD, inhibitörü ICAD ile kompleksleştirilir. Apoptotik hücrelerde, aktif kaspaz-3, CAD'in salınması için ICAD'ı parçalamaktadır. Daha sonra CAD çekirdeğin içindeki kromozomal DNA'yı bozar ve kromatin kondensasyonuna neden olur. [48].

Yetişkin insan vücudunda homeostazı sürdürmek için ve apoptozla ölenleri dengelemek için her gün yaklaşık 10 milyar hücre üretildiği tahmin edilmektedir [54]. Normal gelişim, yaşlanma veya hastalık sırasında apoptoz arttığında bu sayı önemli ölçüde artabilir. Çok az veya çok fazla hücre ölümü, gelişimsel bozukluklar, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon veya kanser dahil olmak üzere birçok bozukluk vücutta patolojiye neden olacağından apoptozisin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekir [48].

Tümör hücreleri, *Bcl-2* gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu veya *Bax* gibi pro-apoptotik proteinlerin aşağı regülasyonu veya mutasyonu ile apoptoza direnç kazanabilir. Hem *Bcl-2* hem de *Bax* ekspresyonu, *p53* tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlenir [55]. İnsan B hücre lenfomasının bazı formları aşırı *Bcl-2* ekspresyonuna sahiptir ve bunun, hücre ölümünü engellendiği ve kansere katkıda bulunduğu gösterilmiştir [56].

Apoptoz deteksiyonu yöntemleri 5 başlık altında toplanabilir [48];

1. Hücre morfolojisindeki değişiklikler
2. DNA fragmentasyonu
3. Kaspazların, parçalanmış substratların, regülatörlerin ve inhibitörlerin deteksiyonu
4. Membran değişiklikleri
5. Mitokondriyal analizler

Hematoksilen ve eozin boya ile doku kesitlerinin ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi apoptotik hücrelerin görüntülenmesini sağlar. Bu yöntemle geç evre apoptoz hücreleri tespit edilebilir, ancak erken evre apoptoz hücreleri bu yolla tespit edilemez. Bir epoksi-reçine gömülü bloğun yarı-ultra ince kesitleri, standart ışık mikroskop altında yoğun boyanmış apoptotik hücreleri ortaya çıkarmak için toluidin mavisi veya metilen mavisi ile boyanabilir. Bu metot, apoptoz sırasında

ortaya çıkan çekirdek ve sitoplazma yoğunlaşmasına dayanır. Diğer bir apoptotik morfoloji tespitine dayanan yöntem ise TEM (Transmission Electron Microscope) mikroskobu kullanılarak görüntüleme tekniğidir. Bu yolla apoptozun belirlenmesi için hücrenin apoptoz geçirirken karakteristik olarak kesin olan bazı özelliklere sahip olması gereklidir. Bunlar; çekirdek fragmentasyonu, hücre zarının bozulmamış olması, düzensiz sitoplazmik organeller, büyük kofullar ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşması olarak sayılabilir [48].

Apoptozun tespiti için ikinci yöntem ise DNA fragmentasyon analizidir. Efektör kaspazlar, hücre çekirdeğinde (laminler), DNA tamir enzimlerinden PARP, fodrin, Rb, sitoplazmada (aktin) ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Ayrıca, görevlerinden bir tanesi, hücreyi apoptozisten koruyan proteinleri elimine ve inaktive etmektir. Bu proteinlerden bir tanesi ICAD'dır. Bu protein normalde CAD (kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz) proteinine bağlanır ve hücre içinde bu enzimi inaktif durumda tutmaktadır. Apoptotik bir uyarı geldiğinde kaspaz aktivasyonu başlar başlamaz bu inhibitörü (ICAD) yıkarak CAD enzimini serbest bırakmaktadır. Ortamda serbest kalan CAD enzimi nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak 200 baz çift uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturmaktadır. Bu oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezde DNA merdiveni şeklinde görselleştirilmektedir. DNA fragmentasyonu, kaspaz bağımlı bir apoptotik hücre analiz tekniği olduğu için kaspazdan bağımsız olarak apoptozisin uyarıldığı hücre hatlarında test edilemez. Kaspazlardan bağımsız olarak (özellikle kaspaz-3-bağımsız) apoptozun uyarıldığı durumda, hücreler direkt olarak proteoliz yoluyla proteinlerinin parçalanmasıyla hücre membranından elimine edilir. DNA ladder tekniği, apoptozis endonükleaz kesim ürünlerini test etmek için kullanılır. Bu yöntem, apoptoz geçiren hücre sayısı fazla olan hücre ve dokularda oldukça kullanışlı bir yöntemdir [57]. Apoptotik DNA endonükleaz kesim ürünlerinin test edildiği diğer bir yöntem ise TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) yöntemidir. Burada, terminal transferaz enzimi, DNA fragmentlerinin 3' ucuna etiketli UTP eklemek için kullanılır. Daha sonra ışık mikroskobu, floresans mikroskobu veya akış sitometrisi ile tespit edilmesini sağlamak için dUTP çeşitli problarla etiketlenir [48].

Sistein kaspazlar ve efektör kaspazlar da dahil olmak üzere bilinen 13'ten fazla kaspaz ve kaspaz belirlemek için birçok test ve kit vardır. Bu analizler, PARP ya da fosforillenmiş ve hücre modifikasyonları bilinen substratların kesim reaksiyonlarının deteksiyonlarında kullanılır. Pro-kaspazlar ve aktif kaspazların belirlenmesi için poliklonal ve monoklonal antikorlar mevcuttur [48]. Kaspaz aktivasyonu, bu antikorlar kullanılarak western blotlama, immunpresipitasyon ve immunhistokimya olmak üzere birçok yolla tespit edilebilir. Ayrıca gerçek zamanlı PCR ve mikroarray de apoptozda yer alan en az 112 genin ifadesini profillemek için kullanılır [58]. Bu PCR mikroarrayleri, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alan anahtar ligandları, reseptörleri, hücre içi modülatörleri ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyon profilini belirlemek için tasarlanmıştır. Anti-apoptotik genler de bu yöntemle analiz edilir. Hücreler veya dokulardaki gen ifadesinin karşılaştırılması, kontrol örnekleri kullanılarak yapılabilir. Apoptoz ile ilişkili gen ifadelerinin analizinin kolaylıkla yapılması için birçok firma gen paneli sunar. Bu metodoloji, 96-kuyucuklu bir petride yaklaşık 5 nanogram RNA kullanımıyla gerçekleştirilir. Her mRNA veya transkript, bir floresan boya gibi bir marker ile etiketlenir. İfade profili oluşturmak için gerçek zamanlı bir PCR aracı kullanılır. Elde edilen sinyallerin yeri ve yoğunluğu, numunedeki her transkript miktarı için tahmini bir değer verir [59].

Annexin V boyaması testi yoluyla fosfotidilserin kalıntılarının hücre membranının dışında birikmesiyle de apoptotik hücre deteksiyonu yapılabilir. Apoptotik hücreler FITC etiketli Annexin V ile bağlandığında, floresan mikroskobu ile görselleştirilebilirler. Bu yöntem, hassas olması (tek apoptotik hücre tespiti) ve başlatıcı kaspazların aktivitesini doğrulama kabiliyeti olması açısından oldukça avantajlıdır [60].

Mitokondriyal analizler ve sitokrom c salımı, apoptozun içsel yolağının erken evresindeki değişikliklerinin belirlenmesini sağlar. Lazer tarama konfokal mikroskopisi (LSCM), tek hücrelerde çeşitli mitokondri olaylarını izlemek için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Mitokondriyal geçirgenlik geçişi (MPT), iç mitokondriyal zarın depolarizasyonu, Ca^{+2} akışı, mitokondrial redoks durumu ve reaktif oksijen türlerinin tümü bu metodoloji ile izlenebilir. Mitokondriden sitokrom

c salınımı floresans ve elektron mikroskopisi kullanılarak da test edilebilir. Fakat, sitokrom c sitoplazmaya salındıktan sonra kararsız hale gelir. Bu nedenle, apoptotik olmayan bir kontrol kullanılmalıdır [48]. Bütün apoptoz mekanizmasının kesin olarak doğrulanabilmesi için eş zamanlı birkaç testin birlikte kullanılması gerekmektedir.

1.2.2. Otofaji

Memeli hücrelerde ubikütin-proteozom yolu ve otofaji-lizozom yolu olmak üzere iki çeşit protein yıkım mekanizması mevcuttur. Proteozom yoluyla kısa ömürlü ve sitoplazmada çözünmesi kolay proteinler yıkılırken (apoptotik yıkım yolu), lizozomda yıkılacak proteinler kargo veya keseciklerde paketlenerek sindirildikten sonra yıkıma uğratılır (lizozom-bağlı yıkım yolu). Otofaji yolağı, fagoforun doğmasıyla başlar ve otofagozomun ölümüyle sona erer. Bu yolağın hücresel ve moleküler yaşam döngüsü, 1950'lerin sonlarından beri hücre biyologlarının araştırma alanına girmiştir. Özellikle maya ve diğer ökaryotlardan elde edilen bilgiler, otofajiye bağlı ATG proteinlerin tanımlanmasını sağlamıştır [61].

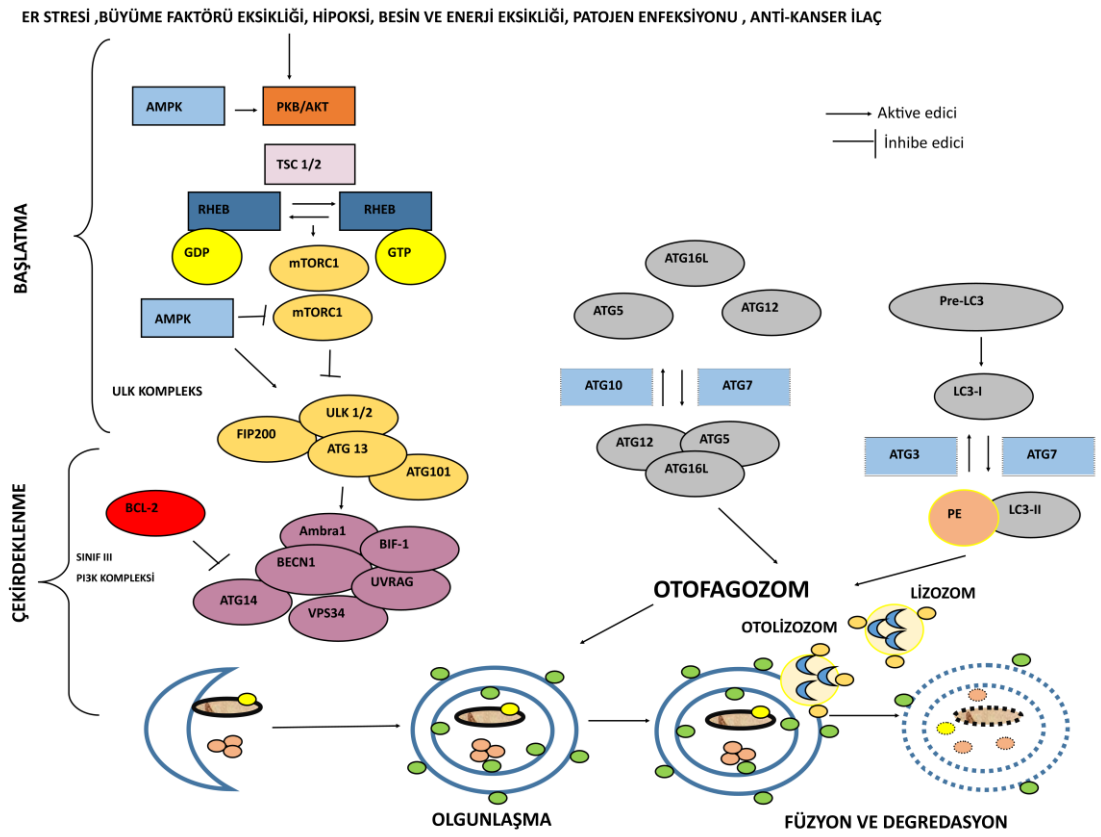
Otofaji, tümör mikro-ortamı gibi stresli koşullarda homeostaz sağlanması için hücrelere sürdürülebilir bir biyomolekül ve enerji kaynağı sağlar. Son bulgular otofaji ile malign transformasyon arasında yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, tümörün hayatta kalması ya da hücre ölümündeki otofajinin karmaşık ikili rolü nedeniyle, otofaji/kanser ilişkisini hedef alan etkin tedavi stratejileri bugüne kadar başarılı olamamıştır (otofaji-programlı hücre ölümü arasındaki çapraz etkileşim) [62].

Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA) olmak üzere üç temel otofaji türü vardır [63]. Otofaji, bazal düzeyde aktif olan bir dizi uyarıcı ve stres koşulunu takiben düzenlenir. Amino asit yoksunluğu, serum açlığı ve büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi ve çeşitli kimyasallara ve toksinlere maruz kalma, otofajiyi harekete geçiren stres koşulları arasında sayılabilir. Çoğu otofaji indükleyici sinyal, anabolik ve katabolik süreçleri koordine eden mTOR protein kompleksleri (mTORC1 ve mTORC2) seviyesinde bir araya gelir. Hücresel enerji sensörü AMPK,

mTOR'u doğrudan düzenler ve otofajik aktivitenin düzenlenmesine katkıda bulunur. Ayrıca, ER/RSK yolu, PI3K/AKT yolu, amino asit sensörü RAG sistemi ve hipoksi, mTOR seviyesinde otofajiye bağlı yollar arasındadır. Lipid kinaz VPS34 ve düzenleyici protein *Beclin-1* dahil olmak üzere bir sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kompleksi, membran çekirdeklenme aşamasını ve başlangıç fagofor oluşumunu kontrol eder. PI3K aktivitesi tarafından üretilen fosfatidilinositol 3-fosfat (PtdIns3P) ve PI3P bağlayıcı proteinler (örneğin, FYVE-domain) otofajiye bağlı proteinler arasındadır [64]. Ayrıca, *Beclin 1*, sınıf III tip fosfoinositid 3-kinaz (PI3KC3)/Vps34 ile etkileşime bağlı olarak, otofajik proteinlerin pre-otofagosomal bir yapıya (PAS) lokalize olması için oldukça önemlidir. Beclin 1-Vps34-Vps15 birlikte çekirdek kompleksi oluştururlar. *Beclin-1* geni, otofajinin çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerini kontrol etmede oldukça önemlidir. Ayrıca, birçok kanser türünde kaybolmuş bir tümör baskılayıcı olan, ölümle ilişkili protein kinazın (DAPK) fosforilasyon substratıdır. Ayrıca bu DAPK, LC3 substratına da bağlanarak otofajiyi uyarabilir [65].

LC3 köken olarak başlangıçta saflaştırılmış MAP1A ve MAP1B ile ilişkili üç hafif zincirden (LC1, LC2 ve LC3) biri olarak tanımlanmıştır. Bir memeli Atg8 homologu olarak otofajiye özgü rolü ortaya çıkıncaya kadar, LC3'ün uzun zamandır mikrotübüllerin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmüştür. Otofagosomal membranların oluşumu sırasında, sitozolik LC3 (LC3-I), E1-benzeri enzim Atg7 ve E2-benzeri enzim Atg3 ile LC3-II enzimi tarafından katalize edilen iki ardışık ubikütinasyon-benzeri reaksiyonla fosfatidiletanolamin (PE)'e konjüge edilir. Otofagozomların lizozomlarla füzyonu sırasında, fagozom içindeki LC3-II de lizozomal proteazlarla degredasyona uğrar. Bu nedenle, otofagozomal membranların bir belirteci olarak, hücresel *LC3-II* seviyesindeki değişiklikler, lizozomdaki değişimlere, dolayısıyla da otofaji mekanizmasının gerçekleşmesiyle bağlantılıdır [66].

Mayadaki genetik çalışmalar, otofajiye bağlı (ATG) genlerin keşfedilmesini sağlamıştır ve böylece otofajik moleküler sinyal yolu aydınlatılmıştır. Otofajik regülasyon, Şekil 1.5.'te görüldüğü gibi başlatma, çekirdeklenme, olgunlaşma, füzyon ve degredasyon olmak üzere birçok aşamadan oluşur [62].



Şekil 1.5. Memelilerde otofaji regülasyonun moleküler mekanizması

Rapamisinin TOR (memelilerde mTOR), otofaji uyarıcı sinyalin iletilmesinden sorumlu evrimsel olarak korunan bir serin/treonin kinazdır. Memelilerde, mTOR iki farklı kompleks halinde bulunur; bunlar mTOR kompleksi1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi2 (mTORC2) dir. mTOR kompleksleri, anabolik ve katabolik süreçleri koordine ederek hücresel enerji homeostazını düzenleyen sinyal yollarının entegrasyonu için kritik bir bağlantı oluşturur [67]. PKB-AKT yolu mTORC1'i aktive edebilir ve otofajiyi baskılayabilir. Ancak, otofaji, hücresel enerji ve ATP'nin algılanmasında kritik rol oynayan başka bir kinaz olan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) tarafından aktive edilir. Ardından, AMPK, ADP veya ATP ile doğrudan etkileşim yoluyla aktifleşerek konformasyonel bir değişikliğe neden olur. AMPK aktivasyonu LKB1 ve kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz kinaz-β tarafından kontrol edilir. AMPK ve mTOR aktivitesi arasında çapraz aktivasyon mevcuttur. Besince zengin koşullar altında, mTORC1 kompleksi, ULK1 veya ULK2 kinaz, ATG13, FIP200 ve ATG101'den oluşan ULK1/2 kompleksinin etkisizleştirerek otofajiyi baskılar. Besin yoksunluğuna cevap olarak ULK1/2

kompleksi, sınıf III fosfatidilinositol 3- kinaz (PI3K) kompleksi yoluyla otofajiyi aktive eden mTORC1'in ayrılmasına neden olur [62].

Anti-apoptotik proteinlerin bir üyesi olan *Bcl-2*, kanserlerde yüksek oranda ifade edilir ve kemo ve radyo-terapötik direnç ile ilişkili olduğu bilinir. *Bcl-2*, *Beclin-1*'in negatif regülatörü olarak tanımlanmıştır ve bu nedenle, *Bcl-2* ve *Beclin-1* etkileşimi, çeşitli kanser hücrelerinde otofaji ve/veya apoptoz aktivasyonu için kritik belirleyicidir [62]. Örneğin, insan laringeal skuamöz karsinom hücrelerinde *Beclin-1*'in aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunda önemli bir azalmaya neden olur ve hücreleri apoptotik hücre ölümüne teşvik eder [62].

Otofajinin kemo veya radyoterapilere direnci destekleyen rolünün olması, anti-kanser tedavisi stratejilerinin etkinliğini azaltır. Bu nedenle, otofaji inhibisyonu, tümör hücrelerini tedaviye karşı duyarlı hale getirir. Bu inhibitörler arasında, Sınıf III PI3K inhibitörleri olan 3-metiladenin (3- MA), wortmannin, LY294002, SAR405 ve yeni geliştirilen viridiolün otofagosom oluşumunu engellediği gösterilmiştir [68-70]. Ayrıca, CQ, HCQ, Lys0569 ve monensin içeren lizosomotropik ajanlar, lizozomların asitlenmesini önler ve böylece otofagosomların maddeleri parçalamasını önleyerek otofajiyi baskılar. Ayrıca, siRNA veya miRNA aracılı susturma stratejileri kullanılarak, otofajiye bağlı genlerin yıkılması da otofajik aktiviteyi inhibe eder [62]. Yeşil çaylarda bulunan epigallokateşin gallat (EGCG), insan kolorektal kanser hücrelerinde hücre döngüsü durması ve apoptozis indüksiyonu ile ilişkili bulunan bir polifenoldur. Yapılan son çalışmalar bu maddenin özellikle ağız kanser hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi inhibe ettiği görülmüştür [71]. Kurkumin (zerdeçal aktif maddesi), bir diğer doğal polifenolik bileşiktir ve antioksidan etkileri nedeniyle kanser tedavisiyle bağlantılı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [72]. Kurkuminin malign glioma hücrelerinde AKT/mTOR /p70 (S6K) yolunu inhibe ederek *in vitro* ve *in vivo* otofajik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir [73, 74].

Çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere göre apoptoz ve otofajinin birbiriyle eşzamanlı olarak düzenlendiğini ve tablo 1.2.'de görüldüğü gibi farklı hücresel sonuçlara yol açtığını göstermektedir [75]. *Drosophila* ile yapılan çalışmalar ışığında

steroid ile tetiklenen hücre ölümünde apoptoz ile ilişkili genlerin otofajiyi düzenleyen genlerle de bağlantılı olduğu tespit edilmiştir [76, 77].

Tablo 1.2. *Programlanmış hücre ölümleri (apoptoz-otofaji) karşılaştırması*

	TİP I APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ	**TİP II OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ**
ÇEKİRDEK	KROMATİN KONDENSASYONU	KISMİ KROMATİN KONDENSASYONU
	ÇEKİRDEK PİNOZU	BAZEN ÇEKİRDEK PİNOZU
	DNA MERDİVENİ VE ÇEKİRDEK FRAGMENTASYONU	ÇEKİRDEK GEÇ EVRELERE KADAR SAĞLAM
		DNA MERDİVENİ YOK
SİTOPLAZMA	SİTOPLAZMİK KONDENSASYON	ARTAN OTOFAJİK VEZİKÜL SAYISI
	AKTİF KASPAZLAR	KASPAZLAR AKTİF DEĞİL
	RİBOZOMAL ENDOPLAZMİK RETİKULUMDAN RİBOZOM KAYBI	ARTAN LİZOZOM AKTİVİTESİ
	APOPTOTİK CİSİMLERE PARÇALANMA	GOLGİ VE ER GENİŞLEMESİ
	MİTOKONRİ GEÇİŞİNDE ARTIŞ	ARTAN OTOLİZOZOM SAYISI
HÜCRE ZARI	KABARCIK OLUŞUMU	KABARCIK OLUŞUMU
HÜCRE BOŞLUĞU	HETEROFAJİ	ARALIKLI HETEROFAJİ OLUŞUMU

Mitokondriyel hasara dayalı apoptozda rol alan *Bcl-2* ailesi proteinlerinin aynı zamanda otofaji aktivasyonu için de önemli bir sinyal yolağı olduğu keşfedilmiştir [78]. Bu sebepten mitokondri, hem apoptoz hem de otofajik hücre ölümünde rol oynayan en önemli hücresel organdır. Lemasters ve arkadaşlarının 1998 yılında önerdiği modele göre, otofaji, proapoptotik mitokondriyal faktörlerin sitoplazmaya salınmasını önleyerek hasarlı mitokondriyi ortadan kaldırabilir ve apoptozu bloke edebilir [79]. Otofajiyi uyarmak için hasarlı mitokondriden salınan bu proteinin mTOR içerdiği gösterilmiştir [80]. Mitokondriyal hasara bağlı otofajik hücre ölümü,

özellikle mitokondriyal temelli apoptozun baskın olmadığı veya kaspaz inhibitörleri tarafından bloke edildiği koşullar altında ortaya çıkabilir [81]. Otofajinin hücreyi hayatta kalma yönünde mi uyardığı yoksa programlı hücre ölümüne mi tetiklediği karmaşasından dolayı, otofaji-apoptoz arasındaki çapraz etkileşim ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.

1.2.3. Nekroptoz

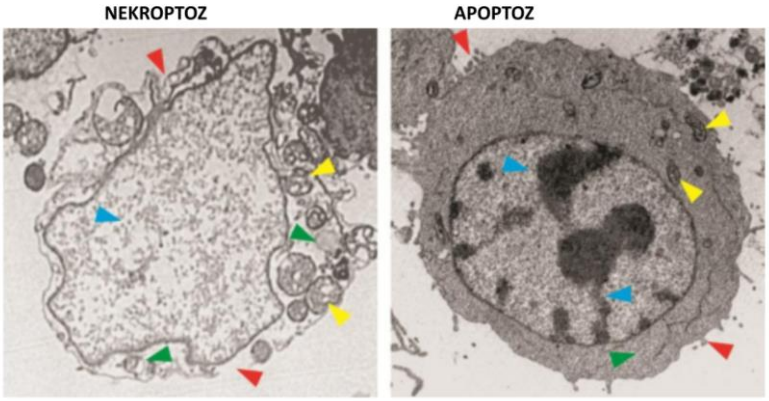
Hücre ölümü, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre apoptoz, otofaji, nekroptoz ve mitotik olmak üzere faklı şekillerde sınıflandırılabilir. Apoptoz ve nekroptoz en belirgin iki hücre ölümünü temsil eder [82].

Nekroptotik hücre ölümü, ilk defa TNF veya FasL ve kaspaz inhibitörleri ile muamele edilen murin L929 fibroblast hücrelerinde gözlenmiştir [83]. Apoptotik hücre ölümü, kaspaz aktivasyonuna bağlı bir ölüm mekanizması iken, buna karşılık, nekroptoz ilk önce TNF ile sadece zVAD florometil keton gibi bir pan-kaspaz inhibitörünün varlığında TNF ile muamele ile tetiklenebilen, kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm şekli olarak tanınmıştır [84]. Daha önce, TNF'nin, kaspaz 8'in aktivasyonuna sebep olan protein etkileşimleri ile apoptoza neden olduğunu; fakat nekroptozun, kaspaz 8'in fonksiyonunun inhibe edilmesini veya bozulmasını gerektirdiği ortaya çıkarılmıştır [85].

NF-kB aktivasyonundaki rolü ile bilinen reseptör etkileşimli protein 1 (RIP1) nekroptozda kritik rol oynayan yolaklardan biridir ve özellikle kaspaz ile inhibe edilen hücrelerde kritik bir rolü olduğu gösterilmiştir. RIP1, aktivasyon döngüsü içinde Ser 161 üzerinde fosforillenebilir veya kinazın T-halkası olabilir [86]. Daha sonra çalışmalar, RIP1'in inhibitörü olduğu gösterilen ve bu tip hücre ölümüne ait küçük moleküllü bir inhibitör daha tanımladı. RIP3 olarak adlandırılan bu yolağın da RIP1 ile beraber nekroptozda kritik rol oynadığı gösterilmiştir [82].

Nekroptotik hücreler, Şekil 1.6.'da görüldüğü gibi erken evrede plazma membran bütünlüğü kaybı, yarı saydam sitozol ve mitokondride şişme gibi morfolojik özellikler gösterir. Buna karşılık, apoptotik hücreler hücre büzülmesi, plazma zarının dışarı çıkmaya başlaması, çekirdek ve organel kondensasyonu gibi özellikler ile

karakterize edilir [87]. Biyokimyasal seviyede, daha yüksek bir hücresel ATP seviyesi gerektiren ve daha enerji tüketen bir işlem olan apoptozun aksine nekroptotik hücreler, hücresel ATP'nin tükenmesiyle hücre içi içeriklerin dışarı sızmasına neden olurlar. Fakat apoptotik hücreler fagositoz yoluyla yutularak plazma zarından elimine edilir. Moleküler seviyede kaspazdan bağımsız olan nekroptoz, RIP1 (Receptor Interacting Protein 1), RIP3 ve MLKL (Mixed Lineage Kinase Like) ile sinyal verirken, apoptoz, kaspaz aktivasyonunu gerektirir ve *Bcl-2* familyası proteinlerinin etkileşimlerine veya ölüm reseptörlerinin aktivasyonuna aracılık eder [82]. Nekroptozun bir başka önemli özelliği, plazma zarının geçirgenleştirilmesi ve sağlam bir bağışıklık ve enflamasyona cevaben yüksek mobilite grup kutusu 1 (HMGB1) proteini ve mitokondriyel DNA gibi Hasar İlişkili Moleküler Modellerin (DAMP'ler) salınımına yol açabilmesidir. Bu yüzden nekroptoz, apoptoza göre immun sistem ve enflamasyonla daha fazla ilişkilidir [88].



Şekil 1.6. Kanser hücrelerinde nekroptoz ve apoptozun morfolojik özellikleri

Nekroptoz genellikle, TNF-, FAS ligand (FASL; CD95) ve TNF ile ilişkili apoptoz-indükleyen ligand (FASL; CD95) dahil olmak üzere tümör nekroz faktörü (TNF) sitokin familyası üyeleri gibi ekstrinsik yol aracılı apoptoz indükleyen uyaranlarla tetiklenir [89]. Ligand uyarımı üzerine, bu uyarıcılarla aktifleştirilmiş reseptörler, ilgili ölüm domainleri yoluyla RIP1 ile etkileşime girer ve proI'nin aktivasyonuna yol açan bir plazma zarı (sağkalım NF-κB ve mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) aktivasyonuna sebep olan) ile ilişkili kompleksi oluşturmak üzere, cIAP1 ve cIAP2 gibi hücresel apoptoz proteinleri (cIAP'lar) inhibe eder. Bu işlem sırasında, RIP1, cIAP'ler ve diğer E3 ubiquitin ligazları poliubikütinasyonlaştırılır. Mitokondri türevli kaspazlar (SMAC) veya küçük moleküllü SMAC mimetikleri

(IAP inhibitörleri olarak da bilinir) aktivatörü ile uyarılan cIAP'lerin ubiquitinasyon ve degredasyonu, RIP1'in harekete geçmesini sağlar [90]. Bu, plazma zarından RIP1 ayrışmasını ve hayatta kalma proteinin ölüm mekanizmasını uyaran proteine dönüşmesine sebep olur. FAS-İlişkili Ölüm Yolağının (FADD) RIP'e bağlanması, prokaspaz-8'i alır ve kaspaz-8'i aktifleştirir ve apoptozun indüklenmesine yol açar. Aktive edilmiş kaspaz-8, RIPl ve RIP3 gibi nekroptozun çekirdek düzenleyicilerini parçalayarak nekroptozu önler [82, 91]. Biyokimyasal, kimyasal biyoloji ve genetik çalışmalar MLKL'yi RIP1/RIP3 aracılı nekroptozun temel uyarıcısı olarak tanımlamıştır. MLKL normal olarak kinaz benzeri domain tarafından sitozolde bir monomer olarak inaktif durumda tutulur. Oligomerize MLKL'nin nasıl hücre ölümüne neden olduğunu açıklamak için birkaç farklı mekanizma önerilmiştir. pGAM5S, mitokondriyel birleşme faktörü, protein 1'e (Drp1) bağlanır ve mitokondriyel birleşmeyi ve hücre ölümünü teşvik etmek için GTPaz enzimini aktif hale getirir [82].

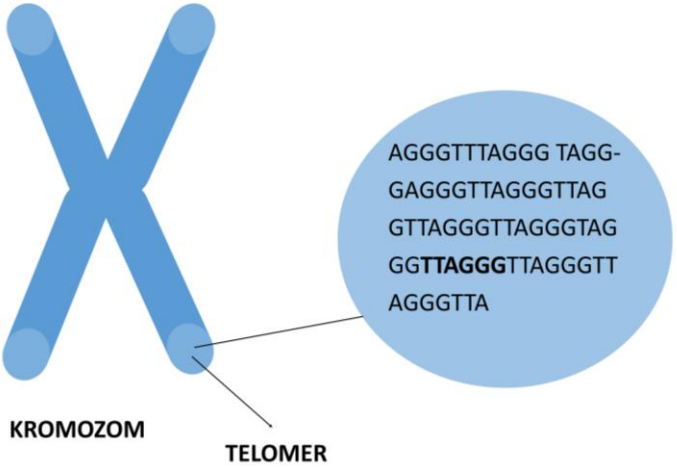
Ayrıca, nekroptozu tetikleyen başka unsurlar da vardır. DNA alkilleyici ajanlar, glutamat toksisitesi, oksidatif stres, hipoksi ve iskemi, DNA hasarına yanıt olarak poly(ADP riboz) polimeraz (PARP1) enzimine bağlı nekrozu tetikleyebilir. PARP1'e bağlı hücre ölümüne apoptoz-indükleyici faktörün (AIF) mitokondriyel intermembran alanından çekirdeğe translokasyonu ve kalpain proteazlarının aktivasyonu aracılık eder [92]. Nekroz oluşumunun başka bir şekline, tümör baskılayıcı p53 geninin mitokondrideki görevi aracılık eder. Oksidatif strese cevap olarak, p53 mitokondriyal matrikste birikir ve ATP tükenerek hücre ölümüne yol açan PTP regülatör siklofilin D ile etkileşime girer ve mitokondriyel geçirgenlik geçiş gözeneği (PTP) açılır ve böylece nekroz uyarılır. Bu durumda, p53'ün baskılama aktivitesi, transkripsiyonel aktivasyon fonksiyonundan bağımsız olarak gerçekleşir [93]. Ayrıca, piroptoz ve ferroptoz gibi diğer bazı apoptotik olmayan hücre ölümü yöntemlerinin de nekroz tarafından düzenlenmiş olduğu kabul edilir. Bununla birlikte, ayırt edici moleküler belirteçlerin bulunmamasından dolayı farklı nekroz biçimlerini ayırt etmek oldukça zordur. Genel olarak, bu nekroz formları, RIP1 veya RIP3 gibi kodlayıcı yolaklardan yoksun oldukları için nekroptoz olarak kabul edilmez (programlı olmayan ölüm modu) [82, 94].

Kültür hücrelerinde genel olarak TEM mikroskobu nekroptoz olan hücreleri ayırt etmek için kullanılır (Şekil 1.6.). Hücre dışına HMGB1 salınımı, hücre canlılığı kaybı ve ATP'nin tükenmesi, nekroptoz belirteçleri olarak kullanılabilir, ancak nekroptozu diğer nekrotik ölüm türlerinden ayıramaz. Nekroptoz kesin olarak detekt edilebilmesi için gen hedefleme, siRNA/shRNA, kinaz-ölümü veya etkileşimli domain eksikliği olan mutantlar veya küçük molekül inhibitörleri kullanılarak RIP1, RIP3 veya MLKL hedefleyen sistemler olmalıdır [82]. Örneğin, IP1 inhibitörü nekrostatin-1 (Nec-1) yaygın olarak kullanılır ve bu, RIP1'in hem katalitik hem de allosterik fonksiyonlarını, konformasyonel değişiklikleri indükleyerek inhibe eder [95].

1.3. Telomerler ve Kanserde Telomeraz Aktivitesi

Hücresel yaşlanma, diploid hücrelerde meydana gelen ve çoğalmayı sınırlayan kararlı bir hücre döngüsü durmasıdır. Bu fenomenin ilk tanımı, 1960'larda Hayflick ve Moorhead tarafından, kültürdeki insan diploid fibroblastlarının, büyümelerini durdurmadan önce maksimum hücre bölünmesine ulaşabileceğini gözlemlemeleriyle ortaya çıkmıştır [96]. "Hayflick limit" olarak bilinen bu biyolojik saate göre, her hücre bölünmesi bir telomer kısalmasından kaynaklanır ve bu telomer kısalığı, genomik kararsızlığı ve DNA hasarını önlemek için fizyolojik bir yanıt olarak ortaya çıkar [97].

Telomerlere ve telomeraza olan ilgi, 1930'larda Columbia'daki Missouri Üniversitesi'nde Barbara McClintock ve Edinburgh Üniversitesi'nde Hermann J. Muller adında iki genetikçi tarafından yapılan deneylerle ortaya çıkmıştır. Ayrı ayrı ve farklı organizmalarla (*Drosophilia melanogaster* ve *Zea Mays* ile) çalışan her iki araştırmacı da kromozomların uçlarında stabilite sağlayan özel bir bileşen bulunduğunu fark etmişlerdir. Muller, bu yapıya Yunanca'dan "son" anlamına gelen (telos) ve "kısım" anlamına gelen (meros) kelimelerini birleştirerek "telomer" adını vermiştir [98].



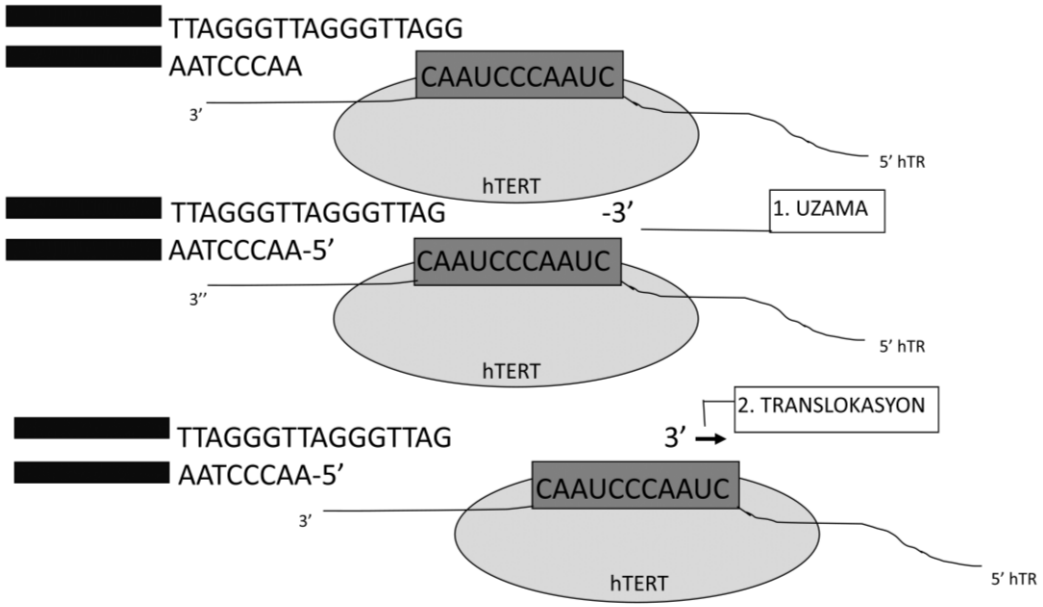
Şekil 1.7. Kromozom uçlarında bulunan telomer yapısı

Hücresel yaşlanma, fizyolojik ve patolojik olarak çeşitli nedenlerle indüklenir. Bunlar arasında telomer kısalması en önemlilerinden biridir. Telomerler, kromozom uçlarını bozulma veya füzyondan koruyan tekrarlı nükleotid dizisi motifleridir (Şekil 1.7.). Her hücre bölünmesi, 3'ucunda 50-200 baz çiftlik kopyalanmamış DNA kaybına neden olur. Telomeraz enzimi, (terminal transferaz) telomer erozyonunu önlemek için telomerlerin ucuna bazların eklenmesinden sorumludur. Bununla birlikte, telomeraz aktivitesi, telomer kısalması ve hücre yaşlanmasıyla sonuçlanan hızlı hücre proliferasyon aktivitesini dengelemek için yeterli değildir [97].

Telomerik DNA'da yerleşik olan proteinler, dubleks telomer bağlayıcı proteinler olan TRF1 ve TRF2'dir. TRF1 ve 2 ve ilişkili proteinler, kompleksi stabilize ederek t-döngüsünü oluştururlar. TRF1 intratelomerik sarmalda oldukça önemlidir. TRF2 ise telomerin uzunluğu boyunca bağlanır ve stabilizasyonda görevlidir. DNA hasarına cevaben RAD50 / MRE11 / NBS1 kompleksi de TRF2 ile birlikte çalışır [99].

Telomeraz, kromozom uçlarına heksamerik tekrarlar (TTAGGG) ekleyen, telomerlerin uzunluğunu genişleten ve koruyan ve böylece hücrenin maruz kalabileceği bölünme sayısını artıran bir ters transkriptaz enzimidir [100]. Şekil 1.8.'de görüldüğü gibi, holoenzim, hTR adı verilen bir RNA alt ünitesinden, hTERT (human TERT) denilen bir protein alt ünitesinden ve birçok ilişkili proteinden oluşur. Ters transkriptaz kompleksi, hTR'nin RNA kalıp dizisine tamamlayıcı olan telomer uçlarına TTAGGG DNA bazlarının eklenmesini sağlar. İnsan holoenzimi, telomeraz

bileşenlerini *in vivo* olarak birleştirmek için p23 ve hsp90 proteinlerine ihtiyaç duyar. Bu rekombinant proteinler, hTR ve hTERT'nin bir araya getirilmesiyle holoenzimi oluşturur [101].

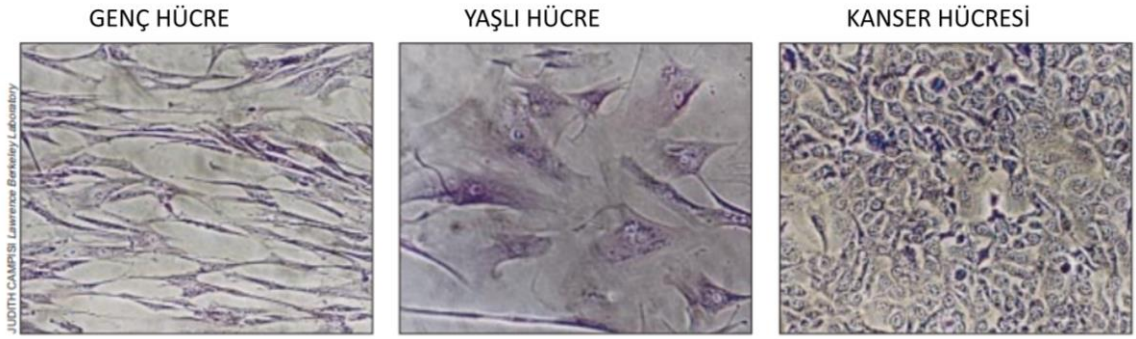


Şekil 1.8. Telomeraz holoenzimi

Telomerazın katalitik protein (hTERT) bileşeninin normal fibroblastlara ve epitel hücrelere sokulması, telomerlerin kısalmasını önler ve ölümsüzleşmeye (immortalizasyon) sebep olur. Telomerazın ölümsüzleşmedeki kilit rolü telomer uzunluğunu korumaktır. Ölümsüzleştirilmiş insan hücrelerinde telomerazın inhibisyonu, telomer kısalmasına ve hücre ölümüne yol açar [102].

İnsan ömrü, son yıllarda giderek uzamıştır. Ortalama yaşam süresinin 1900'de 47,3, 1970'de 70,8, 1997'de 76,5 yıl olduğu görülmüştür. Örneğin, Centenarians nüfusun en hızlı büyüyen kesimlerinden biridir. Burada, 2050 yılına kadar 85 yaşından büyük insanların tüm nüfusun yaklaşık %15'ini oluşturması bekleniyor [99]. Normal hücrelerin replikatif yaşlanmaya girmeden önce geçirebilecekleri sınırlı sayıda bölünme kapasitesi vardır. Genel olarak yaşlı bireylerden alınan hücreler (veya somatik vücut hücreleri), genç hastalardan elde edilen hücrelere kıyasla daha az sayıda bölünme geçirir. Replikatif yaşlanma, genetik olarak programlanmış bir

olaydır ve hücrelerin bölünmeyi durdurduğu süreçtir. Kanserli hücreler sonsuz bölünme kapasitesine sahip olduklarından birbirine yakın, sık ve fazla telomerlere sahiptir (Şekil 1.9.). Normal hücreler, M1 ya da ölüm aşaması 1 olarak adlandırılan bir büyüme durdurma periyoduna ulaşır, bu, p53/p21 ve p16/Rb hücre döngüsü düzenleyici genleri tarafından kontrol edilir. Eğer p53 geni bloke olursa, (SV40 T antijeni veya E6 / E7 papillomavirüs proteinleriyle) hücreler, telomer kısalmasıyla birlikte ikinci ölüm evresi (M2) sinyali gelinceye kadar bölünmeye devam eder. Telomer kısalması hem M1 hem de M2 evresi tarafından kontrol edilir. M2 evresi genellikle "kriz evresi" olarak adlandırılır ve evrenin sonunda kromozomun füzyon ve kırılmalar geçirmesinden dolayı hücreler apoptoz geçirir. Onkoloji araştırmalarında, yaşlanmayı düzenleyen moleküler mekanizmayı ve telomer aktivitesini anlamak çok önemlidir, çünkü kanser hücrelerinde bölünmenin durdurulması, en iyi tedavi stratejilerinden biridir. [99, 103, 104].



Şekil 1.9. Telomer uzunluklarının mikroskobik görüntüleri

Telomeraz ekspresyonu kanserin önemli ayırt edici özelliklerinden biridir. Neredeyse insan tümörlerinin tamamında (% 70-90) telomeraz pozitif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, telomeraz aktivitesinin, invaziv meme kanseri hücrelerinin % 74'ünde gerçekleştiği ve iyi huylu meme dokularında performans göstermediği belirlenmiştir [105]. Genel olarak malign tümörler, sınırsız çoğalma kapasitesini ve dolayısıyla ölümsüzlüğü gösteren telomeraz ekspresyonu ile karakterize edilir. Çoğu iyi huylu tümör (benign), telomeraz eksikliği sebebiyle nihai hücre yaşlanması ile sonuçlanan sınırlı çoğalma kapasitesine sahiptir [99].

TERT, telomeraz aktivitesinin sınırlayıcı protein bileşenlerini kodlar. Transkripsiyon, haberci RNA (mRNA), fosforilasyon, olgunlaşma ve TERT

modifikasyonunun telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde hayati rol oynadığı rapor edilmiştir [106]. TERT, 5. kromozomda bulunur ve 16 ekzondan oluşan bir yapıdır. TERT protein ürünü, telomeraz holoenzimi içinde bir dimer olarak bulunur ve üç bölgeden oluşur. Bunlar, bir N-terminal alanı ve bir telomeraz RNA-bağlama alanı içeren N-terminal uzantısı, merkezi katalitik ters transkriptaz domaini ve C-terminal uzantısıdır. TERT, kanserde gen amplifikasyonu, ve promotöründeki mutasyonlar dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla ifade olabilir. TERT ifadesinin, tüm kanserlerin yaklaşık % 4'ünde (over kanseri, akciğer adenokarsinomu, akciğer skuamöz hücreli karsinomu, özofageal karsinom ve adrenokortikal karsinomun) arttığı gösterilmiştir [107].

Son raporlar, ilaç direncinin aynı zamanda telomeraz hTERT (insan telomeraz ters transkriptaz) alt ünitesinin mitokondriye translokasyonu veya başka bir telomerazla ilişkili faktörün (telomeraz ile ilişkili protein 1, TEP1) translokasyonundan kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır [108]. Birçok çalışma, telomeraz ile kanser hücrelerinin tedaviye duyarlılığı arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu bulgular, kanser hücrelerinde artan telomeraz ekspresyonunun, ilaçlara karşı dirençleriyle ilişkili olduğu gerçeğiyle doğrulanmaktadır [109]. Örneğin, telomeraz aktivitesi inhibisyonu, meme kanseri hücrelerini doksorubisin ilacına karşı duyarlı hale getirmiştir [110].

1.4. Meme Kanseri

Amerikan Kanser Derneği'nin en son istatistiklerine göre, ABD'li kadınlarda en sık teşhis edilen malignite türü meme kanseridir. Yıllık toplam 290 000 ölüm vakalarından yaklaşık 230 000'i ölümcül metastaz kanserlerdir [111].

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malign tümörlerden biridir ve akciğer ve kolon kanseri ile birlikte dünya çapında en yaygın üç kanserden biridir [112]. 2012 yılında dünya genelinde yaklaşık 1,7 milyon insana meme kanseri tanısı konmuş olup yaklaşık yarım milyon insanın da bu hastalıktan öldüğü rapor edilmiştir [113, 114]. Kuzey Amerika ve Avrupa'da (AB) meme kanseri ölüm oranın azalması çoğunlukla erken teşhis ve etkili sistemik tedavilerden kaynaklanmıştır. Bununla

birlikte, meme kanseri hala az gelişmiş ülkelerde akciğer kanserinden sonra en yaygın ikinci ölüm nedenidir [112].

Metastaz yapmayan erken evre meme kanseri, potansiyel olarak tedavi edilebilir durumdadır. Primer cerrahi yöntem ile tümörün alınması her hasta için etkin tedavi stratejisi olmayabilir. Yine de, üçlü negatif meme kanseri veya HER2-pozitif meme kanseri gibi bazı biyolojik tümör alt tipleri için, primer sistemik tedavi daha uygun olabilir. Malignite tanısı öncelikle çekirdek biyopsi ile doğrulanır [112].

Perou, Sørlie ve arkadaşlarının 2000'li yıllarda çığır açan çalışmaları nedeniyle, meme kanserinin klinik olarak en az dört farklı ilgili moleküler alt tipten oluştuğu düşünülmektedir [115, 116]. Bunlar;

1. Luminal A,
2. Luminal B,
3. HER2-zengin ve
4. Bazal tip

Meme kanseri standart patolojik kriterlere göre histolojik olarak tespit edilebilir. En sık görülen meme kanseri histolojisi, invaziv duktal karsinomdur ve hastaların % 50-75'inde görülen tiptir, bunu invazif lobüler karsinom (hastaların% 5-15'i) ve duktal/lobüler karsinomlar takip eder [117].

Meme kanseri patogenezinde iki temel moleküler hedef tanımlanmıştır. Bunlardan biri, invaziv meme kanserlerinin yaklaşık % 70'inde eksprese edilen östrojen reseptörü alfa (ERα) 'dır. Steroid hormon reseptörü olan ERα, östrojen ile aktive edildiğinde meme kanseri hücrelerinde onkogenik büyüme yollarını aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür. Yakından ilişkili steroid hormonu progesteron reseptörünün (PR) ekspresyonu da ERα sinyalleşmesinin belirtecidir [118].

İkinci moleküler hedef ise meme kanserlerinin % 20'sinde ifade olan transmembran tirozin kinaz reseptörü olan epidermal büyüme faktörü 1 (ERBB2)'dir. ERBB2 geninin çoğalması veya aşırı ekspresyonu olan tümörler $ERBB2^+$ ile ifade edilirler. ERBB2 eksprese eden meme kanserli hastalar, anti-ERBB2 antikorları (trastuzumab ve pertuzumab gibi) ve küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri (lapatinib ve neratinib gibi) ile tedavi edilirler [117, 119].

Meme tümörlerinin yaklaşık % 15'ini oluşturan üçlü negatif meme kanseri (triple negative), ER, PR veya ERBB2 moleküllere sahip olmaması ile bilinmektedir. Karakterize edilen 3 meme kanseri alt tipi HR^+, $ERBB2^+$ ve üçlü negatif meme kanseri tipleridir. Üçlü negatif meme tümörlerinin daha genç ve esmer olan kadınlarda ortaya çıkma olasılığı daha yüksekken, HR^+ tümörlerin yaşlı kadınlarda görülme olasılığı yüksektir. Ayrıca, meme kanserleri genel olarak 1-4 evreleri arasında değerlendirilir. Burada, 4 evresi metastazın en yüksek olduğu evre olup HR^+ veya $ERBB2^+$ alt tipleri için yaklaşık 5 yıl ve üçlü negatif için 1 yıl hayatta kalma süresine sahiptir. Evre 1 meme kanserleri ise anatomik olarak 2 cm'den küçük, lenf nodları olmayan tümör lezyonlarına sahiptir [117].

BRCA1 yolağı ile bazal benzeri meme kanserleri arasında bir bağlantı vardır [120]. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin meme ve yumurtalık kanseri duyarlılığı ile ilişkisi ilk defa 20 yıl önce gösterilmiştir. *BRCA1*, 24 ekzondan ve 1863 aminoasitten oluşan bir proteindir. Birçok görevi olup tanımlanan çoklu domainlerden oluşur. N-terminal bölgesinde, *BRCA1* ve *BARD1*'in (*BRCA1* İlişkili RING Domain proteini 1) etkileşimi ve E3 ubiquitin ligaz kompleksinin oluşumu için gerekli olan çinko bağlayıcı parmak domaini RING'i taşır. *BRCA1*'in merkezi kısmı 11-13 ekzonları tarafından kodlanır ve meme kanseri oluşumu, genellikle bu bölgelerdeki mutasyonlarla saptanır. *BRCA1* geninde kodlanan ve kodlanmayan sekanslarda delesyon, insersiyon ve birçok tek nükleotit polimorfizmi olmak üzere 1600'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. 1800'den fazla mutasyon ise *BRCA2* geni için tanımlanmıştır. Bunlar temel olarak çerçeve kayması mutasyonları, delesyonlar ve bazı diğer mutasyonları içerir [121].

BRCA1, OCT-1, c-Myc, ERα, p53, Smad3 dahil olmak üzere birçok transkripsiyon regülatörlerinin aktivitesini modüle eder. Örneğin, ERα ile *BRCA1* ile etkileşimi, meme kanserinde VEGF'nin (vasküler endotel büyüme faktörü) transkripsiyonunu düzenler. VEGF, en iyi bilinen anjiyogenez düzenleyicisidir. Bu transkripsiyon faktörü 5 ligand (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD ve plasental büyüme faktörü) ve 3 reseptörden (VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3) oluşur. Bunlar arasında VEGFR2 sinyalizasyonu, anjiyogenezin geliştirilmesinde önemli bir rol oynarken, VEGFR3 sinyalleri lenfanjiyogenez oluşumunda görevlidir [122]. Ayrıca, *BRCA1* C-terminal bölgesinin, meme kanseri hücrelerinde p53 hedef gen *MDM2*'nin transkripsiyonunu uyardığı gösterilmiştir. Bu yüzden, *BRCA1*'in genel olarak kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı rolünün olduğu anlaşılmıştır [121, 123].

Meme tümörlerinin moleküler heterojenliği, her alt tip için farklı köken hücrelerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu nedenle, transformasyon için, her biri farklı özelliklere sahip tümörlere yol açacak olan bir meme kök hücresi, kararlı bir progenitör hücre veya olgun bir meme epitel hücresi gerekir. Bunlar, tümörün gelişiminin devamı için gerekli olan kanser kök hücrelerdir [111].

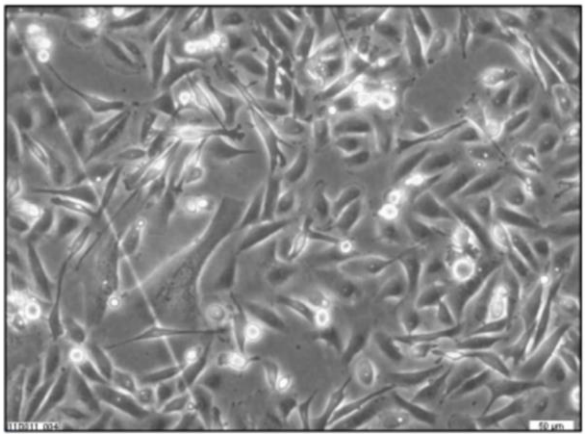
1958 Yılından bu yana BT-20 adındaki ilk insan meme kanseri hücre hattı tanımlanmış olup daha sonra 50'den fazla hücre hattı meme dokularından izole edilerek tanımlanmıştır [111].

1.4.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı ve Özellikleri

İnvaziv düktal karsinomu olan 51 yaşındaki MD Anderson adındaki bir kadından izole edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı, geç evre meme kanserlerini modellemek için oldukça sık kullanılmaktadır. Bu hücre hattı epitel olup ER, PR ve E-cadherin hormonları negatiftir ve p53 mutasyona uğramıştır (apoptoz da p53 yolağından bağımsız olarak, kaspaz aracılı yollarla (kaspaz-3) uyarılmaktadır). Mikroarray profillemede, MDA-MB-231 hücre genomu, meme kanserinin bazal alt tipi ile kümelenmektedir. Hücreler ayrıca büyüme faktörü reseptörü HER2'den yoksun olduklarından, iyi bir üçlü negatif meme kanseri modelini temsil ederler. MDA-MB-231 hücreleri *in vitro* olarak invazivdir ve implante edildiklerinde

ortografik olarak lenf bezlerine kendiliğinden metastaz yapan ksenograftlar üretir [111].

Diğer invaziv kanser hücre hatlarında olduğu gibi, MDA-MB-231 hücrelerinin invaziv yeteneği de hücre dışı matrisin proteolitik degredasyonuyla meydana gelir. Kültür kabında, hücre hattı endotel benzeri morfoloji gösterir ve Şekil 1.10.'da görüldüğü gibi sıklıkla çoklu hücre kolonilerini köprüleyen stellat (yıldız) şekilli invaziv fenotipiyle ayırt edilir [124, 125].

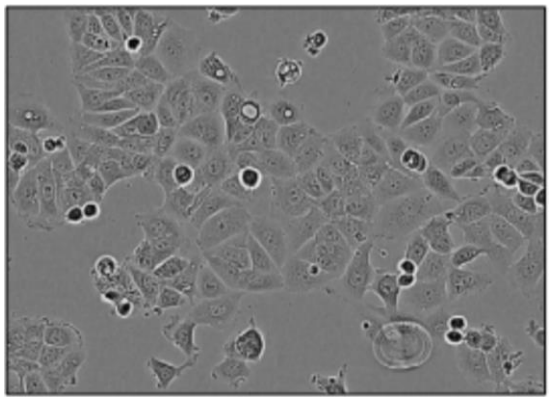


Şekil 1.10. MDA-MB-231 hücre morfolojisi

1.4.2. MCF-7 Hücre Hattı ve Özellikleri

Luminal-tip kökenli olan MCF-7, meme adenokarsinomu olan 69 yaşında bir kadından izole edilmiştir [126]. Dünya'da en çok çalışılan meme kanser hattı olan MCF-7, ismini Michigan Cancer Foundation (MCF) (Michigan Kanser Vakfı)'dan almıştır [127]. Hücre hattı, epitelyal bir morfolojiye sahip olup kültür kabı ile hücre tek tabakası arasındaki sıvı birikiminden dolayı mikroskobik olarak kubbe yapıları oluşturur. Şekil 1.11.'de MCF-7 hücrelerinin ekimden 48 saat sonraki bu morfolojisi gösterilmiştir. Östrojen reseptörü alfa (ERα) ifade eden nadir meme kanserlerinden biridir. Hücreler ayrıca androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerini eksprese eder. Ayrıca, MCF-7'nin östrojenlerle tedavisinin, anti-apoptotik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Anti-östrojenlerle tedavi, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin salgılanmasını düzenleyebilir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) da MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe eder [128, 129].

Kemoterapötik ilaçların geliştirilmesinde ve ilaç direncinin anlaşılmasında önemli bir yeri olan MCF-7 hücre hattı, meme kanseri hücre hatları arasında *in vitro* çalışmalarda kullanılmak için iyi bir modeldir.



Şekil 1.11. MCF-7 hücre morfolojisi

1.5. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

Çalışmada baklagil ailesine ait iki bitki türü kullanılmıştır. 18 000'den fazla tanımlanmış türü olan baklagiller ailesi (Fabaceae), çiçekli bitkilerin üçüncü büyük ailesidir. Baklagil ailesinin meyve kısmına teknik olarak "baklagil" veya "bakla" denir. Bu meyve kısmı, tek bir tohum içeren karpelden oluşur. Baklagil meyveleri, açılmamış ayrık baklalar da dahil olmak üzere çok çeşitli şekil ve boyutlarda ortaya çıkar. Baklagiller, dünya genelinde geniş alanlarda yetiştirilen, en önemli bitki protein ve enerji kaynağı olan bitki türlerinin ailesini kapsar. Tahıl baklagiller tropik, alt tropik ve ılıman bölgelerde yetişir. Özellikle Asya, Latin Amerika ve Afrika'da en önemli beslenme protein kaynaklarından birini oluşturan baklagiller, insanlar tarafından yetiştirilen en ilk besin bitkileri arasındadırlar. Yaygın olarak yetişen bazı türler yer fıstığı (*Arachis hypogaea*), güvercin bezelye (*Cajanus cajan*), nohut (*Cicerarietinum*), soya fasulyesi (*Glisin max*), lathyrus bezelye (*Lathyrus sativus*), mercimek (*Lensesculenta*), lima fasulyesi (*Phaseolusun*), barbunya (Phaseolus vulgaris), bahçe bezelye (*Pisum sativum*), kanatlı fasulye (*Psophocarpus tetragonolobus*), bakla (*Vicia laba*), siyah mercimek (*Vigna mungo*), yeşil mercimek (*Vigna radiata*) ve börülcedir (*Vigna unguiculata*). Baklagiller, yüksek protein içeriğinden dolayı aynı zamanda hayvancılıkta da büyük öneme sahiptir. Ayrıca, baklagiller, atmosferik azotu sabitleyerek verimliliğinin arttırılması yeteneğine

sahiptir. Baklagiller, farklı ülkelerde olgunlaşmamış tohum, kuru tahıl, çeşniler veya kavrulmuş tahıl, un üretimi ve fermente ürünler gibi çeşitli şekillerde tüketilirler [130, 131]. Baklagillerin protein içeriği, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenirken, beslenme kalitesi ise sindirilebilirlikleri, esansiyel amino asitlerin dengesi ve belirli toksik maddelerin varlığı gibi birkaç faktöre bağlıdır. Baklagil proteinleri lisin ve treonin bakımından çok zengin, fakat metiyonin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitler bakımından fakirdir [132]. Yüksek lisin seviyesi, tahıl baklagillerini ideal bir takviye gıda haline getirir. Baklagiller ayrıca iyi bir vitamin, tiamin, niasin, mineraller, kalsiyum ve demir kaynağı oluşturur. Bu bileşenlere ek olarak, esas olarak nişasta formunda yaklaşık % 60 oranında karbonhidrat içerirler. Birim ağırlık başına bakliyatın kalorisi, verimi tahıllardakiyle hemen hemen aynıdır [133].

Tahıl-baklagil yetiştiriciliğinde ana hedefler tahıl verimini, metiyonin, sistin ve protein sindirilebilirliğini arttırmak ve tohum sertliğini veya pişirme süresini azaltmaktır. Benzer şekilde, Brassica ve yerfıstığı gibi yağlı tohum bitkileri de benzer amaçlara sahiptir, ancak bazı patojenlere ve hastalıklara karşı duyarlılıktan yoksundur. Yaprak lekesi (*Cerospora arachidicola*) ve kök çürüklüğü (*Rhizoctonia destrens*) gibi hastalıklar yer fıstığında ciddi zararlara neden olur. Soya fasulyesini etkileyen yüzden fazla patojen ve bitkide hasara neden olan yaklaşık 35 hastalık vardır [134].

N (Azot), çoğu doğal ekosistemde bitkilerde temel besin sınırlayıcı unsurlardan biridir. Baklagiller, simbiyotik yetenekleri sayesinde, bozulmuş ekosistemlerde N fiksasyonu mekanizması sağlarlar. Baklagillerin ayırt edici özelliği, kök nodülleri geliştirme ve uyumlu rizobi ile simbiyozda N_2 fiksasyonu yapabilme yetenekleridir. Simbiyotik olarak etkili kök nodüllerinin oluşumu konak ve mikrosimbiyont arasındaki sinyalleşmeyi içerir. Baklagil konağının kökünden salınan flavonoidler veya izoflavonoidler, bitkiye sinyal veren lipokitooligosakarit moleküllerinin oluşumuna yol açarak rizobide nodülasyon genlerinin transkripsiyonunu indükler. Baklagillerde, havadan azot alınması, baklagillerin köklerinde nodüllerde gelişen simbiyotik bakteriler (*Rhizobia*) ile gerçekleştirilir. Bu bakteri nodülde büyümek ve çoğalmak için nitrojeni direkt olarak havadan alır. Böylece azot baklagil bitkisi için

uygun hale gelir ve büyümesi ve beslenmesine yardımcı olur. Rhizobia'nın bu simbiyotik birliği, baklagillere diğer bitkilere kıyasla oldukça büyük bir avantaj sağlar [135].

Birçok baklagil tıbbi kullanıma sahiptir [136]. Örneğin soya fasülyesi ve diğer baklagillerden elde edilen izoflavonların kanser riskini azalttığı ve kolesterolü dengelediği görülmüştür [135].

Yem baklagillerinin evrensel olarak yem olmayanlardan daha yüksek bir besleme değerine sahip olduğu kabul edilir. Genel olarak baklagiller arasında en yüksek oranda protein ve mineral içeren türlerdir. Çünkü, yemlik baklagillerin yaprakları ve gövdeleri, belli bir olgunluk safhasında hasat edilirler. Baklagiller sadece daha yüksek protein yüzdesine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda yüksek kalitede protein içerirler. Bu, özellikle hayvan yemlerinde yüksek besin değeri eldesinde oldukça önemlidir. Yem için özel değere sahip olmasının yanı sıra, baklagiller toprağın iyileştirilmesinde oldukça önemlidir, çünkü yüksek miktarda azotu sonraki bitkilerin kullanımı için toprağa bırakırlar [137].

1.5.1. *Lotus corniculatus L.*(Gazelboynuzu)

Alem: Plantae

Şube: Tracheophyta

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)

Takım: Fabales

Familya: Fabaceae (Leguminosae)

Cins: *Lotus*

Tür: *Lotus corniculatus L.*



Şekil 1.12. *Lotus corniculatus L.* bitkisi ve tohum tanesi

Lotus cinsi, kserofitik çöl ve alpin uzun ömürlü ve tuza dayanıklı türlerini de içeren iki yüzden fazla türden oluşur. *Lotus* türünün bölgesel merkezi türlerin en fazla çeşitliliğinin ortaya çıktığı Akdeniz havzasıdır [130].

Şekil 1.12'de görüldüğü gibi *Lotus corniculatus*, taç, yükselen gövdeler, beş yaprakçık, sarı çiçekler ve bir kökü bulunan çok yıllık bir baklagildir. Diğer ismi Gazelboynuzu olan bu tür, Kuzey Amerika, Avrupa'nın ve tüm Asya bölgelerinin çeşitli bölgelerinde, Brezilya, Arjantin, Şili ve Uruguay dahil olmak üzere Güney Amerika'nın çeşitli ülkelerinde, Hindistan, Avustralya, Yeni Zelanda ve Türkiye bölgelerinde yetişmektedir [138, 139]. Uzun pediküle tutturulmuş 4-8 çiçeği olan yapısından dolayı "gazelboynuzu" denilmiştir. Tohumun baklaya dönüşümü sırasında bakla bir kuş türüne benzeyen ayak şeklini alır (Birdsfoot trefoil). Boyu 10-40 cm arasında değişkenlik gösterip çiçeklenme zamanı genel olarak Haziran-Ağustos ayları arasındadır. İlk olarak 1597'de Avrupa'da tanımlanmış olan bu tür, daha sonra Kuzey Amerika'da bir milyonun üzerinde yem bitkisi olarak yayılım göstermiştir. Toprak, pH, yetişme koşulları ve nem oranı çok değişken koşullar altında büyüyebilir. [130].

Lotus, genellikle baklagiller arasında yüksek flavonoid içerikleriyle bilinir, bu yüzden tıbbi kullanımı oldukça yaygındır. Astringent (yeşil çayın sıkılaştırıcı etkisi gibi etkiye sahip), idrar söktürücü, antifungal, antipiretik, ve kardiyotonik etkilerinin olduğu bilinmektedir [140]. Çiçekleri antispazmodik ve sakinleştirici etkisi ile bilinirken [141], kök parçaları gaz giderici (karminatif) ve ateş düşürücü etkisiyle bilinir [136, 142]. Ayrıca hoş kokusu sebebiyle kozmetik sektöründe de oldukça yaygın kullanımı vardır. Ancak, antikanser etkisi ile ilgili çalışmalara çok az rastlanmış olup meme kanseri ile ilgili çalışmanın literatürde mevcut olmadığı saptanmıştır.

1.5.2. *Coronilla varia L.* (Taçlı fiğ)

Alem: Plantae

Şube: Tracheophyta

Bölüm: Magnoliopsida (İki Çenekliler)

Takım: Fabales

Familya: Fabaceae (Leguminosae)

Cins: *Securigera DC.*

Tür: *Coronilla varia L. (Securigera varia (L.) Lassen*



Şekil 1.13. *Coronilla varia L.* bitkisi ve tohum tanesi

Baklagil ailesine ait olan *Coronilla varia L.* bitkisi (taçlı fiğ), Şekil 1.13'te görüldüğü gibi yüksekliği 1 metreye kadar olan kanopi şeklinde yoğun standlara sahiptir ve yaprakçık sayısı 9-25 arasında değişkenlik gösterir. Çoğu kanopinin üst yüzeyinde yer alan saplar açılı ve oyuktur. Çiçekleri hoş kokulu olup renkleri beyazdan mora doğru değişkenlik gösterir. Bitki parçası, kök üzerinde tomurcuklarından filizlenerek yukarı doğru gelişir [130].

Son zamanlarda Akdeniz bölgesinde de yaygın olan taçlı fiğ, daha çok orta ve Güney Avrupa ve Kuzey Afrika'da yaygın bir şekilde yetişmektedir. Bu bitki, önceleri Kuzey Amerika'ya çok yıllık bir çiçek olarak ve Avrupa'dan ithal edilen yonca veya yonca tohumunun bir kontaminasyon türü olarak tanıtılmıştır. Daha sonra Amerika'da baklagil tarlalarında yetiştirilmeye başlanmıştır [130].

Taçlı fiğ, optimum pH aralığı 6.5-7 arasında olan topraklarda yetişir, ancak daha asidik topraklarda da yetişebileceği keşfedilmiştir [130].

Taçlı fiğ, ilk zamanlar Amerika'da erozyonun kontrol edilmesi için kullanılıyordu. Şu anda ise oldukça yayılış göstermiş olup, prostat hastalıklarının tedavisinde ve diüretik bir kalp toniği gibi birçok tıbbi kullanımı mevcuttur [143]. Nitroglikositlerin varlığından dolayı atlar için toksiktir, çok miktarda tüketilirse, yavaş büyümeye,

felce ve hatta ölüme neden olabilir. Bitki, “koronilin” adı verilen toksik bir glikozit zehir maddesi içerir. Bu nedenle İngiltere'de yetişen en zehirli bitkilerden biri olduğu bilinmektedir [144].

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar

Bitkilerden şifa kaynağı olarak ilaç hammadde elde edilmesi, en eski yazılı kanıtı Nagpur'dan yaklaşık 5000 yıllık bir Sümer kil levhasının bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu prospektüs, haşhaş, henbane ve mandrake gibi alkaloidleri de içeren iki yüz elliden fazla bitki içeren 12 adet tariften oluşmuştur [145].

Birçok kanser hastası tamamlayıcı ve alternatif tedaviler kullanır. Tamamlayıcı ve alternatif tıp, standart bakıma ek olarak, standart tedavilerin bir parçası olmayan tıbbi ürünler ve uygulamaları ifade eder. Bu tedaviler, yüzyıllardır dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, alternatif tedavilerin standart tedavilerle birlikte meme kanseri hastalarına önerilmesinde dikkate değer bir artış olmuştur. Standart ve alternatif tedavi kombinasyonu, bütünleştirici tıp olarak bilinir [146].

Ulusal Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Merkezi (NCCAM), tamamlayıcı ve alternatif tıbbı, geleneksel tıbbın bir parçası olarak görülmeyen çeşitli tıbbi sistemler, uygulamalar ve ürünler grubu olarak tanımlamıştır [147]. NCCAM, tamamlayıcı ve alternatif tedavileri (TAT) beş ana kategoride sınıflandırır; bunlar: (1) tüm tıbbi sistemler gibi geleneksel tıbbi uygulamalar; (2) zihin-beden müdahaleleri; (3) biyolojik madde bazlı uygulamalar; (4) manipülatif ve beden temelli uygulamalar; ve (5) enerji tıbbıdır [148].

Kanser insidansı büyük ölçüde beslenmenin birincil olduğu yaşam tarzı faktörleriyle ilişkilidir. Buna göre, birçok doğal beslenme ürününün kanser için tamamlayıcı veya alternatif tedavi olabileceği gösterilmiştir [149]. Bu noktada bitkiler, kanser hastaları tarafından en sık kullanılan TAT'ler içerisine girer. Bu nedenle, bitki kökenli ilaçları (fitotıp) meme kanserinin önlenmesi ve tedavisindeki etkisini anlamak önemlidir [150]. Bitkisel ilaç aynı zamanda fitotıp, fitoterapi veya botanik tıp olarak da bilinir. Bitki parçaları, coğrafi bölgeye, hasat mevsimine, hasat sonrası işleme ve depolamaya göre değişebilen birkaç biyoaktif maddeden oluşur. Bu faktörler ayrıca

bitkilerin biyoaktif bileşiklerinin bileşimini ve konsantrasyonunu önemli ölçüde etkiler. Standart kanser tedavisinde kullanılan çok sayıda modern ilaç bitkilerden yapılır. Paklitaksel (Taxol), vinblastin, vincristine, topotekan, irinotekan, etoposid ve teniposid, FDA (Foof and Drug Administration) tarafından kanser tedavisi için onaylanan klasik bitki kaynaklı ilaç örnekleri arasındadır. Geleneksel tedavi uygulamaları, etkili ilaç tedavisi için bileşikler arasındaki hassas kimyasal dengeyi korumak için bütün bitki veya özüt veya bitki karışımlarını kullanır [146].

Fitokimyasallar biyosentetik kökenlerine göre sınıflandırılır. Bunlar, flavonoidler, karotenoidler, fenolikler, alkaloidler, steroidler, terpenoidler, saponinler, taninler, glikozitler ve proteinlerdir ve bu kimyasallar meme kanseri ilaç geliştirmesinde tek veya kombine terapötik ajanlar olarak kullanılırlar [151]. Bitkilerden elde edilen fitokimyasallar, kanser tedavisi için güvenlik ve düşük toksisite nedeniyle diğer kaynaklardan daha yaygın olarak kullanılır. Tümör gelişimi, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren başlangıç, ilerleme ve metastaz için çoklu adımlarla gerçekleşir [152]. Fitokimyasallar, çeşitli sinyal yollarını etkileyerek antianjiyogenik, antienflamatuar, antioksidant, antiproliferatif ve proapoptotik etkiler gösterir [146].

19. yüzyılın başlarında, tıbbi bitkilerden alkaloidlerin keşfedilmesi, bilimsel bitki kökenli ilaç çalışmalarının başlangıcını oluşturmuştur [145]. Bitkiler, alkaloitleri doğal olarak üretir. Bu alkaloidler, bitki için patojen organizmalara karşı önemli bir savunma mekanizması görevi gören sekonder metabolik yolaklardan üretilir [153]. Alkaloidler çoğunlukla Ranunculaceae, Leguminosae, Papaveraceae, Menispermaceae ve Loganiaceae familyalarına ait yüksek bitkilerde bulunur [146].

Diğer bir fitokimyasal grubu olan polifenoller meyvelerde, sebzelerde, baharatlarda, kuruyemişlerde, tahıllarda, çay, kahve ve şarapta yaygın olarak bulunur. Bitki sınıfında yaklaşık 8000 tip polifenol tanımlanmıştır. Literatürde bahsedildiği üzere nanoparçacıklarla polifenollerin kombinasyonları ile son zamanlarda etkin tedavi stratejileri oluşturulmuştur [154].

Epidemiyolojik veriler flavonoidlerin meme kanseri riskini azalttığını göstermiştir. Flavonoidler ve nonflavonoidler iki ana polifenol grubudur. Flavonoidler meyve ve

sebzelerde çok fazla miktarda bulunur ve çeşitli biyolojik aktivitelere katılırlar. Flavonoidlerin alt sınıfları, flavonoller, flavonlar, flavan-3-ol, antosiyanidinler, flavanonlar ve izoflavonlardan oluşur. Nonflavonoidler fenolik asitleri, (benzoik asitler ve sinamik asitler), stilbenler, liganlar, tanenler ve kurkumin, rosmarinik asit ve gingerol gibi diğer polifenolleri içerirler. Flavonoidler, polifenollerin % 60'ını ve fenolik asitler %30'unu oluşturur [155, 156]. Her ne kadar flavonoidler, meme kanseri tedavisinde hücre içi sinyal yolakları hedef alan, klinik deneylerde önem teşkil eden kimyasallar olsalar da meme kanserinde henüz hiçbir doğal flavonoidin onaylanmadığı bilinmektedir. Ancak, doğal flavonoidlerin yapısı kemopreventif ve terapötik ajanların gelişimi için önemli bir model görevi görmüştür [157]. Oldukça zengin flavonoidleri içeren çay, sebze ve meyvelerin yanında, yeşil ve diğer çaylar flavonoid olarak zengin içeriklerin yaklaşık %25'ini oluşturur [157].

Bitki kökenli doğal ürünlerin %60'ından fazlası aynı zamanda izoprenoid olarak da bilinen terpenoidlerdir. Terpenoidler aromatik olarak geleneksel tıpta önemli bir rol oynamaktadır. Terpenoidler okaliptüsün kokusundan, tarçın, karanfil, zencefilin aromalarından, ve domates ve ayçiçeklerinin renginden sorumlu sekonder metabolitlerdir. Terpenoitler genel olarak monoterpenoidler, diterpenoidler, triterpenoidler, tetraterpenoidler, karotenoidler, seskiterpenoidler, uçucu yağlar, reçineler, oleoresinler, oleogum reçineleri ve balzamlar olarak sınıflandırılır. Triterpenoidlerin kemopreventif ve antikanser potansiyeli, hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde, antiinflamatuar, antiproliferatif, proapoptotik ve antianjiyogenik etkileri ile bilinir [146].

Çeşitli araştırmalar, sanayileşmiş ülkelerdeki nüfusun %30 ile %50'sinin, sağlıkla ilgili çeşitli komplikasyonları önlemek veya tedavi etmek için alternatif tıbbı kullandığını ortaya koymuştur [158]. Kadınların neredeyse %80'i alternatif tıbbı kullanmaktadır [147]. Analizlere göre, özellikle meme kanserlerinden kurtulanların yaklaşık %80'inin alternatif tıptan yararlandığını ortaya koymuştur [147].

Polifenollerin hücre döngüsü düzenleyici proteinler üzerindeki modülatör etkileri çeşitli araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır. Hücre döngüsü düzenleyici proteinleri, apoptozinin içsel yolunda (*Bax* ve *Bcl-2* gibi) merkezi bir düzenleyici role sahiptir

[159]. Örneğin, literatüre bakıldığında Arabinogalaktan ve kurkumin kombinasyonu Bax/Bcl2 oranında belirgin bir artışa neden olmuş ve böylece kaspaz 3'ün aktivasyonu ile apoptozu başlatmıştır. Ayrıca, Ki67 de, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarında etkileri olan hücresel proliferasyonda bulunan bir nükleer proteindir [160]. Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi doğal terapi olan Arabinogalaktan ve kurkumin ile kombine tedavi, apoptoza yol açan tümör baskılayıcı p53 geninin ekspresyon seviyesinin eşzamanlı bir şekilde indükleyerek bu proteinin (Ki67) ekspresyon seviyesini de önemli ölçüde inhibe etmiştir [161, 162].



Şekil 2.1. Polifenollerin hücre döngüsü düzenleyici proteinler üzerindeki etkisi

Bu çalışmada, Fabaceae familyasına ait iki bitki türü olan *Lotus corniculatus L.* ve *Coronilla varia* bitki ektrelerinin oksidatif strese karşı DNA koruma özellikleri ile MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin moleküler seviyede analiz edilmesi ve anti-metastatik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bitki Türleri

Bu çalışmada, Fabaceae Familyasına ait *L. corniculatus* ve *C. varia* iki bitki türü kullanılmıştır. Bitkiler Konya'da araziden toplanmış olup, Doç. Dr. Evren Yıldıztugay tarafından Türkiye Florasındaki teşhis anahtarına göre Konya'da teşhis edilmiştir. Çalışılan bitkilerden *L. corniculatus* ve *C. varia* bitkisinde topraküstü kısımlar kullanılmıştır. Bitki ekstraktları analizler için +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde, Kit ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, çoğunlukla Sigma Aldrich ve MERCK'den temin edilmiştir. Çalışmada derin dondurucu -20°C - buzdolabı +4 (Arçelik 4252N, Türkiye), derin dondurucu -82°C (Glacier Nuaire Nu-9668E, Meksika), distile su cihazı (Protek Lab, Türkiye), buz makinesi (Hoshizaki, Avrupa Ltd.), Thermal Cycler ısı bloğu (Thermo, ABD), Thermo-Shaker (Biosan Ts-100, Letonya), hassas terazi (Presica 350-8519, İsviçre), mikropipet (Thermo, ABD), mikrosantrifüj (N2631-0007 Star Lab, Kore), multipurpose vorteks (Wisd Laboratory Ġnstruments, Kore), phmetre (Jenco Quality Instruments, Çin), manyetik karıştırıcı (Wisd Laboratory MSH-20A, Kore), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), spektrofotometre Nano Drop (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya), soğutmalı santrifüj (Hetrich Micro 220/220R, Almanya), elektroforez (Thermo Scientific EC1000XL2 ve EC300XL2, ABD), jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa), PCR (Thermo, ABD), Real time PCR (Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Qiagen, Almanya), otoklav (Nüve, Türkiye), Biosafety cabinet Class II (Tezsan, Türkiye), Genejet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA), DNase I, (RNase-free Thermo Scientific, ABD), iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD, ABD), SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, ABD), PZR reaksiyon tüpü (Greiner bio-one, ABD), Agaroz (Applichem, Almanya), Nucleic Acid Staining

Solution-Jel Boyası (İntron Biotechology), GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) Abcam DNA Ladder Detection Kit (Cambridge, İngiltere). İzopropanol (Applichem, Almanya), etanol (Kimetsan, Türkiye), β-mercaptoethanol, EDTA (Applichem, Almanya), Asetik Asit (Glasiyal Asit, Merck), 6X DNA Jel Yükleme Boyası (Thermo Fisher Scientific, ABD), GeneRuler 100 bp DNA Belirteci (Thermo Fisher Scientific, ABD), Tris (Applichem, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Agaroz jel elektroforezi için 1X Tris EDTA asetat (TAE) tamponu hazırlanmıştır. TAE tamponu 40 mM tris, 20 mM glasiyel asetik asit ve 1 mM EDTA (pH:8) karışımının 1 L saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Fenton karışımı 30 mM H_2O_2, 50 mM askorbik asit, and 80 mM $FeCI_3$ ile distile su içerisinde hazırlanmıştır. 4^oC'de muhafaza edilmiştir.

MTT (3-(4,5-Dimetyazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) çözeltisi için 50 ml %0.5 FBS içeren DMEM besiyerine 0.025 gr MTT ilave edilmiş, MTT çözünene kadar vortex yardımıyla iyice karıştırılmıştır.

40 mM HCl/izopropanol çözeltisi için 49.835 ml izopropanol üzerine 165.5 µl HCl ilave edilmiştir.

Seyreltme solüsyonu hazırlamak için 4.4 ml %3 SDS içine 22 ml 40 mM HCl eklenmiştir.

3.1.4. Kullanılan Hücre Hatları

MCF-7 meme kanseri hücreleri Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden, MDA-MB-231 hücreleri Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.5. Hücreler için Kullanılan Kimyasal Madde ve Besiyerleri

DMEM besiyeri (Gibco ™ high glucose, fisher scientific, USA), L-glutamin (Gibco, 200 mM, USA), human insülin solution (Santa Cruz Biotechnology, USA), non-essential amino acid (Gibco ™ MEM 100X, USA), dimetilsülfoksit (DMSO for cell culture, PAN biotech, Almanya), fosfat buffer saline (PBS, Gibco lifesciences, 10X, USA), tripan mavisi Gibco ™ trypan blue solution, 0.4%, USA), izopropanol (Applichem, Almanya), etanol (Kimetsan, Türkiye), tripsin-EDTA, Mitomycin C (Sigma aldrich, Almanya), Fetal Bovine Serum (qualified, heat inactivated,Thermo Fisher, USA), Trypsin-EDTA (0.25%, biological industries, Israel), MTT (Thermo Fisher, USA), Penicillin-Streptomycin (10,000 U/Ml, Thermo Fisher, USA), Sodium Dodecyl Sulfate (Thermo Scientific, USA).

3.1.6. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

Laminar kabin, (Bilser, Türkiye), CO_2 inkübatörü (Nuaire, USA), Otoklav (Nüve, Türkiye), Buzdolabı (Samsung, Güney Kore), Santrifüj (Hettich Universal 320 R, USA), Ters mikroskop (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya), etüv (Nüve, Türkiye) cihazları kullanılmıştır. Hemositometre (Thomalam, Marienfeld, 0,1 mm, Neubauer-improved, Almanya) hücre sayım işlemi için kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre petrileri, 96-kuyucuklu hücre petrileri, 75 cm^2 hücre büyütme kapları (flask), 100x20 mm petri kapları, 10 ml serolojik pipetler, 0,22 μm şırınga filtreleri, hücre kazıyıcı, 10-25 cc şırıngalar, kriyotüpler Sigma-Aldrich'den satın alınmıştır (SigmaAldrich, USA).

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Ekstraktları Hazırlanışı

Bitki ekstraktları Konya Selçuk Üniversitesi Biyoloji bölümünde Doç. Dr. Gökhan Zengin tarafından hazırlanmıştır. Bitkilerin topraküstü parçaları gölgede yaklaşık 10 gün bekletilerek oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra örnekler laboratuvar değirmeni kullanılarak ufalanarak toz haline getirilmiştir. Metanol (MeOH) ve etil asetat (EA) ekstraktları, 5 gram bitki numunesinin 100 ml kendi çözücülerinde (metanol ve etilasetat) gece boyunca maserasyon yöntemi (ıslatarak yumuşatma; soğuk infüzyon yöntemi) ile bekletilmesiyle hazırlanmıştır. Ekstraktlar, daha sonra filtrelenmiş ve döner bir buharlaştırıcı kullanılarak 40°C'de vakumda konsantre edilmiştir. Su ekstraktları geleneksel infüzyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. İnfüzyon, 5 gram bitki materyalinin 100 ml kaynar suda demlenmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen karışımlar filtre edilmiş ve liyofilizatör yardımıyla kurutulmuştur.

3.2.2. Bitki Ekstraktları Fenolik İçerik Tayini

Bitki ekstraktları fenolik içerik tayini Pavol Jozef Šafárik Üniversitesi Kösice, Kösice, Slovakya'da hizmetiçi alım yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sıvı kromatografi, Dionex Ultimate 3000RS UHPLC sistemi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Numuneler, bir Thermo Accucore C18 (100 mm x 2.1 mm) kolonunda ayrıştırılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. UHPLC sistemi, elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış bir Thermo Q Eksaktif Orbitrap kütle spektrofotometresine (Thermo Scientific, ABD) birleştirilmiştir. Verilerin toplanması ve analizinde Thermo Scientific Xcalibur 4.0 ve TraceFinder 3.1 yazılımları (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Tablolarda, standartlar tarafından doğrulanan bileşikler işaretlenmiştir. Her durumda, bileşiklerin tanımlanması için tam moleküler kütle, izotopik düzen, karakteristik fragman iyonları ve alıkonma süresi (retention time) kullanılmıştır.

3.2.3. DNA Koruma Aktivite Analizi

Metanol, etilasetat ve su içerisinde hazırlanan bitki ekstraktlarından 10 mg/ml stok çözeltisi hazırlamak için metanol ve etilasetat ekstraktları metanolde çözülmüş, su ekstraktları su içerisinde çözülmüştür. Ekstraktlar milipor filtreden geçirildikten sonra steril edilmiştir. Daha sonra bu stok çözeltisinden alınarak konsantrasyon miktarlarına göre seyreltmeler yapılmıştır. DNA koruma aktivite analizi için *E.coli* suşundan elde edilen pUC19 plazmit DNA (pDNA) kullanılmıştır. Plazmit eldesi için 1:1000 oranında (100 mg/ml stoktan alınan) ampisilin antibiyotiği içeren 5 ml LB broth besiyerinde *E.coli* bakterisi bir gece 180 rpm 37ºC'de büyütülmüştür. Antibiyotik seçilimi sayesinde ortamda elde edilen pUC19 plazmitlerinin izolasyonu Thermo Scientific Genejet Plasmid Miniprep Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteri pelletleri 250 µl resüspansiyon çözeltisi kullanılarak süspanse edilmiştir. Daha sonra 250 µl lizis solüsyonu eklenmiştir. 350 µl nötralizasyon solüsyonu ilave edildikten sonra 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazdaki solüsyon GeneJET toplama tüpüne alındıktan sonra 1 dakika süreyle 12 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı atıldıktan sonra 500 µl etanol içeren yıkama solüsyonu ilave edilmiş ve 1 dakika süreyle 12 000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst fazdaki solüsyon atıldıktan sonra toplama tüpü tekrar filtre tüpüne yerleştirilmiş ve yıkama aşaması tekrar edilmiştir. Daha sonra toplama tüpü 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınmış ve daha önce 70ºC'de ısıtılan elüsyon buffer ilave edilmiştir. 2 dakika oda sıcaklığında DNA'ların inkübasyonu sağlandıktan sonra 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. DNA'ların saflık ve kaliteleri spektrofotometrede (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya) 260/280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen DNA'lar analizler için kullanılmak üzere -20ºC'de muhafaza edilmiştir. DNA koruma aktivitesi analizi için DNA'da hasara sebep olan oksidatif madde olarak Fenton karışımı kullanılmıştır. Fenton karışımı, 30 mM H_2O_2, 50 mM askorbik asit, and 80 mM $FeCI_3$ ile distile su içerisinde hazırlanmış olup güneş ışığından uzak tutmak için falkon tüpü aluminyum folyo ile sarılmıştır. Reaksiyon hacmi 5 µl Fenton karışımı, 5 µl 10 mg/ml veya 5 mg/ml bitki ekstraktları ve 300 µg/µl pUC19 plazmitten oluşmuştur. Son hacim saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Pozitif kontrol fenton karışımı, plazmit ve sudan oluşurken negatif kontrol plazmit ve sudan oluşmuştur. Reaksiyon tüpleri hazırlandıktan sonra 37ºC'de 30 dakika Thermal

Cycler ısı bloğunda (Thermo, ABD) inkübasyona bırakılmıştır. Bu sırada %0,8'lik agaroz tartılarak 100 ml TAE buffer içerisinde mikrodalga fırında eriyerek çözünmesi sağlanmış, daha sonra biraz soğutulup içerisine 5 µl Redsafe (Nucleic Acid Staining Solution) jel boyası konulmuştur. Hazırlanan jel, elektroforez tankına dökülmüş ve taraklar yerleştirilerek donması için beklenmiştir. İnkübasyon sonunda örneklere 6x yürütme solüsyonu ilave edildikten sonra %0,8'lik agaroz içeren jele yüklenmiş ve elektroforezde 100V elektrik akımı uygulanarak DNA bantları ayrıştırılmıştır. Daha sonra jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülenmiş, fotoğrafları çekilmiştir. Bant boyutları görüntüleme cihazındaki kantitatif metot kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir analizin 3 biyolojik tekrarı yapılmış olup istatistiki analizler tek yönlü-ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır ve p değeri $< 0,05$ ise farklılık anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.2.4. Kanser Hücrelerinde Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.4.1. Bitki ekstraktlarının hücre kültürü için hazırlanışı

Bitki ekstraktlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için 10 mg/ml stok bitki çözeltileri metanol ve etilasetat ekstraktları için %0,1 DMSO içeren sulu çözelti içerinde hazırlanmıştır. Su ekstraktları 1X PBS içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm por çaplı filtreden şırıngadan geçirilerek kullanılmadan önce steril edilmesi sağlanmıştır. Steril ekstraktlar kullanılıncaya kadar -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.2. Hücre sayımı ve hücre ekimi

Triple negatif invazif MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 pennicilin/streptomycin, %1 NEAA (Non-essential Aminoacid), 0,01 mg/ml human insulin içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır. Östrojen reseptör pozitif MCF-7 meme kanseri hücreleri 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 2mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır. Stok kültürler 75 cm² steril flasklarda, deney kültürleri ise

96-kuyucuklu ve 6-kuyucuklu hücre petrileri ve 100x20 mm hücre petri kaplarında çoğaltılmıştır. Hücre pasajı genellikle hücreler logaritmik fazdayken (~%80 yoğunlukta) gerçekleştirilmiştir. Hücreler %0.25'lik PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml %0.25 tripsin-EDTA (1X PBS içerisinde hazırlandı) flasklara ilave edilmiştir. Yapışan hücrelerin %0.25 tripsin-EDTA yardımıyla flask tabanından ayrılması için hücreler yaklaşık 5 dakika inkübatörde bekletilmiş, ters mikroskop ile (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) 10X objektif altında kontrol edilmiştir. Hücreleri tripsinden arındırmak için hücre süspansiyonu karışımı 15 ml'lik falkon tüpe alınıp 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz aspire edilmiştir. Pellet 1 ml taze besiyeri içerisinde çözüldükten sonra hücreler yeni flasklara veya deney için thoma lamda %0,4 tripan mavisi boyası kullanılarak sayılıp hücre petrilerinin uygun hacimleri doğrultusunda yeterli sayıda hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bunu için mililitredeki hücre sayısı hemositometrede hesaplandıktan sonra 96-kuyucuklu petride 10 000 hücre, 6-kuyucuklu petride 500 000 ve 100x20 mm petrilerde ise

2 000 000 hücre olacak şekilde hücre ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak hücre yoğunluğu ~%80'e ulaştığı zaman gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. MTT hücre canlılık testi

96 kuyucuklu petrilere ekilen 10 000 hücre, 37˚C, %5 CO_2 ortamda logaritmik faza ulaşana kadar yaklaşık 24 saat inkübe edilmiştir. Logaritmik fazdaki hücreler taçlı fiğ ve gazelboynuzu bitki ekstraktlarının MeOH, EA ve sulu ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile (62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat muamele edilerek inkübatöre kaldırılmıştır. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO içeren su çözeltisiyle muamele edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra besiyeri aspire edilmiştir. Her petriye, 0,5 µg/µl MTT ve %0,5 FBS içeren besiyeri konulmuştur. Petriler inkübatörde 4 saat süre ile ışık almayacak şekilde inkübe edilmiştir. 4 saat sonra petrilerdeki MTT içeren besiyeri aspire edilmiştir. Her petriye %3 SDS eklenip 5 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Sonra 40 mM HCl/izopropanol konulup 15 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Pipetleme işlemi yapılarak formazon kristallerinin çözülmesi sağlanmış, homojenize edilmiştir. %3

SDS + 40 mM HCl/izopropanol seyreltme solüsyonu ilave edildikten sonra örnekler spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda absorbans değeri belirlemek için ölçülmüştür [163].

3.2.4.4. Hücreler için inhibitör ekstrakt konsantrasyonlarının (IC_{50}) belirlenmesi

MTT testiyle elde edilen absorbans değerleri GraphPad Prism 7.04 programında analiz edilerek bitki ekstraktlarının meme kanseri hücreleri için IC_{50} değerleri (hücrelerin %50'sini öldüren ekstrakt konsantrasyonu) belirlendi. IC_{50} konsantrasyonu, kanser hücreleri için potansiyel ilaç adayı olabilecek maddelerin biyolojik proseslerdeki fonksiyonunu moleküler seviyede belirlemek için oldukça önemli bir değerdir. Çalışmanın *in vitro* moleküler analiz kısmında ekstraktların seçilen en düşük konsantrasyonları kullanılmıştır.

3.2.4.5. Apoptotik, otofajik ve telomeraz gen ifade analizleri

Total RNA izolasyonu için 200x20 mm polistren petrilere ekilen 2 000 000 hücre, ekstraktların seçilen en düşük IC_{50} değerleriyle belirli saat süreyle muamelesi sonrası toplanmış ve kuru hücre pelleti izolasyon basamağı için -80˚C derin dondurucuda 15 günü geçmeyecek şekilde muhafaza edilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO içeren su çözeltisiyle muamele edilmişlerdir.

3.2.4.5.1. Hücreden total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlem basamakları sırasıyla gösterilmiştir;

1. 1 ml Lizis buffer içerisine 20 µl 14,2 M β-merkaptoetanol ilave edilmesiyle hücre patlatma solüsyonu (lizis) hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 600 µl kullanılarak pelletler pipetleme yapılarak süspanse edilmiştir.

2. 360 µl %96'lık etanol ilave edilmiş ve yavaşça pipetleme yapılmıştır.

3. Çözeltinin tamamı GeneJET RNA toplama tüpüne aktarılmış ve oda sıcaklığında 15 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Santrifüj sonrası toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra 700 µl etanol içeren yıkama solüsyonu 1 ilave edilmiş ve 15 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Santrifüj sonrası toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra 600 µl etanol içeren yıkama solüsyonu 2 ilave edilmiş ve 15 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Santrifüj sonrası toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra 250 µl daha etanol içeren yıkama solüsyonu 2 ilave edilmiş ve 15 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

7. Santrifüj sonrası toplama tüpü atılmış ve RNA içeren filtreli tüp yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirilmiştir.

8. Filtre tüpünde bulunan RNA 100 µl nükleaz içermeyen su içerisinde 15 000 x g'de 2 dakika santrifüj edilerek akıtılmıştır.

9. Elde edilen RNA örneklerinin saflık ve kalite durumunu ölçmek amacıyla spektrofotometre (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya) cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine bakılmıştır.

10. Son olarak %1'lik agaroz jel elektroforezinde de RNA bantlarının kalitesinden emin olunmuştur. Agaroz jel elektroforezi hazırlamak için 100 ml TAE buffer içerisinde 1 gr agaroz çözülmüştür. Daha sonra içerisine 5 µl Redsafe (Nucleic Acid Staining Solution) jel boyası ilave edilmiş ve donması için beklenmiştir. RNA bantları Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa) marka jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.4.5.2. DNaz muamelesi

RNA izolasyonu sonrası RNA'lar *DNaz* ile muamele edilmiş ve böylece DNA bulaşkanı uzaklaştırılmıştır. Bunun için *DNase* 1 (Thermo scientific, USA) kit kullanılmıştır. Kullanılan solüsyon ve miktarlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. *DNaz* için kullanılacak miktarlar RNA örneklerinin konsantrasyonlarına göre hesaplanmıştır. 10X $MgCl_2$ tampon solüsyonu, RNA ve Dnaz 1 enzimi ilave edildikten sonra reaksiyon son hacmi 10 µl'ye tamamlanmış ve Thermalcycler (Thermo) cihazında 37˚C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra reaksiyon tüplerine 1 µl 50 mM EDTA ilave edilip Thermalcycler'da 65˚C'de 10 dakika inkübasyon sağlanmıştır.

Tablo 3.1. *DNaz reaksiyon bileşenleri ve miktarları*

DNaz Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
RNA	1µg
10x $MgCl_2$ içeren reaksiyon tamponu	1µl
Dnaz I	1µl (1U)
Nükleaz içermeyen su	Son hacim 10 µl' ye tamamlandı.
50 mM EDTA	1µl

3.2.4.5.3. Komplementer DNA sentezi

DNaz muamelesi sonrası temizlenen RNA örnekleri, iScript cDNA synthesis kit (BIO-RAD, ABD) kiti kullanılarak, kitte bulunan revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA'ya dönüştürülmüştür. Reaksiyon miktarları Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. *Komplementer DNA sentezi bileşenleri*

Komplementer DNA sentezi bileşenleri	Miktar
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4 µl
iScript Ters Transkriptaz Enzimi	1 µl
RNA	2 µg
Nükleaz içermeyen su	Reaksiyon son hacmi 20 µl' ye tamamlandı.

Reaksiyon sırasıyla 5x iScript Reaksiyon Karışımı, RNA, iScript Ters Transkriptaz enzimi konulduktan sonra su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 5 dakika 25^{o}C'de, 20 dakika 46^{o}C'de ve 1 dakika 95^{o}C sıcaklıkta thermalcycler'da reaksiyon inkübe edilmiş ve cDNA eldesi sağlanmıştır. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 ^{o}C'de saklanmıştır.

3.2.4.5.4. Polimeraz zincir (PZR) reaksiyonu

Apoptotik, otofajik ve telomeraz (*Bax*, *Bcl-2*, *Beclin-1*, *LC3-II* ve *TERT-1*) aktivitesi gen ifade analizlerinde kullanılan primer çiftlerine en uygun bağlanma sıcaklığının belirlenmesi için her bir primer çiftine cDNA'lar kullanılarak sıcaklık gradiyenti yöntemiyle klasik PZR yapılmıştır. PZR'da kullanılan bileşen ve miktarları Tablo 3.4.'te verilmiş, PZR reksiyon koşulları ve sıcaklıkları ise Tablo 3.3.'te verilmiştir. PZR reaksiyonu thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiş olup akabinde PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde 110 Voltta 45 dakika yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazında (Quantum ST5) bantlar görüntülenmiştir. PZR reaksiyon sonrası uygun bant oluşturan ürünler gen ifade analizlerinin tespiti için bir sonraki analiz olan gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılmıştır. Primer çiftleri için optimize edilen bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.5.'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. *PZR reaksiyon koşulları ve sıcaklıkları*

Reaksiyon adımları	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	1 dakika	35
Primer bağlanması	55-58°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	7 dakika	1

Tablo 3.4. *PZR reaksiyonu için gereken bileşen ve miktarları*

Reaksiyon için gerekli bileşenler	**1 PZR tüpü için gerekli miktar**
10X tag buffer	2 µl
dNTP karışımı	2 µl
$MgCl_2$	3 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
Tag DNA Polimeraz	0,5 µl
Kalıp cDNA	100 ng
Nükleaz içermeyen su	Son hacim su ile 20 µl'ye tamamlandı.

3.2.4.5.5. Gerçek zamanlı PZR analizi

Klasik PZR yöntemiyle kalıp DNA'ların primer çiftlerine bağlanma sıcaklıkları optimize edildikten sonra gen ifade analizlerinin tespiti için gerçek zamanlı PZR yapılmıştır.

Tablo 3.5. *PZR reaksiyonu için kullanılan primerler ve bağlanma sıcaklıkları*

Primer adı	Primer yönü	Primer dizisi (5'->3')	Primer uzunluğu (bç)	GC oranı (%)	Optimize edilen bağlanma sıcaklığı
Bax	Forward	CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG	21	57	57°C
	Reverse	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT	21	52	
Bcl-2	Forward	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	19	63	57°C
	Reverse	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	22	54	
Beclin-1	Forward	GGCTGAGAGACTGGATCAGG	20	60	57°C
	Reverse	CTGCGTCTGGGCATAACG	18	61	
LC3-II	Forward	GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG	22	54	57°C
	Reverse	GTGTCCGTTCACCAACAGGAAG	22	54	
TERT-1	Forward	GGATGAAGCGGAGTCTGGA	19	55	57°C
	Reverse	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA	20	58	
GAPDH	Forward	GGACTGACCTGCCGTCTAG	19	63	57°C
	Reverse	TAGCCCAGGATGCCCTTGAG	20	60	

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu için her bir deney aşaması üç tekrar olarak gerçekleştirilmiş olup ayrıca üç biyolojik tekrar olarak çalışılmıştır. Reaksiyon için kullanılan bileşenler ve sıcaklık şartları Tablo 3.6. ve Tablo 3.7.'de verilmiştir. Syber green için 530 nm dalga boyunda okuma yapılacak olup erime eğrisi analizi, çoğalan gen bölgesinin doğru yerde çoğalıp çoğalmadığını anlamak için yapılmıştır. Reaksiyon, Real time PCR (Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Qiagen, Almanya) cihazının 65^{o}C ile 95^{o}C arasında her bir 0,5^{o}C'lik artışta floresan sinyalleriyle okuma yapmasıyla gerçekleştirilmiştir [164].

Tablo 3.6. *Eş zamanlı PZR için kullanılan maddeler ve miktarları*

Eş zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri	Miktar
Supermix (Syber green)	10 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Kalıp cDNA	100 ng
Nükleaz içermeyen su	Son hacim su ile 20 µl'ye tamamlandı.

Tablo 3.7. *Eş zamanlı PZR reaksiyonu şartları*

Program	Sıcaklık	Okuma	Döngü Sayısı	Tepkime süresi
Başlangıç Denatürasyonu	95 ˚C	-	1	300 sn
Denatürasyon	95 ˚C	-	40	10 sn
Birleşme	57 ˚C	-		20 sn
Uzama	72 ˚C	tek		10 sn
1. Erime	95 ˚C	-	1	5 sn
2. Erime	65 ˚C	sürekli	1	60 sn
3. Erime	97 ˚C	sürekli	1	-
Soğutma	4 ˚C	-	1	10 sn

Eş zamanlı PZR reaksiyonunda karşılaştırmalı olarak gen ifade analizlerinin yapılması için referans gene ihtiyaç vardır. Referans gen, reaksiyon içerisinde kontrol görevinde olan hedef genden farklı sekans dizilerine sahip olan genlerdir. Bu çalışmada referans gen olarak "*human GAPDH*" kullanılmıştır. Gen ifade analizlerinin karşılaştırmalı analizleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplama metodu kullanılarak analiz edilmiş ve ifade seviyeleri hesaplanmıştır [165].

Her bir analizin 3 biyolojik tekrarı yapılmış olup istatistiki analizler tek yönlü-ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır ve P değeri < 0,05 ise farklılık anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.2.4.6. DNA fragmentasyon analizi ile apoptozun belirlenmesi

DNA fragmentasyon analizi yalnızca MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine uygulanmıştır. MCF-7 hücrelerinde kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak apoptoz uyarıldığı için bu hücrelerde apoptotoz belirteci olarak fragmentasyon analizi kullanılmamıştır.

2 000 000 MDA-MB-231 hücresi gazelboynuzu EA ve taçlı fiğ su ekstraktlarının en düşük IC_{50} konsantrasyonlarıyla muamele edilmişlerdir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO içeren su çözeltisiyle muamele edilmişlerdir. Hücre toplama işlemi hücre 1X PBS ile yıkama aşamasından sonra hücre kazıyıcı ile kaldırılarak gerçekleştirilmiştir. Alınan kuru hücre pelleti kullanılıncaya kadar -80^{o}C'de muhafaza edilmiştir. DNA fragmentasyon analizi Abcam DNA Ladder Detection Kit DNA izolasyonu protokolüyle gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon işlem adımları aşağıdaki gibi gösterilmiştir;

1. 35 µl TE lizis buffer ile hücreler hafifçe pipetlenerek hücre patlatma işlemi gerçekleştirilmiştir.

2. 5 µl Enzim A solüsyonu ilave edilmiş, hafifçe vorteks yapıldıktan sonra 37^{o}C'de 10 dakika Thermal Cycler ısı bloğunda (Thermo, ABD) inkübasyona bırakılmıştır.

3. İnkübasyondan sonra 5 µl Enzim B hücre tüplerine konulmuş ve gece boyu 50^{o}C'de Thermal Cycler ısı bloğunda (Thermo, ABD) inkübe edilmiştir.

4. Daha sonra 5 µl amonyum asetat çözeltisi ilave edildikten sonra pipetleme yapılarak iyice karıştırılmıştır. 50 µl soğuk izopropanol eklenip -20^{o}C'de 10 dakika bekletilmiştir.

5. Karışım 12 000 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüjlenerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır.

6. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve DNA pelleti 0,5 ml %70 etanol ile yıkanmıştır. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pellet kuruması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

7. Daha sonra kuruyan pellet, 50 µl DNA çözücü buffer içerisinde çözülmüştür.

8. DNA kalitesi ve konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo Sci. Multiskan go, Finlandiya) ölçülmüştür.

2 µg DNA örneği, 6X yürütme solüsyonu ve su içeren yaklaşık 24 µl karışım %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde 75 volt elektrik akımında 2 saat süreyle yürütülmüştür ve DNA ayrıştırılmıştır.

DNA bantları jel görüntüleme sistemi Quantum ST5 (Vilber lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülenmiş, fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.4.7. Hücre göçü testi

Pasaj sonrası 6 kuyucuklu petrilere ekilen 500 000 MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri ekimden 24 saat sonra yaklaşık %90 yoğunluğa geldikten sonra 1X PBS ile yıkanmıştır. 200 µl steril pipet ucu yardımıyla petri merkez tepe noktasından tek çizikle yara açılması sağlanmıştır. Daha sonra ekstraktların en düşük IC_{50} konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş, proliferasyonu önlemek için Mitomycin C antibiyotiği içeren besiyerlerinde 12, 24 ve 48 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan inkübatörde inkübe edilmiştir. Yara kapanma durumu 4X objektif altında ters mikroskopta (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) takip edilerek fotoğrafları çekilmiştir. Analizler üçlü grup tekrarı ve üç farklı biyolojik tekrar olarak yapılmış olup veriler tek yönlü-ANOVA test kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir ve sonuç grafikleri çizilmiştir.

3.3. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel hesaplamalar için Minitab 17 programı kullanılmış ve tüm karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

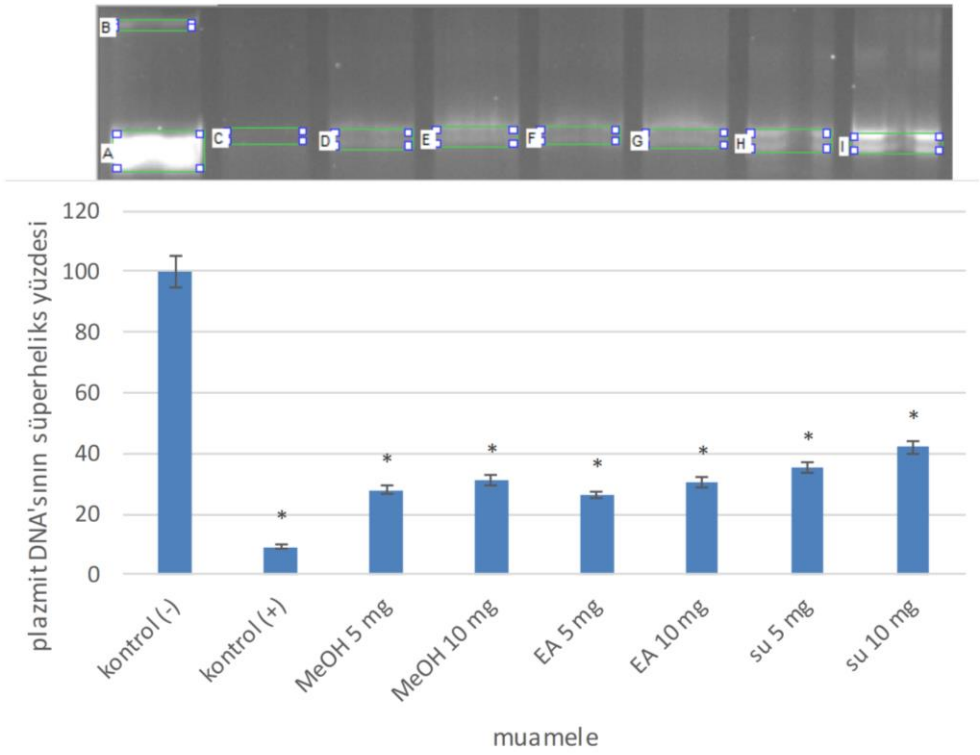
4. BULGULAR

4.1. DNA Koruma Aktivitesi

Ekstraktların DNA koruma aktivitesi özelliği, DNA'ya karşı oksidatif etki mekanizması ile hasar veren ROS türlerinden biri olan H_2O_2 (Hidrojen Peroksit) içeren Fenton karışımı ile belirlenmiştir. *Lotus corniculatus L.* ve *Coronilla varia* EA, MeOH ve su ekstraktlarına ait DNA koruma aktiviteleri 5 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlardaki yüzde grafikleri ve agaroz jel elektroforezi Şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir. Negatif kontrol yalnızca plazmit içerirken pozitif kontrol fenton karışımı ve plazmitten oluşmaktadır. Reaksiyon örnekleri ise 5 mg/ml ve 10 mg/ml ekstrakt miktarları ile fenton karışımı ve plazmit içeren tüplerde hazırlanmıştır. Son hacim su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır ve inkübasyon süresi sonunda plazmit DNA'ların durumu %0,8'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edilmiştir. Deneyler üç biyolojik tekrarda yapılmış olup istatistiki analizler tek yönlü-ANOVA test kullanılarak analiz edilmiş ve grafikleri çizilmiştir.

4.1.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları DNA Koruma Testi Sonuçları

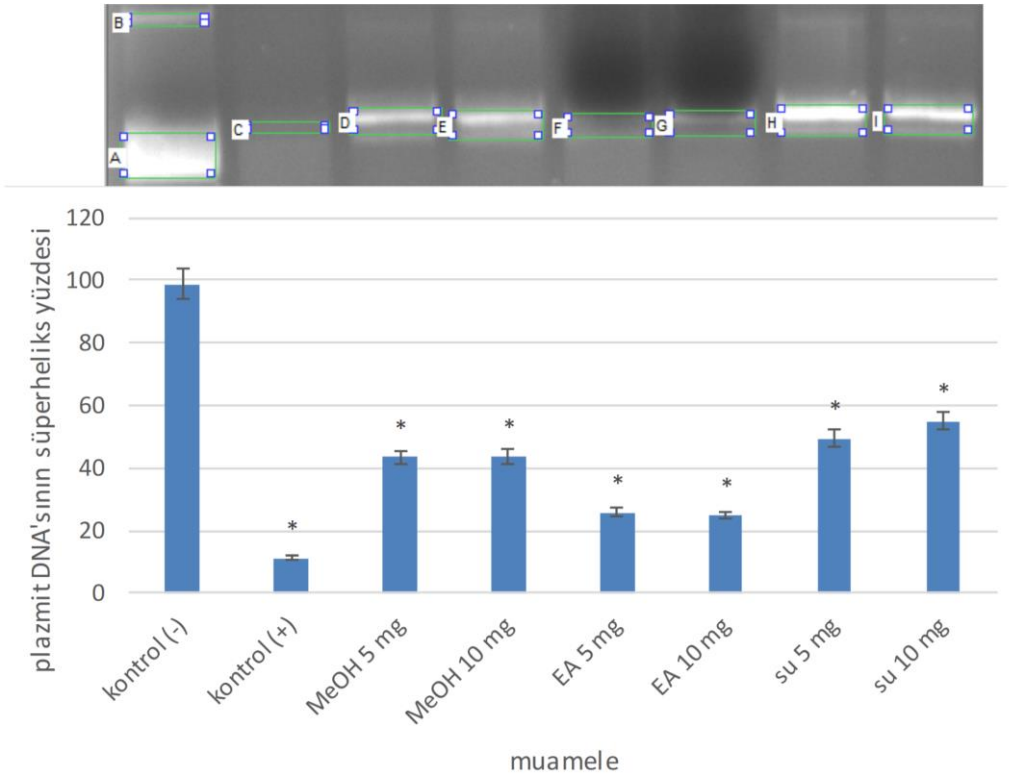
Sonuçlara göre Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi üç ekstraktın da DNA koruma etkisi gösterdiği görülmüş, en fazla koruma aktivitesi yaklaşık %45 koruma etkisi olarak su ekstraktında belirlenmiştir. MeOH ve EA ekstraktlarının ise yaklaşık %25 koruma aktivitesi olduğu görülmüştür. Ekstraktların DNA koruma aktivite özellikleri ekstraktlar içerisindeki fenolik içeriklerden kaynaklıdır. İçerik sonuçları detaylı olarak Bölüm 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.1. *Lotus* EA, MeOH ve su ekstraktlarının pUC19 plazmit DNA'sını fenton karışımına karşı koruma aktivitesi

4.1.2. *Coronilla varia* Ekstraktları DNA Koruma Testi Sonuçları

Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi *Coronilla* bitkisinin MeOH ve su ekstraktları fenton karışımına karşı plazmit DNA'sını parçalanmaktan korumuş ve belirgin DNA bantları oluşturmuştur. Buna göre su ekstraktı, %50'den fazla bir koruma etkisi ile en yüksek koruma aktivitesi gösteren ekstrakt olmuştur. Su ekstraktından sonra ise MeOH ekstraktının yaklaşık %40 yüzdelik bir DNA koruma aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. EA ekstraktında ise pozitif kontrole göre çok az bir koruma aktivitesi tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarının pUC19 plazmit DNA'sını fenton karışımına karşı koruma aktivitesi

4.2. Bitki Ekstraktlarının Kanser Hücreleri Üzerindeki Canlılığının MTT Testi ile Belirlenmesi

Bu kısımda bitki ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki toksisitesi, mitokondriyel dehidrogenaz enzimi indirgenmesiyle canlı hücrelerin formazon kristaller oluşturması ile mor renk alması prensibine dayanan kolorimetrik bir ölçüm olan MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir.

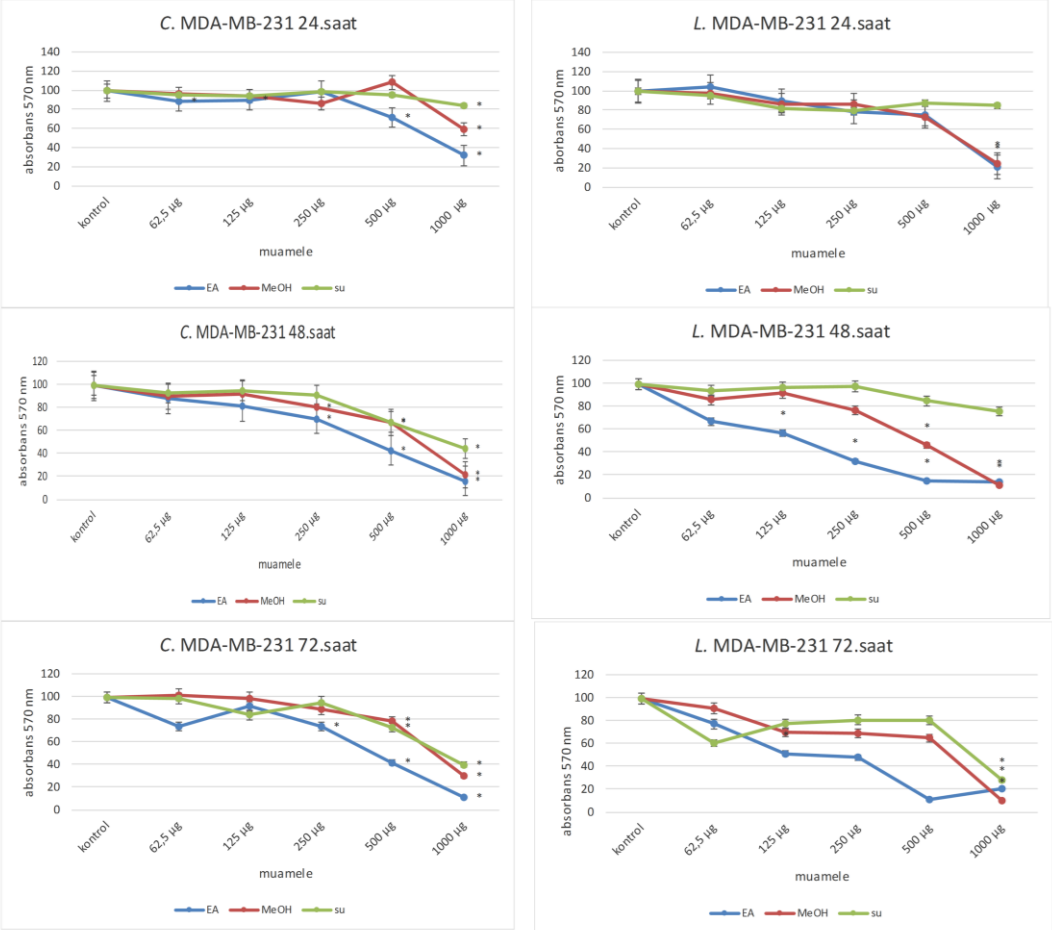
96 kuyucuklu petrilere ekilen hücrelerin çoğalmasının ardından ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile (62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1 mg/ml) 24, 48 ve 72 saat muamele edilerek sitotoksik aktiviteleri MTT testiyle belirlenmiştir. Ekstraktlarla muamele edilen hücrelerin yüzde canlılıkları Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO içeren çözeltide muamele edilmiştir.

4.2.1. Bitki Ekstraktlarının MDA-MB-231 Hücreleri Canlılığına Etkisi

Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi her iki bitki ekstraktının da MDA-MB-231 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin doza ve zamana bağlı olarak var olduğu tespit edilmiştir.

Coronilla bitkisinde en fazla etki EA ekstraktında hem doz hem de zamana bağlı olarak görülmüştür. Daha sonra MeOH ekstraktında ve ardından da su ekstraktında toksik etki varlığı tespit edilmiştir.

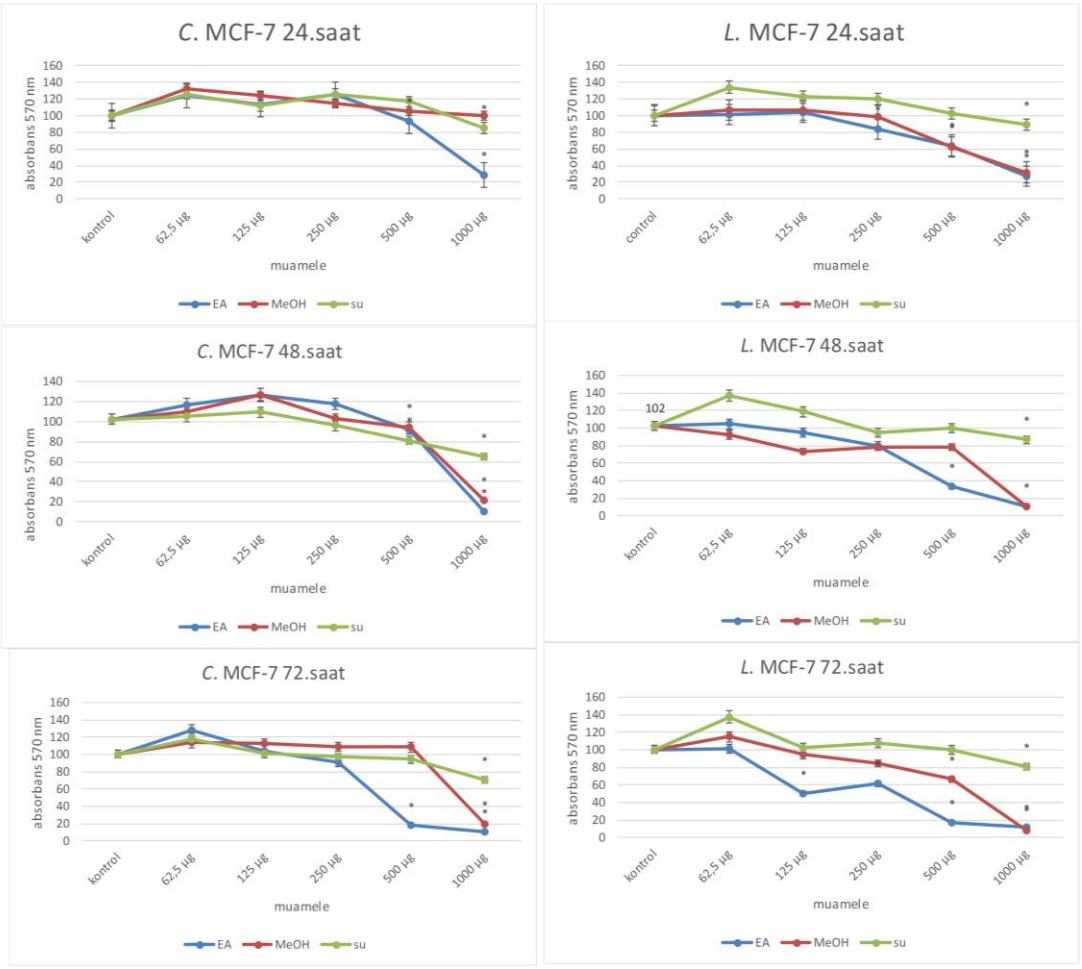
Lotus bitkisinde MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki toksisitenin de en fazla EA ekstraktında, özellikle 72. saatte görüldüğü belirlenmiştir. Böylece bu ekstraktın doza değil zamana bağlı olarak MDA-MB-231 hücre proliferasyonunu önlediği tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyon kanser hücrelerinde ilaç inhibitor olarak minimum toksisitede maksimum etki sağlaması açısından oldukça önemlidir. EA ekstraktının ardından MeOH ekstraktının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doza ve zamana bağlı olarak toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, su ekstraktının yalnızca 1000 µg/ml konsantrasyonuna 72 saat maruz kalmasıyla MDA-MB-231 hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. MDA-MB-231 hücresi canlılık testi sonucu

4.2.2. Bitki Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Canlılığına Etkisi

Şekil 4.4.'te de görüldüğü gibi *Coronilla* ve *Lotus* bitki ekstraktlarının MCF-7 hücre proliferasyonu (hücre çoğalması, canlılığı) üzerine etkisi MTT testiyle yüzde olarak belirlenmiştir. Buna göre her iki bitki için de en fazla etkinin sırasıyla EA ve MeOH ekstraktlarında hem doza hem de zamana bağlı olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Hem *Coronilla* hem de *Lotus* bitkilerinde su ekstraktlarında sitotoksik etki çok az görülmüş olup hücre canlılığının 24 saatten itibaren yaklaşık %60-80 arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. MCF-7 hücresi canlılık testi sonucu

4.2.3. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi

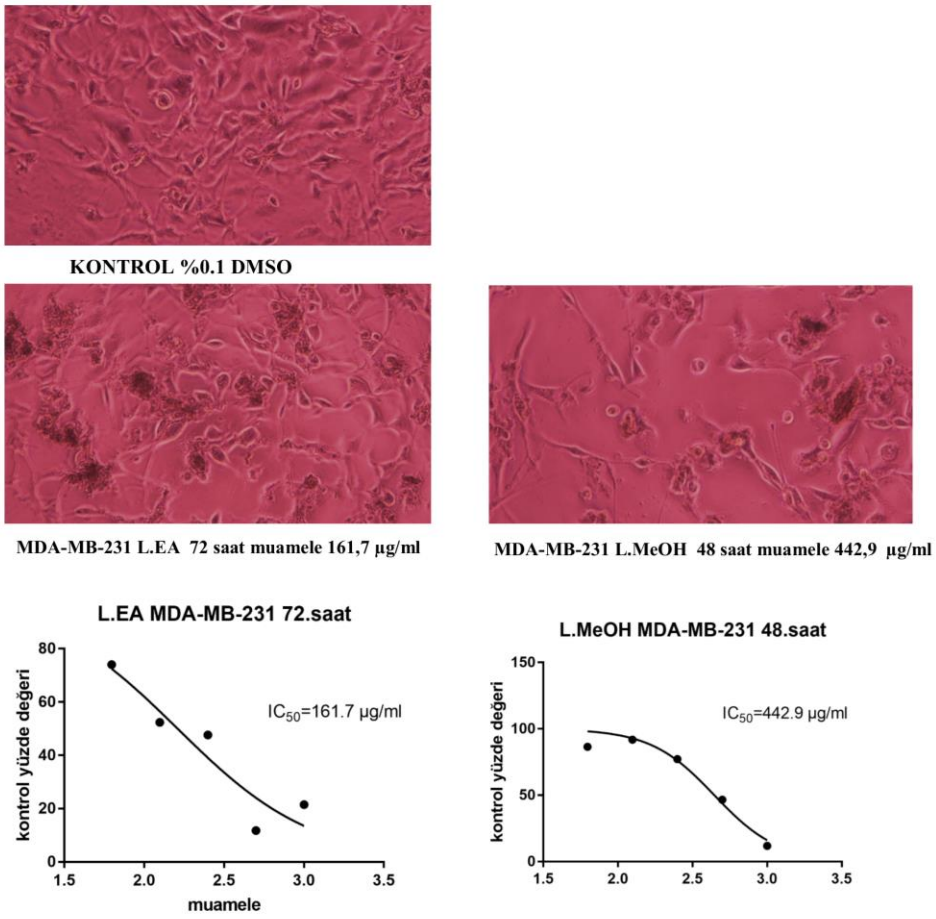
MTT hücre canlılık testi sonucu elde edilen veriler kullanılarak GraphPad Prism 7.04 programı yardımıyla ekstraktların meme kanseri hücrelerindeki IC_{50} konsantrasyonları belirlenmiştir. *Lotus* ekstraktlarının MDA-MB-231 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon değerleri (IC_{50}) ve logaritmik tabanda analiz sonucu EK 1'de gösterilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında *Lotus* EA ekstraktının 72. saat muamelesinin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki en düşük IC_{50} 161,7 µg/ml olarak belirlenmiş olup en düşük inhibitör konsantrasyon olduğu için analizlerde bu konsantrasyon değeri kullanılmıştır. *Lotus* MeOH ekstraktı için en düşük inhibitör konsantrasyon ise 442,9 µg/ml olarak 48.saat muamele süresinde yakalanmıştır. Hücrelerdeki biyolojik

proseslerin ortaya çıkarılması için, analizlerde toksik olmayan bu etkili inhibitör değerleri kullanılmıştır.

MTT testi sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin *Lotus* su ekstraktı ile muamelesi sonrası canlılığı yarıdan fazla olduğu için hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon hesaplanamamıştır.

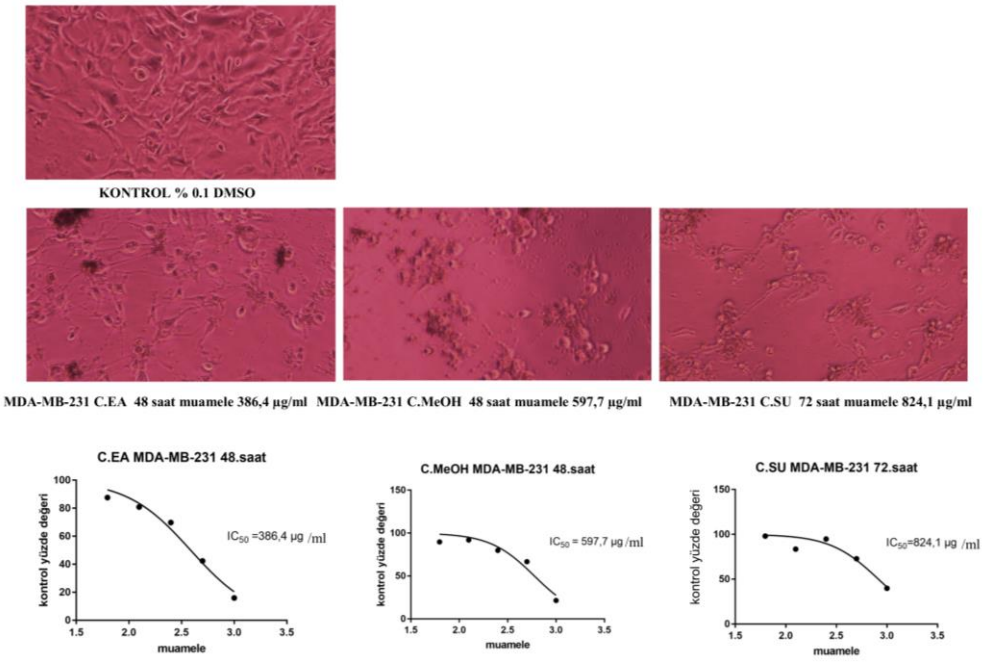
MDA-MB-231 hücrelerinin *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarının seçilen en düşük inhibitör konsantrasyonlarla muamele edilmesi sonrası ters mikroskop altında 10X objektif altındaki görüntüleri Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO içeren su çözeltisiyle muamele edilmiştir. EA ve MeOH ekstraktlarının hücre proliferasyonlarını azalttıkları hücre morfolojilerinde görülmektedir.



Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücreleri *Lotus (L.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri

4.2.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi

Coronilla ekstraktlarının MDA-MB-231 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon değerleri EK 2'de gösterilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, *Coronilla* EA ekstraktının MDA-MB-231 hücreleri için sonraki analizlerde kullanılacak olan inhibitör konsantrasyonu 386,4 µg/ml olarak, MeOH ekstraktının 597,7 µg/ml ve su ekstraktının 824,1 µg/ml olarak belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarının seçilen en düşük IC_{50} değerleri ile muamele sonrası ters mikroskop altında 10X objektif altındaki görüntüleri Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Kontrol hücreleri %0.1 DMSO içeren su çözeltisiyle muamele edilmiştir. EA, MeOH ve su ekstraktlarının hücre proliferasyonlarını inhibe ettikleri hücre morfolojilerinde görülmektedir.

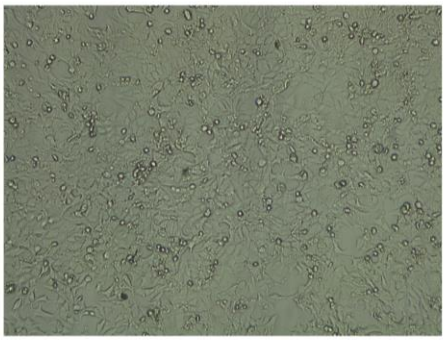


Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücreleri *Coronilla (C.)* EA, MeOH ve su ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri

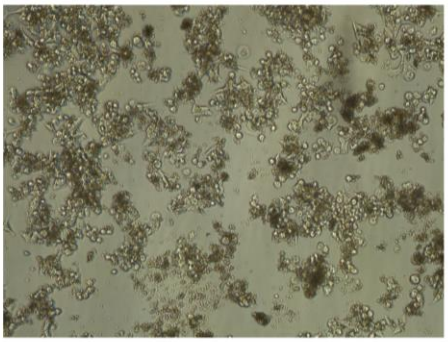
4.2.5. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi

Lotus ekstraktlarının MCF-7 hücrelerinin %50'sini öldüren konsantrasyon değerleri EK 3'de gösterilmiştir. *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki seçilen IC_{50} konsantrasyonları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Buna göre EA ekstraktı için elde edilen IC_{50} değeri 245,8 µg/ml, MeOH ekstratı için 589,4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Su ekstraktı için IC_{50} konsantrasyonu, hücre canlılığı %50'ye düşmediği için elde edilememiştir.

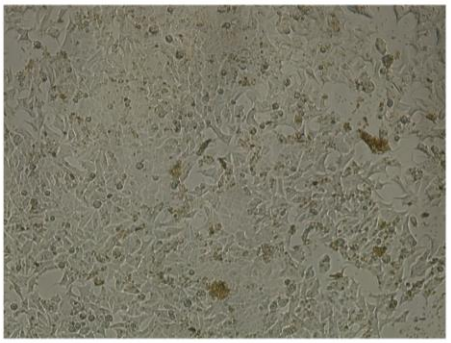
MCF-7 hücrelerinin *Lotus* (L.) ekstraktlarının belirlenen en düşük inhibitör konsantrasyonlarıyla muamele edilmesi sonrası 10X objektifte ters mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele sonrası hücre çoğalmalarında azalma tespit edilmiş, özellikle EA ekstraktı muamelesi sonrası hücre canlılığındaki azalma hücre morfolojisinde açıkça görülmüştür.



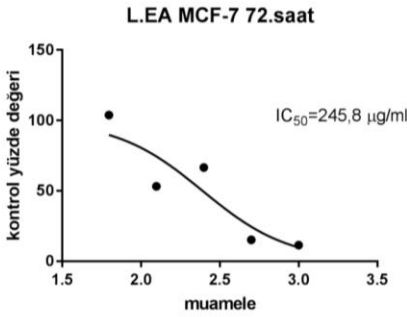
KONTROL %0.1 DMSO

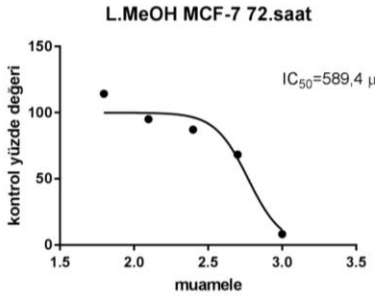


MCF-7 L.EA 72 saat muamele 245,8 µg/ml



MCF-7 L.MeOH 72 saat muamele 589,4 µg/ml



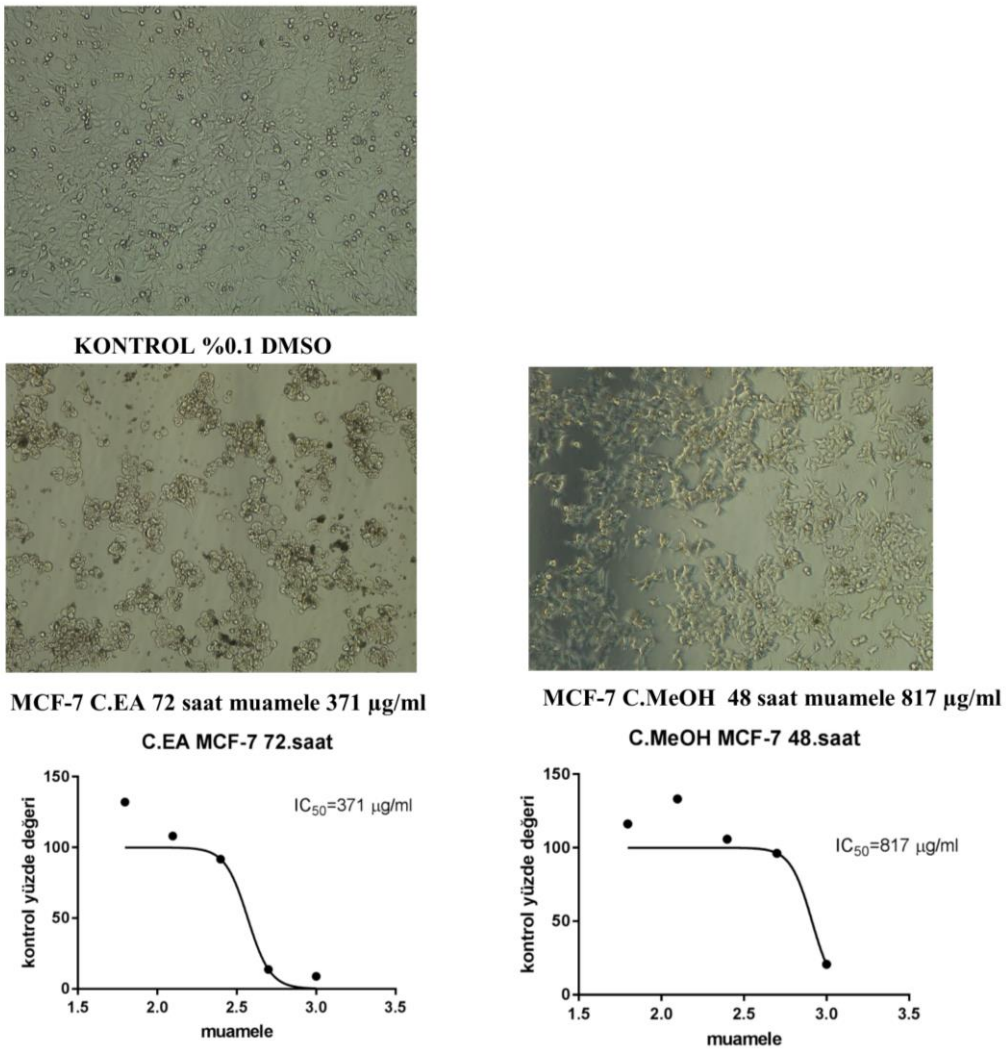


Şekil 4.7. MCF-7 hücreleri *Lotus (L.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri

4.2.6. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki İnhibitör Konsantrasyonlarının (IC_{50}) Belirlenmesi

Coronilla ekstraktları MCF-7 hücreleri üzerindeki IC_{50} konsantrasyonları EK 4'te görüldüğü gibi belirlenmiştir.

MCF-7 hücrelerinde, *Coronilla* EA ekstraktının elde edilen en düşük IC_{50} konsantrasyonu 72 saat muamele sonrası 371 µg/ml olarak belirlenirken MeOH ekstraktının 48 saat muamele sonrası 817 µg/ml olarak belirlenmiştir. Şekil 4.8.'de MCF-7 hücrelerinin EA ve MeOH ekstraktlarının inhibitör konsantrasyonlarıyla muamele edilmesi sonrası 10X objektif altında ters mikroskop altındaki görüntüleri gösterilmiştir. Hücre morfolojilerine bakıldığında EA ve MeOH ekstraktlarının hücre çoğalmasını inhibe ettikleri görülmektedir. Su ekstraktı için IC_{50} konsantrasyonu belirlenememiştir.



Şekil 4.8. MCF-7 hücreleri *Coronilla (C.)* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonları ile muamelesi sonrası ters mikroskop altındaki hücre morfolojileri

4.3. Gen İfade Analizi Sonuçları

Sitotoksik aktivitenin moleküler seviyede incelenmesi için bir önceki kısımda belirlenen ekstraktların hücreler üzerindeki inhibitör konsantrasyonları kullanılmıştır. Buna göre bu IC_{50} konsantrasyonları ile muamele edilen kanser hücreleri RNA izolasyonu için "materyal-yöntem" kısmında anlatıldığı gibi toplanmıştır. RNA'lar komplementer DNA'lara dönüştürüldükten sonra gerçek zamanlı PZR analizi Real time PCR (Rotor-Gene® SYBR® Green PCR Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifade sonuçları $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplama metodu kullanılarak aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Referans gen olarak "*human GAPDH"* kullanılmıştır.

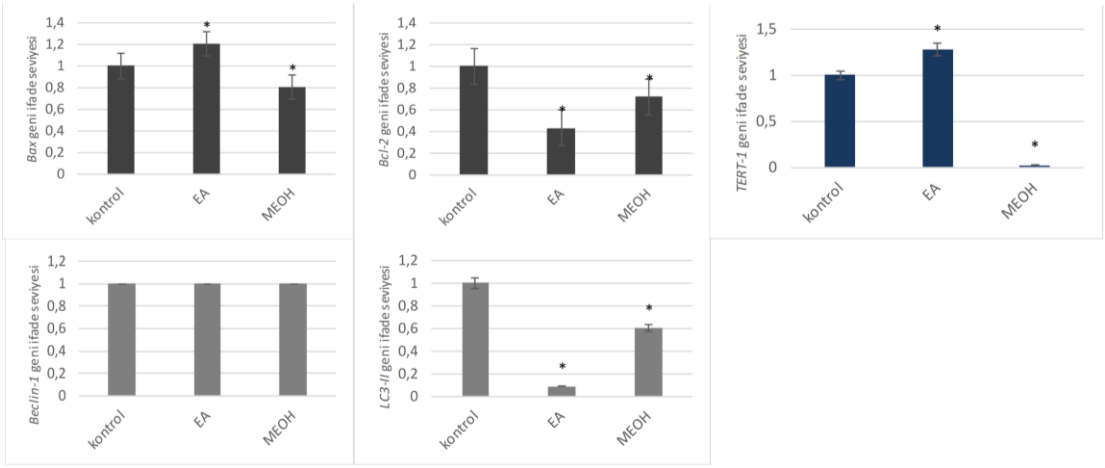
$\Delta CT = CT_{örnek} - CT_{referans}$ ve

$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{ekstraktla\ muamele\ edilmiş\ örnek} - \Delta CT_{kontrol}$

Bitki ekstraktlarının mRNA seviyesinde apoptotik, otofajik ve telomeraz aktivitesi gen ifadelerinin tespiti için gerçek zamanlı PZR metodu kullanılmıştır.

4.3.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları

Lotus EA ekstraktının 161,7 µg/ml konsantrasyonu, MeOH ekstraktının 442,9 µg/ml konsantrasyonu ile MDA-MB-231 hücreleri muamele edildikten sonra *Bax* (pro-apoptotik), *Bcl-2* (anti-apoptotik), *LC3-II* (otofaji indükleyici), *Beclin-1* (otofaji indükleyici) ve *TERT-1* (telomeraz aktive edici) gen ifade değişimleri Şekil 4.9.'da verilmiştir.



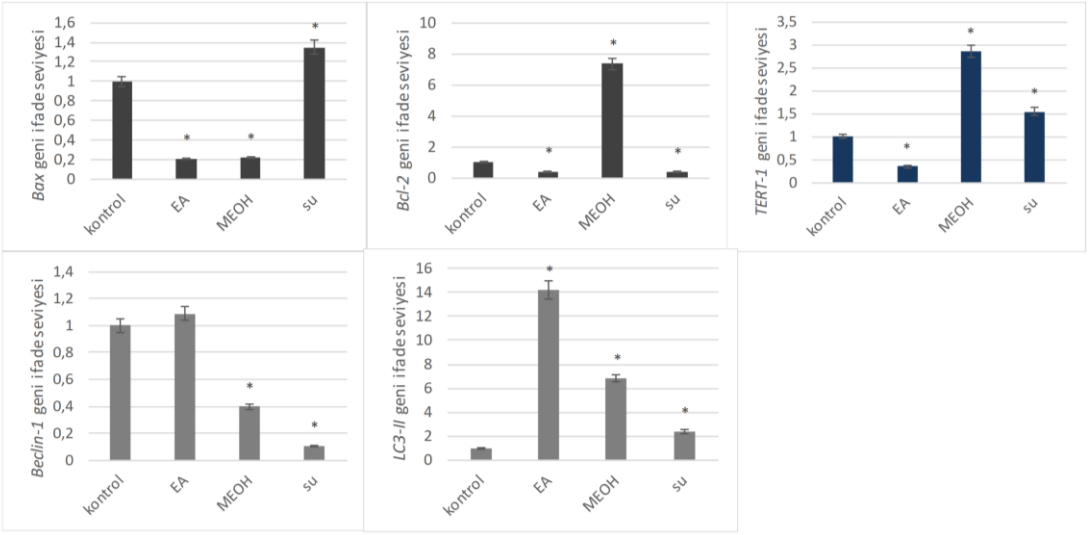
Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücreleri *Lotus* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri

Sonuçlara bakıldığında, MDA-MB-231 hücrelerinin *Lotus* EA ekstraktıyla muamele edilmesi sonrası *Bax* pro-apoptotik (apoptoz başlatıcı efektör) geninin kontrol hücrelerine göre arttığı görülmüştür. *Bcl-2* anti-apoptotik gen ifadesinin ise azaldığı görülmüştür. Buna göre, *lotus* EA ekstraktıyla muamele sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz mekanizması ile programlı hücre ölümünün başlamış olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca *Beclin-1* gen ifadesinde kontrole göre hiçbir gen ifadesi değişimi görülmezken, *LC3-II* gen ifadesinde anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Otofaji gen ifadelerindeki bu sonuçların, *Bcl-2* anti-apoptotik geni ile ilişkili olabileceği yargısına varılmıştır. Çünkü, *Bcl-2* geni apoptoz ile otofaji arasında çapraz etkileşim sağlayarak apoptoz uyarıldığında otofaji mekanizmasını baskılayabilir. *LC3-II* gen ifadesindeki düşüş de *Bcl-2* gen seviyesinin düşüşüyle açıklanabilir. Son olarak MDA-MB-231 hücrelerinin *Lotus* EA ekstraktıyla muamele edilmesi sonrası *TERT-1* telomeraz gen ifadesinin kontrol hücrelerine göre arttığı görülmüştür.

MDA-MB-231 hücrelerinin *Lotus* MeOH ekstraktıyla muamele edilmesi sonrası *Bax* ve *Bcl-2* gen ifade seviyelerinin azaldığı görülmüştür. *Beclin-1* gen ifade seviyesinde hiçbir değişim gözlenmezken, *LC3-II* gen ifadesinde kontrole göre anlamlı olmayan bir azalma tespit edilmiştir. *TERT-1* geninde ise anlamlı bir azalma tespit edilmiş, böylece telomeraz gen ifadesinin MDA-MB-231 hücrelerinin MeOH ekstraktı ile muamelesi sonrası baskılandığı ortaya çıkarılmştır.

4.3.2. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları

MDA-MB-231 hücreleri logaritmik büyüme fazına ulaştıktan sonra *Coronilla* bitkisinin 386,4 µg/ml EA, 597,7 µg/ml MeOH ve 824,1 µg/ml su ekstraktları ile muamele edilmiş ve gen ifade seviyeleri Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi incelenmiştir.



Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücreleri *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri

Sonuçlar değerlendirildiğinde, EA ekstraktı ile muamele sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde *Bax* ve *Bcl-2* genleri ifade seviyelerinde azalma görülmüştür. Ayrıca *Beclin-1* gen ifade seviyesinde anlamlı bir değişim gözlenmezken *LC3-II* geninde kontrole göre neredeyse 15 katlık bir artış olduğu tespit edilmiştir. Apoptotik ve otofajik gen ifadelerindeki bu beklenmedik sonuçlar, *Coronilla* EA ekstraktındaki fenolik içeriklerin sinerjistik olmayan, birbirlerinin aktivitelerini etkileyen maddelerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. *TERT-1* geninde ise kontrole göre azalma olduğu tespit edilmiş ve buna göre MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin *Coronilla* EA ekstraktı ile muamele edilmesi sonrası telomeraz gen aktivitesinin baskılandığı görülmüştür.

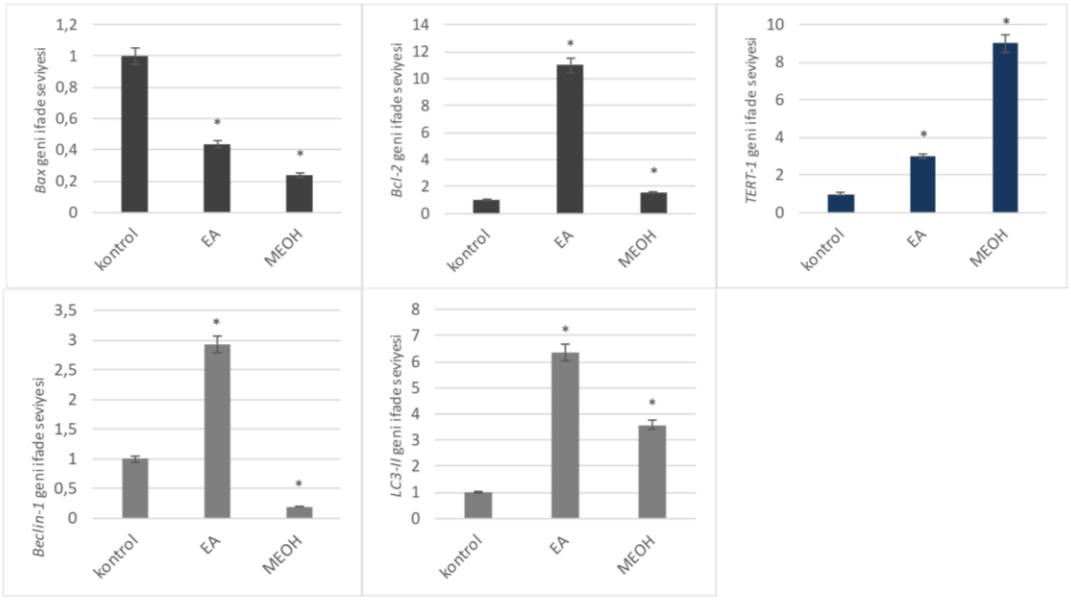
MDA-MB-231 hücrelerinin *Coronilla* MeOH ekstraktı ile muamele edilmesi sonrası *Bax* geni ifadesi azalırken *Bcl-2* anti-apoptotik geni ifadesi artmıştır. Bu sonuç, MeOH ekstraktının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde apoptoz mekanizmasına sebep

olmadığını açıkça göstermiştir. *Beclin-1* gen ifadesinde ise azalma görülürken *LC3-II* geninin ifade seviyesinde kontrole göre yaklaşık 6 katlık bir artış olduğu tespit edilmiştir. *LC3-II* genindeki bu artış sebebinin otofaji ekspresyonunu indükleyen *Bcl-2* geni artışı olduğu sonucuna varılmıştır. *TERT-1* geni ifadesinde ise yaklaşık 3 katlık bir artış gözlemlenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinin *Coronilla* su ekstraktıyla muamele edilmesi sonrası *Bax* geni ifadesinde artış ve *Bcl-2* geninde ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Böylece *Coronilla* su ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz başlamış olabileceği anlaşılmıştır. Otofaji gen ifade düzeylerine bakıldığında, *Beclin-1* gen ifadesinde azalma görülürken *LC3-II* geninin ifade düzeyi kontrole göre çok az artmıştır. TERT-1 gen ifade seviyesinin ise baskılanmadığı, artış gösterdiği tespit edilmiştir.

4.3.3. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları

MCF-7 hücrelerinin *Lotus* EA ekstraktının 245,8 µg/ml ve MeOH ekstraktının 589,4 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edilmesi sonrası gen ifade düzeylerindeki değişim Şekil 4.11.'de verilmiştir.



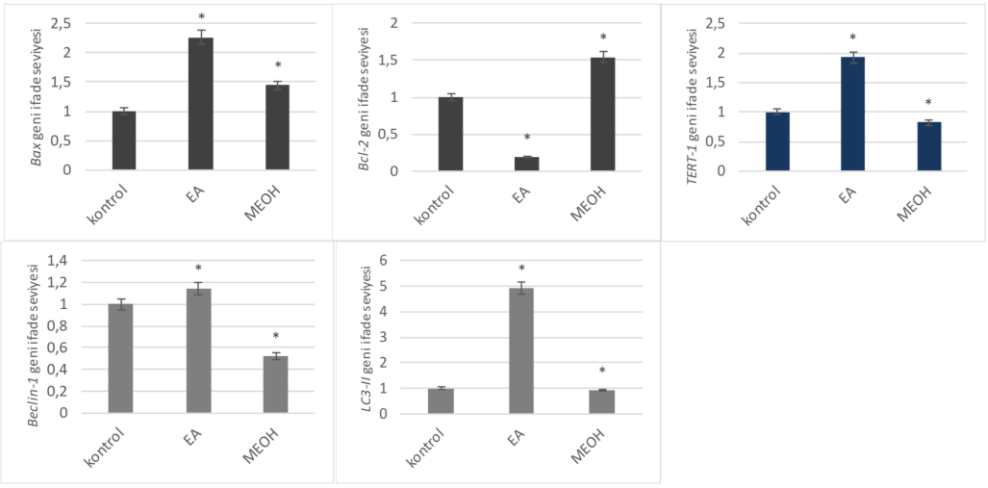
Şekil 4.11. MCF-7 hücreleri *Lotus* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri

Sonuçlara göre *Lotus* EA ekstraktı ile muamele sonrası MCF-7 hücrelerinde *Bax* geni ifadesi düşerken, apoptozu önleyen *Bcl-2* geni ifadesinde yaklaşık olarak 10 katlık bir artış olduğu belirlenmiştir. Buna göre MCF-7 hücrelerinin EA ekstraktı muamelesi sonrası programlı hücre ölüm modunun apoptoz olmadığı düşünülmüştür. Çünkü *Bcl-2* genindeki artışa bağlı olarak, otofajik genler arasında hem *Beclin-1* hem de *LC3-II* geninin ifade seviyesinde anlamlı olduğu düşünülen sırasıyla yaklaşık 3 kat ve 7 katlık bir artış olduğu görülmüştür. Böylece hücre ölüm modunun otofaji olabileceği düşünülmüştür. *TERT-1* geninin ifadesinin ise baskılanmadığı, kontrole göre artış gösterdiği görülmüştür.

MFC-7 hücreleri *Lotus* bitkisinin MeOH ekstraktı ile muamele edildikten sonra *Bax* geni ifade seviyesi düşerken *Bcl-2* geninin ifade düzeyinde ise çok az bir artış görülmüştür. *Beclin-1* geninin ise ifade seviyesi düşerken *LC3-II* geninin ifade seviyesi artmıştır. *TERT-1* geninin ifade seviyesinde ise yaklaşık 9 katlık belirgin bir artış tespit edilmiştir.

4.3.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücrelerindeki Apoptoz, Otofaji ve Telomeraz Gen İfade Sonuçları

MCF-7 hücrelerinin *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktlarının sırasıyla 371 µg/ml ve 817 µg/ml konsantrasyonlarla muamelesi sonrası *Bax*, *Bcl-2*, *Beclin-1*, *LC3-II* ve *TERT-1* gen ifade seviyeleri Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. MCF-7 hücreleri *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktları ile muamele edilmesi sonrası apoptotik, otofajik ve telomeraz genlerinin ifade seviyeleri

Sonuçlar değerlendirildiğinde, MCF-7 hücrelerinin *Coronilla* EA ekstraktı ile muamelesi sonrası *Bax* geninin ifade seviyesinin arttığı *Bcl-2* geninde ise belirgin bir azalma gözlenmiştir. Böylece mRNA seviyesinde apoptotik yolla programlı hücre ölümünün başlamış olabileceği belirlenmiştir. *Beclin-1* ve *LC3-II* otofaji genlerinde ise beklenmedik bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstraktlarının fenolik içeriklerinin apoptoz ve otofaji arasında çapraz etkileşime (crosstalk mechanism) sebep olduğu tahmin edilmektedir. *TERT-1* geninin ise ifadesinin baskılanmadığı, kontrole göre arttığı görülmüştür.

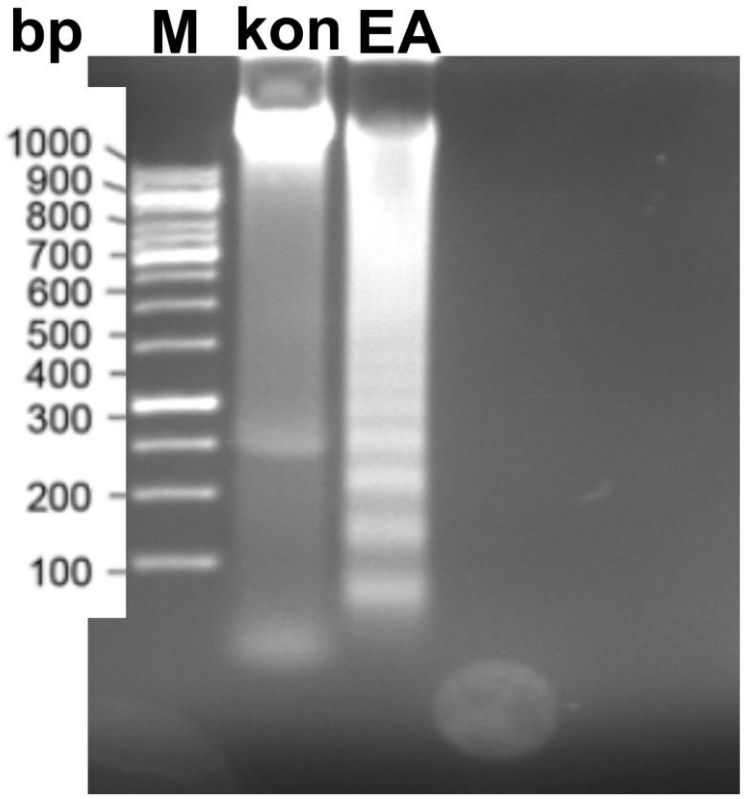
MCF-7 meme kanseri hücrelerinin *Coronilla* bitkisinin MeOH ekstraktı ile muamelesi sonrası *Bax* ve *Bcl-2* genleri ifade düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca *Beclin-1* ve *LC3-II* gen ifadelerinde ise azalma görülmüş, özellikle *Beclin-1* geninde belirgin azalma görülmüştür. *TERT-1* geni ifadesinin ise kontrol hücrelerine göre azalmaya başladığı, telomeraz gen aktivitesinin çok az baskılandığı tespit edilmiştir.

4.4. DNA Fragmentasyon Analizi Sonuçları

Apoptotik gen ifade analizleri sonrasında apoptoz mekanizmasına sebep olan *Bax* ve *Bcl-2* genleri ifade durumlarına göre meme kanseri hücrelerinde apoptoz gerçekleştirdiği düşünülen ekstraktlar seçilerek DNA fragmentasyon analizi yapılmıştır. Böylece apoptoz, en kesin biyokimyasal belirteçlerinden biri olan apoptotik DNA kırılım yöntemiyle kesin bir şekilde tespit edilmiştir.

4.4.1. *Lotus corniculatus L.* EA Ekstraktı MDA-MB-231 Hücresi Fragmentasyon Analizi Sonucu

Lotus EA ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde *Bax* pro-apoptotik geninin ifade seviyesinin arttığı, *Bcl-2* gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Sonrasında EA ekstraktının 161,7 µg/ml konsantrasyonu ile 72 saat boyunca muamele edilen hücreler toplandıktan sonra Abcam DNA Ladder Detection Kit (Cambridge, İngiltere) kullanılarak DNA fragmentasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 2 µg DNA örnekleri %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde 75 volt elektrik akımı kullanılarak ayrıştırılmış ve DNA bantları görüntülenmiştir.

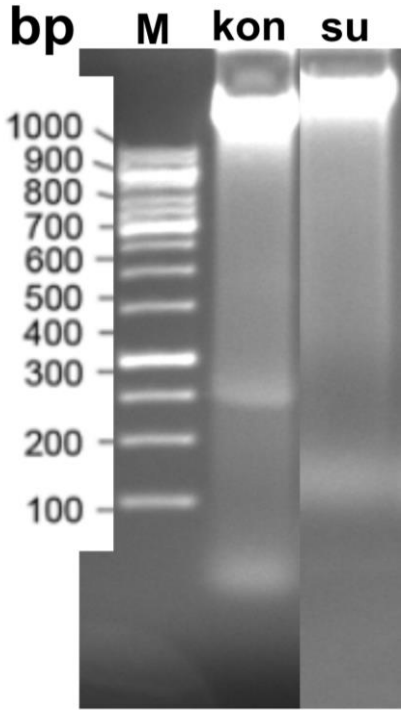


Şekil 4.13. *Lotus* EA ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücreleri apoptotik DNA fragment analizi

Şekil 4.13.'te görüldüğü gibi EA ekstraktı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun biyokimyasal belirteci olan DNA merdivensi (DNA ladder) görüntüsü elde edilmiş, DNA fragmentlerine ayrılarak apoptoz gerçekleşmiştir (M; DNA belirteci, kon; kontrol). Kontrol hücreleri %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir.

4.4.2. *Coronilla varia* Su Ekstraktı MDA-MB-231 Hücresi Fragmentasyon Analizi Sonucu

Coronilla su ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde bir önceki kısımda görüldüğü gibi *Bax* pro-apoptotik geninin ifade seviyesi artmış, *Bcl-2* gen ifadesi azalmıştır. Su ekstraktının 824,1 µg/ml konsantrasyonu ile 72 saat boyunca muamele edilen hücreler kullanılarak apoptoz doğrulanması için DNA fragmentasyon analizi yapılmıştır.



Şekil 4.14. *Coronilla* su ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücreleri apoptotik DNA fragment analizi

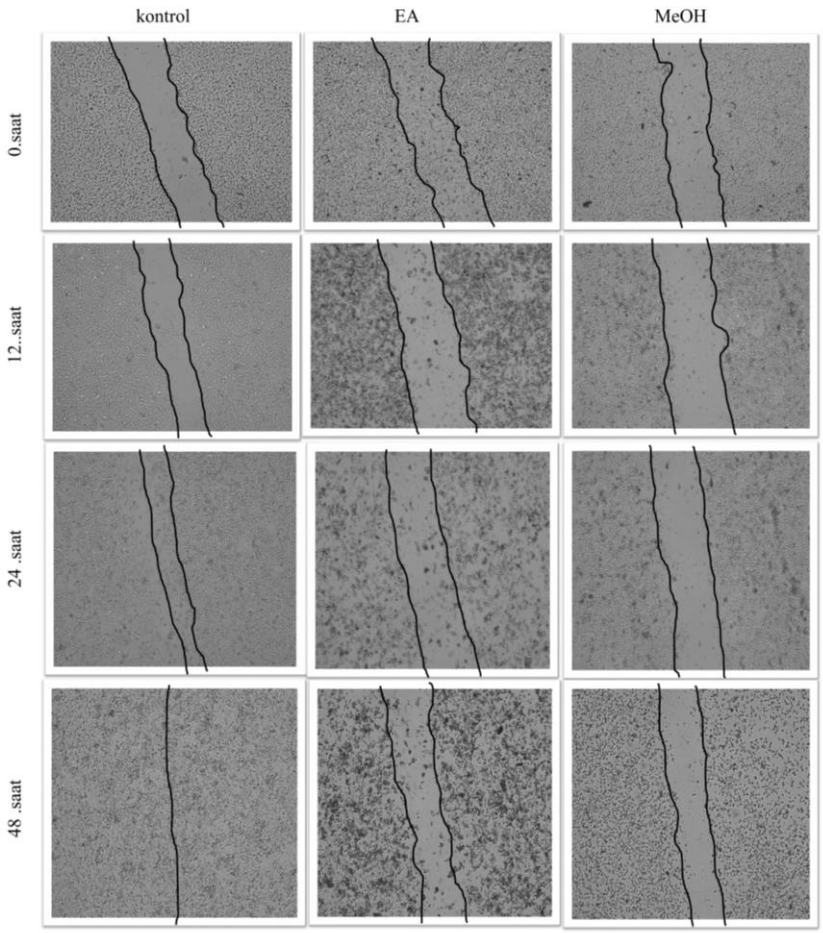
Şekil 4.14.'te MDA-MB-231 hücreleri *Coronilla* su ekstraktı muamelesi sonrası agaroz jel elektroforezindeki DNA fragment analizi gösterilmiştir (M; DNA belirteci, kon; kontrol). Bir önceki sonuçlarda görüldüğü gibi *Bax* geni ifade seviyesinin artışı ve *Bcl-2* anti-apoptotik geni ifade düzeyinin azalmış olmasına rağmen su ekstraktı muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücre hattında apoptotik DNA fragmentlerine ayrılmamıştır. Fragment analizinde görülen bu beklenmedik sonucun *Coronilla* su ekstraktında bulunan içerikler arasındaki etkileşimden kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

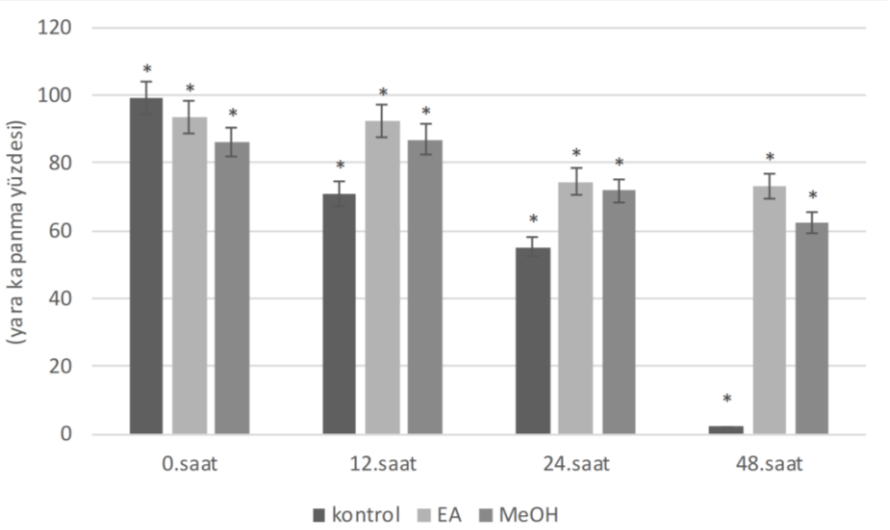
4.5. Hücre Göçü Analizi Sonuçları

Meme kanseri hücreleri metastatik aktivitesi en yüksek kanser türleri arasına girmektedir. Bu sebepten kemoterapi ilacı potansiyelinde olabileceğini düşündüğümüz *Coronilla* ve *Lotus* bitki ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki anti-metastatik aktivitesini incelemek amacıyla hücre göçü testi yapılmıştır.

4.5.1. *Lotus corniculatus L.* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri

Hücre yoğunluğu %90'a ulaştıktan sonra MDA-MB-231 hücrelerine steril pipet ucu yardımıyla yara açılmış, sonrasında *lotus* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} konsantrasyonlarıyla, sırasıyla 161,7 µg/ml ve 442,9 µg/ml ile muamele edilmişlerdir. Hücre morfolojileri ve yara kapanma durumu 0. saatten başlamak üzere 12, 24 ve 48 saat boyunca ters mikroskopta 4X objektifte (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) takip edilmiş, fotoğrafları çekilmiştir.





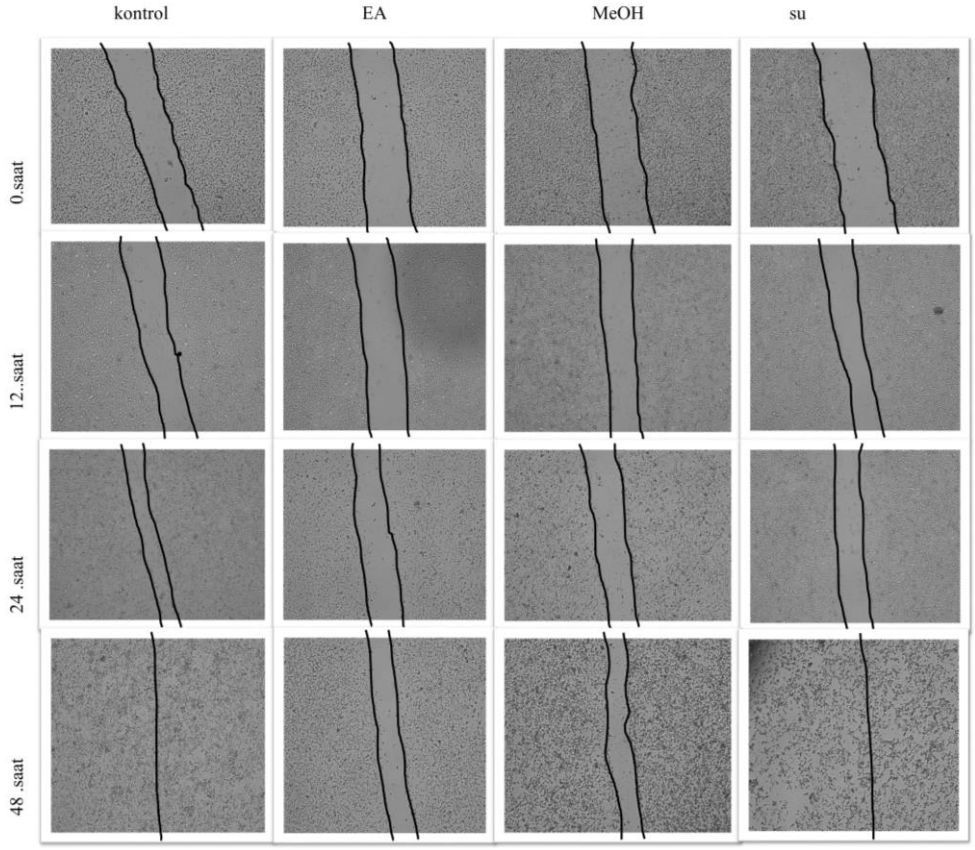
Şekil 4.15. *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri

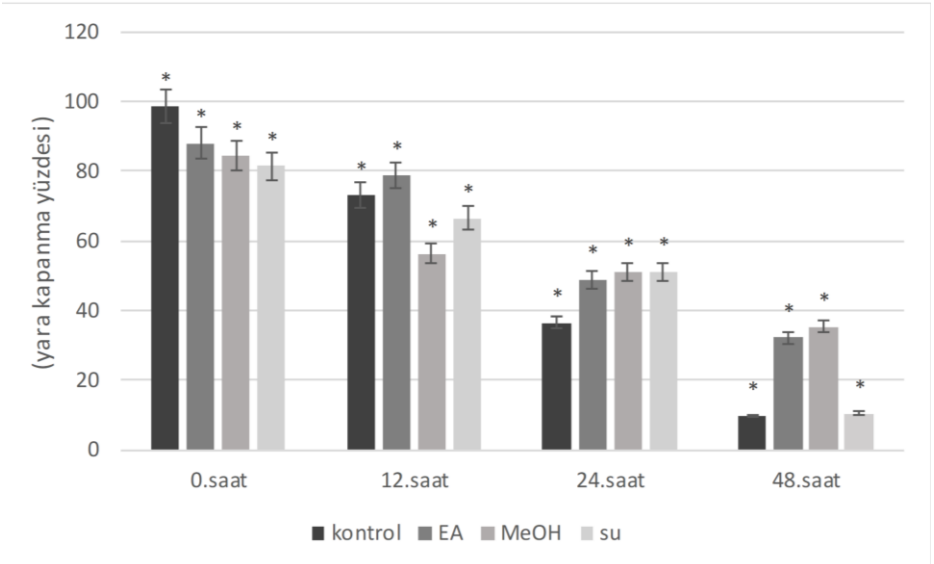
Şekil 4.15.'te *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen metastatik aktivitesi yüksek ve invazif MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri verilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonunu önlemek için besiyerlerine Mitomycin C (10 µg/ml) ilave edilmiştir. * $p < 0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre yaranın kapanmadığı görülmüştür. Özellikle 12. saatten sonraki zaman diliminde kontrol hücrelerinde metastatik aktivite devam ederek yara kapanırken, ekstraktlarla muamele edilen hücreler anti-proliferatif etkiyle metastatik aktiviteyi baskılamıştır.

4.5.2. *Coronilla varia* Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri

MDA-MB-231 hücreleri logaritmik çoğalma yoğunluğuna ulaştıktan sonra (%90 yoğunlukta) steril pipet ucu ile yaralandırılmıştır. Daha sonra *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarının sırasıyla 386,4 µg/ml, 597,7 µg/ml ve 824,1 µg/ml konsantrasyonlarıyla muamele edilmişlerdir. Yara kapanma durumu ve hücre morfolojileri 0. saatten başlanmak üzere 12, 24 ve 48 saat boyunca takip edilerek ters mikroskop 4X objektif (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) altında fotoğrafları çekilmiştir. Şekil 4.16.'daki hücre morfolojilerinde görüldüğü gibi EA ve MeOH ekstraktları MDA-MB-231 hücreleri üzerinde anti-metastatik aktivite göstermiştir. 48. saate gelindiğinde EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen hücrelerde yara açıklığı %50'deyken su ekstraktıyla muamele edilen hücrelerdeki yara açıklığının neredeyse tamamının kapandığı görülmüştür.





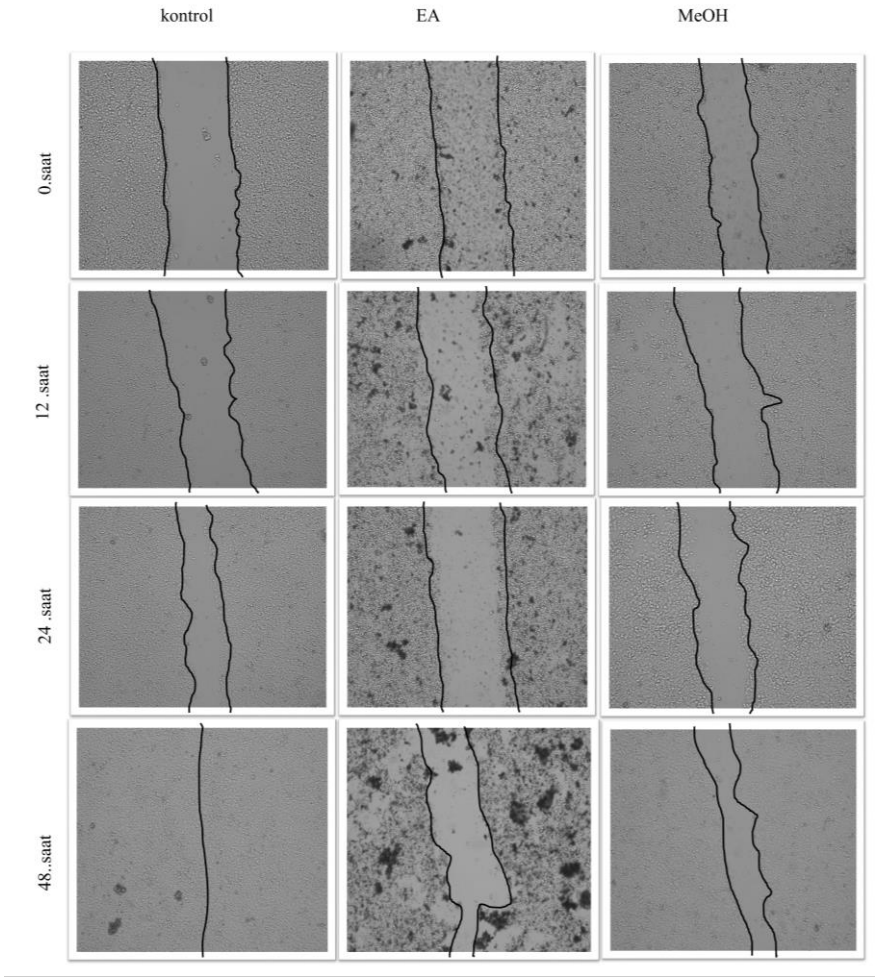
Şekil 4.16. *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri

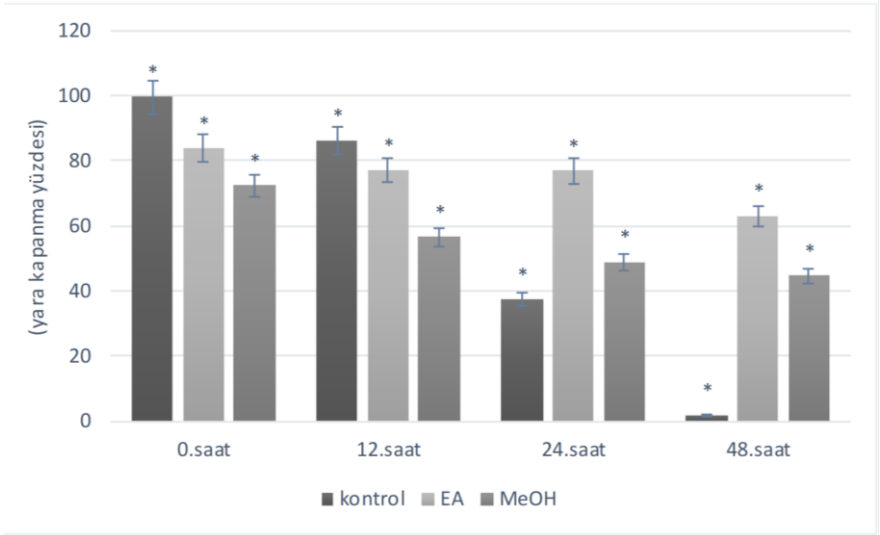
Şekil 4.16.'da *Coronilla* EA, MeOH ve su ekstraktlarıyla muamele edilen metastatik aktivitesi yüksek ve invazif MDA-MB-231 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri verilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonunu önlemek için besiyerlerine Mitomycin C (10 µg/ml) ilave edilmiştir. * $p < 0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.5.3. *Lotus corniculatus* Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri

%90 yoğunluğa ulaşan MCF-7 hücreleri pipet ucuyla yaralandırıldıktan sonra *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarının sırasıyla 245,8 µg/ml ve 589,4 µg/ml konsantrasyonlarıyla 0, 12, 24 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Hücre morfolojileri, bu zaman aralıklarında ters mikroskop 4X objektif (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) altında analiz edilmiş, fotoğrafları çekilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında, EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerinde metastatik aktivitesi baskılanmıştır. Kontrol hücrelerindeki boşluk 48 saate doğru tamamen kapanırken, ekstraktlarla muamele edilen hücrelerde hücre göçünün baskılandığı gözlemlenmiştir. Özellikle EA ekstraktıyla muamele edilmiş hücrelerde yara açıklığı neredeyse hiç kapanmamıştır.





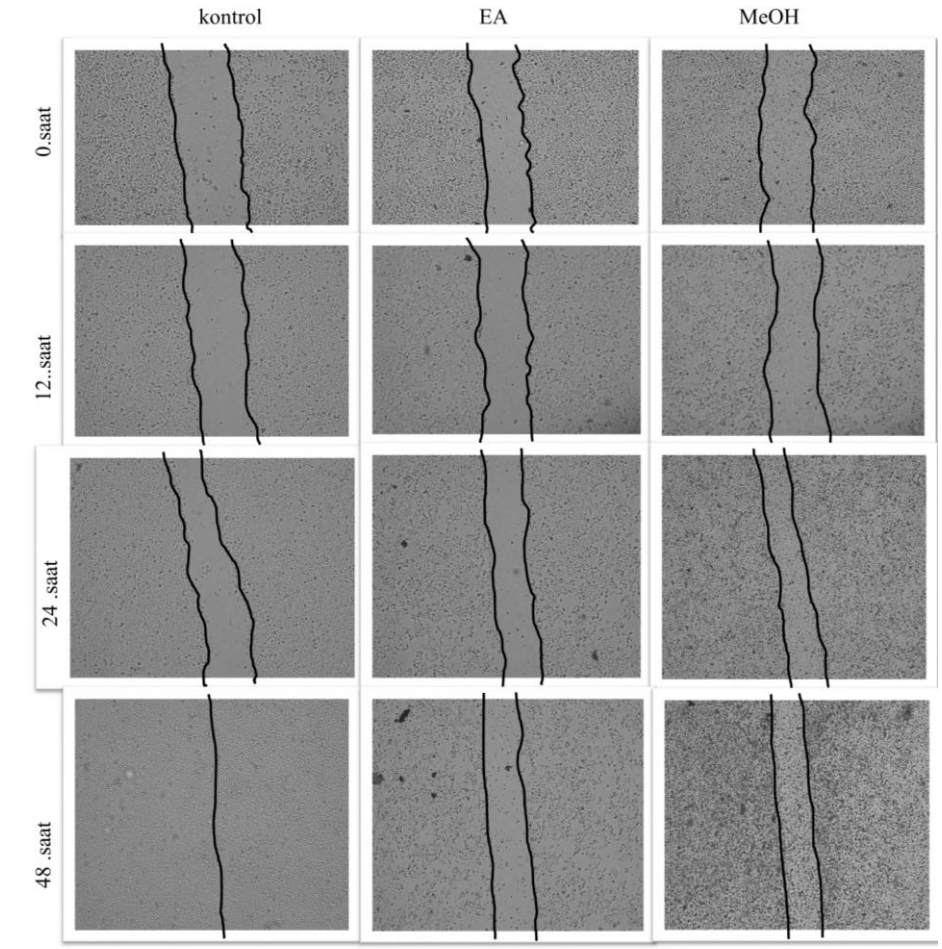
Şekil 4.17. *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri

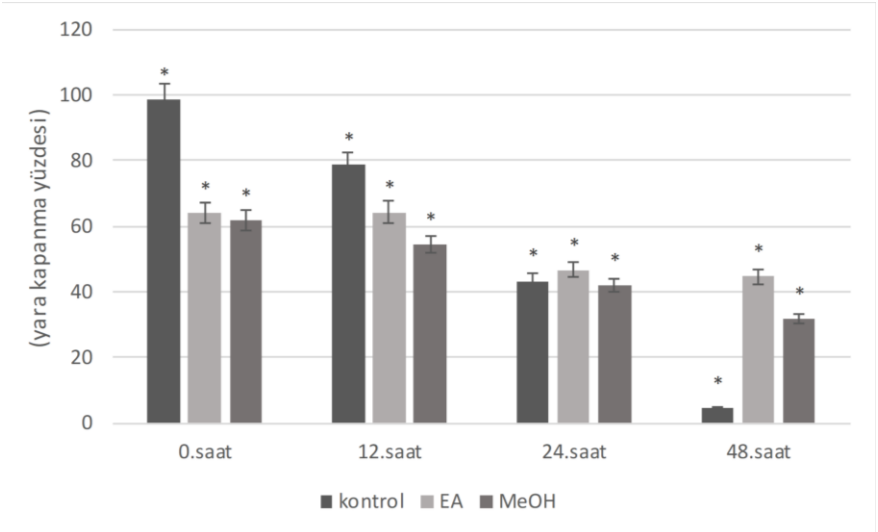
Şekil 4.17.'de *Lotus* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri verilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonunu önlemek için besiyerlerine Mitomycin C (10 µg/ml) ilave edilmiştir. * $p < 0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.5.4. *Coronilla varia* Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Hücre Göçü Analizi Sonuçları ve Ters Mikroskop Görüntüleri

MCF-7 hücreleri logaritmik büyüme fazına ulaştıktan sonra yaralandırılmıştır. Daha sonra *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktlarının sırasıyla 371 µg/ml ve 817 µg/ml konsantrasyonlarıyla 0, 12, 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Hücre morfolojileri ve sonuçlar ters mikroskopta 4X objektifte (inverted microscope, Leica DMi1, Almanya) analiz edilmiş fotoğrafları çekilmiştir.

Sonuçlara göre her iki ekstrakt da MCF-7 hücrelerinde yaranın açık kalmasına sebep olmuş, böylece MCF-7 kanser hücre dizinin metastatik aktivitesini inhibe etmiştir.





Şekil 4.18. *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri

Şekil 4.18.'de *Coronilla* EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele edilen MCF-7 hücre morfolojileri ve yara kapanma yüzdeleri verilmiştir. Kontrol hücreleri %0,1 DMSO ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonunu önlemek için besiyerlerine Mitomycin C (10 μg/ml) ilave edilmiştir. * $p < 0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.6. *Lotus corniculatus* ve *Coronilla varia* Ekstraktları Fenolik İçerikleri

Baklagil ailesine ait *Coronilla* ve *Lotus* bitki ekstraktlarının DNA koruma aktiviteleri ve meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve anti-metastatik etkileri, bitkiler içerisindeki ilaç hammaddelerinde de bulunan fenolik içeriklerden kaynaklanmaktadır. İçerik analizleri Tablo 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5. ve 4.6.'da detaylı olarak gösterilmiştir.

Buna göre *Lotus* etil asetat (EA) ekstraktında dominant olan ve diğer ekstraktlarda saptanmayan içeriğin linoleamid olduğu belirlenmiştir. En fazla içerik MeOH ekstraktında tanımlanmış olup totalde 76 tane belirlenmiştir. Oleik asit türevleri genel olarak EA ve MeOH ekstraktlarında yoğun olarak belirlenmiştir. 4-O-(4-Coumaroyl)quinic acid, gossypetin-O-pentoside, geraldol (3'-Methoxy-3,4',7-trihydroxyflavone), isorhamnetin (3'-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), kaempferol-O-coumaroylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 2 ve linoleic acid yalnızca MeOH ekstraktında tanımlanan fenolik içerikler olup su ve EA ekstraktında varlığı saptanmamıştır. Su ekstraktında ise MeOH ve EA ekstraktlarından farklı olarak riboflavin saptanmış olup kuersetin ve türevleri bakımından da zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Coronilla bitkisi ekstraktlarında her üçünde de dominant olan fenolik içerikler apigenin ve kuersetin türevleridir. Yalnız MeOH ekstraktında bulunan metabolik içerikler ise 7-hydroxycoumarin (Umbelliferone), tetrahydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 2, quercetin-O-pentosyldeoxyhexosylhexoside, quercetin-3-O-glucuronide, rutin (quercetin-3-O-rutinoside) ve quercetin-O-pentoside isomer 2'dir. Yalnız su ektraktında bulunan spesifik içerikler ise citric acid, pantothenic acid, riboflavin, naringenin-C-hexoside isomer 2 ve noscapine (Narcotine) olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1. *L. corniculatus etil asetat (EA) ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	10,03		285,06105
2	Gossypetin-3-O-galactoside	$C_{21}H_{20}O_{13}$	18,48		479,08257
3	Gossytrin (Gossypetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{13}$	18,91		479,08257
4	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 1	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,14		739,20856
5	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 2	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,44		739,20856
6	Kaempferol-3-O-[xylosyl-(1→2)-galactoside]-7-O-rhamnoside	$C_{32}H_{38}O_{19}$	20,64		725,19291
7	Quercetin-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	20,91		609,14557
8	Quercetin-O-deoxyhexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	21,19		609,14557
9	Verbascoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	21,95		623,19760
10	Kaempferol-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,13		593,15065
11	Corniculatusin-3-O-galactoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,25		493,09822
12	Corniculatusin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,45		493,09822
13	Hyperoside (Quercetin-3-O-galactoside, Hyperin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,62		463,08765
14	Quercetin-3,7-O-dirhamnoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,71		593,15065
15	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,84		463,08765
16	Gossypetin (2',3,3',5,7,8-Hexahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_8$	23,26		317,02975
17	Quercetin-O-pentoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	23,43		433,07709
18	Sexangularetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	23,50		477,10330
19	Kaempferol-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,07		447,09274
20	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,26		577,15573
21	Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,40	449,10839	
22	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-di-O-deoxyhexoside	$C_{28}H_{32}O_{15}$	24,48		607,16630
23	Fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	24,62	287,05556	
24	Isorhamnetin-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,66		477,10330
25	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,84		477,10330
26	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-O-deoxyhexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	25,68		461,10839
27	Kaempferol-O-acetylhexoside-O-deoxyhexoside	$C_{29}H_{32}O_{16}$	26,02		635,16121
28	Vestitol-O-hexoside	$C_{22}H_{26}O_9$	26,31		433,14986
29	Afzelin (Kaempferol-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	26,35		431,09782
30	Corniculatusin (8-Methoxy-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_8$	26,90		331,04540
31	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	26,91		301,03483
32	Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	27,15		271,06065
33	Kaempferol-7-O-rhamnoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	28,64		431,09782
34	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	29,25		285,03991
35	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_5$	29,61		269,04500
36	Dimethoxy-trihydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_7$	29,79		329,06613
37	Coumestrol	$C_{15}H_8O_5$	29,85	269,04500	
38	Hispidulin (6-Methoxy-4',5,7-trihydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_6$	30,12		299,05557
39	Vestitol (2',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavan)	$C_{16}H_{16}O_4$	30,29	273,11269	
40	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_4$	30,78	269,08138	
41	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_4$	30,97	271,09704	

Tablo 4.1.'in devamı

42	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_8$	31,24		359,07669
43	Dihydroxy-dimethoxy(iso)flavane	$C_{17}H_{18}O_5$	31,58	303,12325	
44	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_7$	33,10		343,08178
45	Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone	$C_{19}H_{18}O_8$	33,19	375,10800	
46	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	33,28		229,14399
47	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_5$	33,37		283,06065
48	Sativan (2',4'-Dimethoxy-7-hydroxyisoflavan)	$C_{17}H_{18}O_4$	34,15	287,12834	
49	Hexadecanedioic acid	$C_{16}H_{30}O_4$	40,30		285,20659
50	Juniperic acid (16-Hydroxyhexadecanoic acid)	$C_{16}H_{32}O_3$	40,81		271,22732
51	Linoleamide	$C_{18}H_{33}NO$	44,05	280,26404	
52	Oleamide	$C_{18}H_{35}NO$	45,37	282,27969	

Tablo 4.2. *L. corniculatus metanol (MeOH) ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	10,01		285,06105
2	Chlorogenic acid (3-O-Caffeoylquinic acid)	$C_{16}H_{18}O_9$	14,15	355,10291	
3	Caffeic acid	$C_9H_8O_4$	14,27		179,03444
4	Unidentified compound	$C_{11}H_{12}O_6$	15,88		239,05556
5	Naringenin-6,8-di-C-glucoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	16,88		595,16630
6	Quercetin-di-O-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{17}$	17,15		625,14048
7	4-O-(4-Coumaroyl)quinic acid	$C_{16}H_{18}O_8$	17,48		337,09235
8	4-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	17,70		163,03952
9	Gossypetin-3-O-galactoside	$C_{21}H_{20}O_{13}$	18,48		479,08257
10	Gossytrin (Gossypetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{13}$	18,92		479,08257
11	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 1	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,14		739,20856
12	Gossypetin-O-pentoside	$C_{20}H_{18}O_{12}$	19,26		449,07201
13	Kaempferol-O-hexosylhexoside-O-deoxyhexoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	19,38		755,20347
14	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 2	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,44		739,20856
15	Quercetin-3-O-[xylosyl-(1→2)-galactoside]-7-O-rhamnoside	$C_{32}H_{38}O_{20}$	19,71		741,18782
16	Kaempferol-3-O-[xylosyl-(1→2)-galactoside]-7-O-rhamnoside	$C_{32}H_{38}O_{19}$	20,64		725,19291
17	Quercetin-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	20,91		609,14557
18	Quercetin-O-deoxyhexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	21,19		609,14557
19	Verbascoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	21,95		623,19760
20	Kaempferol-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,13		593,15065
21	Corniculatusin-3-O-galactoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,25		493,09822
22	Corniculatusin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,46		493,09822
23	Hyperoside (Quercetin-3-O-galactoside, Hyperin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,59		463,08765
24	Quercetin-3,7-O-dirhamnoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,70		593,15065
25	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,87		463,08765
26	Gossypetin (2',3,3',5,7,8-Hexahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_8$	23,28		317,02975
27	Quercetin-O-pentoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	23,44		433,07709
28	Sexangularetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	23,51		477,10330
29	Quercetin-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{15}$	23,60		549,08805
30	Kaempferol-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,07		447,09274
31	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,22		577,15573
32	Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,40	449,10839	
33	Hydroxy-methoxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_9$	24,45	431,13421	
34	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-di-O-deoxyhexoside	$C_{28}H_{32}O_{15}$	24,49		607,16630
35	Fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	24,61	287,05556	
36	Isorhamnetin-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,68		477,10330
37	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,87		477,10330
38	Kaempferol-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{14}$	25,56		533,09314
39	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-O-deoxyhexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	25,68		461,10839
40	Kaempferol-O-acetylhexoside-O-deoxyhexoside	$C_{29}H_{32}O_{16}$	26,04		635,16121
41	Vestitol-O-hexoside	$C_{22}H_{26}O_9$	26,31		433,14986

Tablo 4.2.'nin devamı

42	Afzelin (Kaempferol-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	26,34		431,09782
43	Corniculatusin (8-Methoxy-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_8$	26,90		331,04540
44	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	26,94		301,03483
45	Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	27,16		271,06065
46	Kaempferol-7-O-rhamnoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	28,64		431,09782
47	Geraldol (3'-Methoxy-3,4',7-trihydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_6$	28,73	301,07121	
48	Sexangularetin (8-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_7$	29,08		315,05048
49	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	29,25		285,03991
50	Kaempferol-O-coumaroylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 1	$C_{36}H_{36}O_{17}$	29,30		739,18743
51	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_5$	29,61		269,04500
52	Isorhamnetin (3'-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_7$	29,76		315,05048
53	Dimethoxy-trihydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_7$	29,80		329,06613
54	Coumestrol	$C_{15}H_8O_5$	29,84	269,04500	
55	Hispidulin (6-Methoxy-4',5,7-trihydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_6$	30,14		299,05557
56	Kaempferol-O-coumaroylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 2	$C_{36}H_{36}O_{17}$	30,27		739,18743
57	Vestitol (2',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavan)	$C_{16}H_{16}O_4$	30,29	273,11269	
58	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 1	$C_{18}H_{16}O_7$	30,68		343,08178
59	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_4$	30,78	269,08138	
60	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_4$	30,98	271,09704	
61	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_8$	31,23		359,07669
62	Dihydroxy-dimethoxy(iso)flavane	$C_{17}H_{18}O_5$	31,57	303,12325	
63	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 2	$C_{18}H_{16}O_7$	33,09		343,08178
64	Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone	$C_{19}H_{18}O_8$	33,19	375,10800	
65	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	33,28		229,14399
66	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_5$	33,37		283,06065
67	Sativan (2',4'-Dimethoxy-7-hydroxyisoflavan)	$C_{17}H_{18}O_4$	34,15	287,12834	
68	Soyasaponin I	$C_{48}H_{78}O_{18}$	37,90		941,51100
69	Unidentified saponin 1	$C_{47}H_{76}O_{17}$	38,00		911,50043
70	Unidentified saponin 2	$C_{41}H_{66}O_{13}$	38,09		765,44252
71	Unidentified saponin 3	$C_{45}H_{72}O_{16}$	39,24		867,47422
72	Hexadecanedioic acid	$C_{16}H_{30}O_4$	40,30		285,20659
73	Juniperic acid (16-Hydroxyhexadecanoic acid)	$C_{16}H_{32}O_3$	40,80		271,22732
74	α-Linolenic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	44,70		277,21676
75	Oleamide	$C_{18}H_{35}N_O$	45,37	282,27969	
76	Linoleic acid	$C_{18}H_{32}O_2$	45,71		279,23241

Tablo 4.3. *L. corniculatus su ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	9,98		285,06105
2	Chlorogenic acid (3-O-Caffeoylquinic acid)	$C_{16}H_{18}O_9$	14,18	355,10291	
3	Caffeic acid	$C_9H_8O_4$	14,30		179,03444
4	Unidentified compound	$C_{11}H_{12}O_6$	15,89		239,05556
5	Naringenin-6,8-di-C-glucoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	16,89		595,16630
6	Quercetin-di-O-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{17}$	17,16		625,14048
7	4-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	17,69		163,03952
8	Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	18,57	377,14611	
9	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 1	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,15		739,20856
10	Kaempferol-O-hexosylhexoside-O-deoxyhexoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	19,39		755,20347
11	Kaempferol-O-deoxyhexosylhexoside-O-deoxyhexoside isomer 2	$C_{33}H_{40}O_{19}$	19,45		739,20856
12	Quercetin-3-O-[xylosyl-(1→2)-galactoside]-7-O-rhamnoside	$C_{32}H_{38}O_{20}$	19,68		741,18782
13	Kaempferol-3-O-[xylosyl-(1→2)-galactoside]-7-O-rhamnoside	$C_{32}H_{38}O_{19}$	20,65		725,19291
14	Quercetin-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	20,92		609,14557
15	Quercetin-O-deoxyhexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	21,21		609,14557
16	Kaempferol-3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,14		593,15065
17	Corniculatusin-3-O-galactoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,25		493,09822
18	Corniculatusin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	22,47		493,09822
19	Hyperoside (Quercetin-3-O-galactoside, Hyperin)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,61		463,08765
20	Quercetin-3,7-O-dirhamnoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	22,71		593,15065
21	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,86		463,08765
22	Quercetin-O-pentoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	23,46		433,07709
23	Sexangularetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	23,51		477,10330
24	Quercetin-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{15}$	23,60		549,08805
25	Kaempferol-7-O-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,09		447,09274
26	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,25		577,15573
27	Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,41	449,10839	
28	Hydroxy-methoxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_9$	24,47	431,13421	
29	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-di-O-deoxyhexoside	$C_{28}H_{32}O_{15}$	24,49		607,16630
30	Isorhamnetin-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,69		477,10330
31	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,87		477,10330
32	Kaempferol-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{14}$	25,56		533,09314
33	Methoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-O-deoxyhexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	25,70		461,10839
34	Vestitol-O-hexoside	$C_{22}H_{26}O_9$	26,32		433,14986
35	Afzelin (Kaempferol-3-O-rhamnoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	26,36		431,09782
36	Corniculatusin (8-Methoxy-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_8$	26,94		331,04540
37	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	26,95		301,03483
38	Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	27,16		271,06065
39	Kaempferol-7-O-rhamnoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	28,65		431,09782
40	Sexangularetin (8-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_7$	29,08		315,05048

Tablo 4.3.'ün devamı

41	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	29,27		285,03991
42	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_5$	29,61		269,04500
43	Dimethoxy-trihydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_7$	29,80		329,06613
44	Vestitol (2',7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavan)	$C_{16}H_{16}O_4$	30,29	273,11269	
45	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 1	$C_{18}H_{16}O_7$	30,69		343,08178
46	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_4$	30,78	269,08138	
47	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_4$	30,97	271,09704	
48	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_8$	31,24		359,07669
49	Dihydroxy-dimethoxy(iso)flavane	$C_{17}H_{18}O5$	31,58	303,12325	
50	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 2	$C_{18}H_{16}O_7$	33,10		343,08178
51	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	33,29		229,14399
52	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_5$	33,38		283,06065
53	Sativan (2',4'-Dimethoxy-7-hydroxyisoflavan)	$C_{17}H_{18}O_4$	34,14	287,12834	
54	Soyasaponin I	$C_{48}H_{78}O_{18}$	37,90		941,51100
55	Unidentified saponin 1	$C_{47}H_{76}O_{17}$	38,01		911,50043
56	Unidentified saponin 2	$C_{41}H_{66}O_{13}$	38,10		765,44252
57	Hexadecanedioic acid	$C_{16}H_{30}O_4$	40,30		285,20659
58	α-Linolenic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	44,70		277,21676

Tablo 4.4. *C.varia etil asetat (EA) ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	10,03		285,06105
2	Dihydrokaempferol-6-C-glucoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	14,11		449,10839
3	Scopoletin-7-O-glucoside	$C_{16}H_{18}O_9$	14,29	355,10291	
4	Naringenin-C-hexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	15,33		595,16630
5	Coumaroylquinic acid isomer 1	$C_{16}H_{18}O_8$	16,78		337,09235
6	Tetrahydroxy(iso)flavanone-C-hexoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	17,19	451,12404	
7	Apigenin-di-C-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	17,88	595,16630	
8	Isoorientin-O-hexoside isomer 1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,14		609,14556
9	Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin)	$C_{10}H_8O_4$	18,45	193,05009	
10	Isoorientin-O-hexoside isomer 2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,50		609,14556
11	Vicenin-2 (Apigenin-6,8-di-C-glucoside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18,91		593,15065
12	Coumaroylquinic acid isomer 2	$C_{16}H_{18}O_8$	19,08		337,09235
13	Naringenin-C-hexoside	$C_{21}H_{22}O_{10}$	19,27	435,12913	
14	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 1	$C_{22}H_{24}O_{11}$	19,60	465,13969	
15	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 2	$C_{22}H_{24}O_{11}$	20,15	465,13969	
16	Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,66	449,10839	
17	Myricetin-3'-O-glucoside (Cannabiscitrin)	$C_{21}H_{20}O_{13}$	20,87		479,08257
18	Dihydrokaempferol (Aromadendrin)	$C_{15}H_{12}O_6$	21,83		287,05557
19	Isovitexin (Homovitexin, Apigenin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	22,20	433,11348	
20	Hyperoside (Hyperin, Quercetin-3-O-galactoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,62		463,08765
21	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone-C-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	22,64	463,12404	
22	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,86		463,08765
23	Methoxy-pentahydroxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	23,17		493,09822
24	Quercetin-O-pentoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	23,43		433,07709
25	Quercetin-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	23,75		463,08765
26	Kaempferol-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,07		447,09274
27	Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_8$	24,13		317,02974

Tablo 4.4.'ün devamı

28	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,26		577,15573
29	Astragalin (Kaempferol-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,62		447,09274
30	Kaempferol-O-pentoside isomer 1	$C_{20}H_{18}O_{10}$	24,81		417,08218
31	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,87		477,10330
32	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{23}H_{24}O_{13}$	24,94		507,11387
33	Kaempferol-O-pentoside isomer 2	$C_{20}H_{18}O_{10}$	25,16		417,08218
34	Kaempferol-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{14}$	25,55		533,09314
35	Kaempferol-O-3-Hydroxy-3-methylglutaroylhexoside	$C_{27}H_{28}O_{15}$	25,78		591,13500
36	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone-O-glucuronide	$C_{22}H_{20}O_{12}$	25,81		475,08766
37	Tetrahydroxy(iso)flavone-O-acetylhexoside	$C_{23}H_{22}O_{12}$	26,47		489,10331
38	Daphnoretin	$C_{19}H_{12}O_7$	26,69		351,05048
39	Dihydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_4$	26,74		253,05009
40	Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_7$	26,90		301,03483
41	Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_5$	27,14		271,06065
42	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone isomer 1	$C_{17}H_{14}O_8$	27,74		345,06105
43	Sebacic acid	$C_{10}H_{18}O_4$	27,91		201,11268
44	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	29,24		285,03991
45	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 1	$C_{16}H_{12}O_6$	29,34		299,05556
46	Cirsiliol (6,7-Dimethoxy-3',4',5-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_7$	29,41		329,06613
47	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_5$	29,59		269,04500
48	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 2	$C_{16}H_{12}O_6$	29,68		299,05556
49	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 1	$C_{18}H_{16}O_8$	29,71		359,07669
50	Isorhamnetin (3'-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_7$	29,74		315,05048
51	Pilosin (4',6-Dimethoxy-5,7,8-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_7$	29,75		329,06613
52	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone isomer 2	$C_{17}H_{14}O_8$	29,89		345,06105
53	Liquiritigenin (4',7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_4$	29,93		255,06573
54	Hydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_3$	30,69	239,07082	
55	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_4$	30,76	269,08139	
56	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_4$	30,94	271,09704	
57	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 2	$C_{18}H_{16}O_8$	31,22		359,07669

Tablo 4.4.'ün devamı

58	Pinocembrin (5,7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_4$	32,15		255,06573
59	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_5$	32,36		283,06065
60	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_7$	33,05	345,09743	
61	Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone	$C_{19}H_{18}O_8$	33,17		373,09235
62	Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_4$	33,20	255,06573	
63	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	33,26		229,14399
64	Dimethoxy-hydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_5$	35,22	299,09195	

Tablo 4.5. *C.varia metanol (MeOH) ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	10,00		285,06105
2	Dihydrokaempferol-6-C-glucoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	14,11		449,10839
3	Scopoletin-7-O-glucoside	$C_{16}H_{18}O_9$	14,19	355,10291	
4	Naringenin-C-hexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	15,33		595,16630
5	Coumaroylquinic acid isomer 1	$C_{16}H_{18}O_8$	16,78		337,09235
6	Naringenin-6,8-di-C-glucoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	16,87		595,16630
7	Tetrahydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 1	$C_{21}H_{22}O_{11}$	17,21	451,12404	
8	7-Hydroxycoumarin (Umbelliferone)	$C_9H_6O_3$	17,61	163,03952	
9	Apigenin-di-C-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	17,88	595,16630	
10	Tetrahydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 2	$C_{21}H_{22}O_{11}$	18,04	451,12404	
11	Isoorientin-O-hexoside isomer 1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,15		609,14556
12	Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin)	$C_{10}H_8O_4$	18,44	193,05009	
13	Isoorientin-O-hexoside isomer 2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,55		609,14556
14	Vicenin-2 (Apigenin-6,8-di-C-glucoside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18,91		593,15065
15	Coumaroylquinic acid isomer 2	$C_{16}H_{18}O_8$	19,09		337,09235
16	Naringenin-C-hexoside	$C_{21}H_{22}O_{10}$	19,27	435,12913	
17	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 1	$C_{22}H_{24}O_{11}$	19,59	465,13969	
18	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 2	$C_{22}H_{24}O_{11}$	20,15	465,13969	
19	Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,66	449,10839	
20	Myricetin-3'-O-glucoside (Cannabiscitrin)	$C_{21}H_{20}O_{13}$	20,86		479,08257
21	Isorhamnetin-O-hexosylhexoside	$C_{28}H_{32}O_{17}$	20,90		639,15613
22	Quercetin-O-pentosyldeoxyhexosylhexoside	$C_{32}H_{38}O_{20}$	21,51		741,18782
23	Dihydrokaempferol (Aromadendrin)	$C_{15}H_{12}O_6$	21,83		287,05557
24	Isovitexin (Homovitexin, Apigenin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	22,22	433,11348	
25	Tetrahydroxy(iso)flavone-O-glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{12}$	22,25		461,07201
26	Hyperoside (Hyperin, Quercetin-3-O-galactoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,63		463,08765
27	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone-C-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	22,64	463,12404	
28	Quercetin-3-O-glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{13}$	22,66		477,06692
29	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,87		463,08765

Tablo 4.5.'in devamı

30	Rutin (Quercetin-3-O-rutinoside)	$C_{27}H_{30}O_{16}$	22,94	611,16122	
31	Methoxy-pentahydroxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{13}$	23,18		493,09822
32	Quercetin-O-pentoside isomer 1	$C_{20}H_{18}O_{11}$	23,44		433,07709
33	Quercetin-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	23,77		463,08765
34	Kaempferol-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,07		447,09274
35	Myricetin (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_8$	24,13		317,02974
36	Quercetin-O-pentoside isomer 2	$C_{20}H_{18}O_{11}$	24,18		433,07709
37	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,25		577,15573
38	Astragalin (Kaempferol-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,62		447,09274
39	Kaempferol-O-pentoside isomer 1	$C_{20}H_{18}O_{10}$	24,82		417,08218
40	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,88		477,10330
41	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone-O-hexoside	$C_{23}H_{24}O_{13}$	24,94		507,11387
42	Kaempferol-O-pentoside isomer 2	$C_{20}H_{18}O_{10}$	25,16		417,08218
43	Kaempferol-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{14}$	25,55		533,09314
44	Kaempferol-O-3-Hydroxy-3-methylglutaroylhexoside	$C_{27}H_{28}O_{15}$	25,79		591,13500
45	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone-O-glucuronide	$C_{22}H_{20}O_{12}$	25,83		475,08766
46	Tetrahydroxy(iso)flavone-O-acetylhexoside	$C_{23}H_{22}O_{12}$	26,48		489,10331
47	Daphnoretin	$C_{19}H_{12}O_7$	26,70		351,05048
48	Dihydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_4$	26,74		253,05009
49	Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_7$	26,92		301,03483
50	Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_5$	27,14		271,06065
51	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone isomer 1	$C_{17}H_{14}O_8$	27,74		345,06105
52	Sebacic acid	$C_{10}H_{18}O_4$	27,92		201,11268
53	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_6$	29,24		285,03991
54	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 1	$C_{16}H_{12}O_6$	29,35		299,05556
55	Cirsiliol (6,7-Dimethoxy-3',4',5-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_7$	29,42		329,06613
56	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_5$	29,59		269,04500
57	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 2	$C_{16}H_{12}O_6$	29,68		299,05556
58	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 1	$C_{18}H_{16}O_8$	29,71		359,07669
59	Isorhamnetin (3'-Methoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone)	$C_{16}H_{12}O_7$	29,75		315,05048
60	Pilosin (4',6-Dimethoxy-5,7,8-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_7$	29,78		329,06613
61	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone isomer 2	$C_{17}H_{14}O_8$	29,86		345,06105

Tablo 4.5.'in devamı

62	Liquiritigenin (4',7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_4$	29,92		255,06573
63	Hydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_3$	30,71	239,07082	
64	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_4$	30,78	269,08139	
65	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_4$	30,96	271,09704	
66	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 2	$C_{18}H_{16}O_8$	31,21		359,07669
67	Pinocembrin (5,7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_4$	32,14		255,06573
68	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_5$	32,36		283,06065
69	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_7$	33,08	345,09743	
70	Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone	$C_{19}H_{18}O_8$	33,17		373,09235
71	Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_4$	33,22	255,06573	
72	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_4$	33,25		229,14399
73	Dimethoxy-hydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_5$	35,22	299,09195	

Tablo 4.6. *C.varia su ekstraktının kimyasal içerik profili*

No.	İsim	Formül	Rt	$[M + H]^+$	$[M - H]^-$
1	Citric acid	$C_6H_8O_7$	1,56		191,01918
2	Pantothenic acid	$C_9H_{17}NO_5$	5,18	220,11850	
3	Uralenneoside	$C_{12}H_{14}O_8$	9,98		285,06105
4	Dihydrokaempferol-6-C-glucoside	$C_{21}H_{22}O_{11}$	14,16		449,10839
5	Scopoletin-7-O-glucoside	$C_{16}H_{18}O_9$	14,19	355,10291	
6	Naringenin-C-hexoside-O-hexoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	15,36		595,16630
7	Coumaroylquinic acid isomer 1	$C_{16}H_{18}O_8$	16,79		337,09235
8	Naringenin-6,8-di-C-glucoside	$C_{27}H_{32}O_{15}$	16,89		595,16630
9	Apigenin-di-C-hexoside	$C_{27}H_{30}O_{15}$	17,90	595,16630	
10	Isoorientin-O-hexoside isomer 1	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,14		609,14556
11	Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin)	$C_{10}H_8O_4$	18,45	193,05009	
12	Isoorientin-O-hexoside isomer 2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18,55		609,14556
13	Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	18,57	377,14611	
14	Vicenin-2 (Apigenin-6,8-di-C-glucoside)	$C_{27}H_{30}O_{15}$	18,92		593,15065
15	Coumaroylquinic acid isomer 2	$C_{16}H_{18}O_8$	19,09		337,09235
16	Naringenin-C-hexoside isomer 1	$C_{21}H_{22}O_{10}$	19,28	435,12913	
17	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 1	$C_{22}H_{24}O_{11}$	19,61	465,13969	
18	Naringenin-C-hexoside isomer 2	$C_{21}H_{22}O_{10}$	19,85	435,12913	
19	Methoxy-trihydroxy(iso)flavanone-C-hexoside isomer 2	$C_{22}H_{24}O_{11}$	20,16	465,13969	
20	Noscapine (Narcotine)	$C_{22}H_{23}NO_7$	20,61	414,15528	
21	Isoorientin (Homoorientin, Luteolin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20,67	449,10839	
22	Isorhamnetin-O-hexosylhexoside	$C_{28}H_{32}O_{17}$	20,91		639,15613
23	Isovitexin (Homovitexin, Apigenin-6-C-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	22,22	433,11348	
24	Tetrahydroxy(iso)flavone-O-glucuronide	$C_{21}H_{18}O_{12}$	22,24		461,07201
25	Hyperoside (Hyperin, Quercetin-3-O-galactoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,62		463,08765
26	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone-C-hexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	22,64	463,12404	
27	Isoquercitrin (Hirsutrin, Quercetin-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	22,87		463,08765
28	Quercetin-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	23,77		463,08765
29	Kaempferol-O-hexoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,08		447,09274

Tablo 4.6.'nın devamı

30	Kaempferitrin (Kaempferol-3,7-di-O-rhamnoside)	$C_{27}H_{30}O_{14}$	24,26		577,15573
31	Astragalin (Kaempferol-3-O-glucoside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	24,64		447,09274
32	Kaempferol-O-pentoside isomer 1	$C_{20}H_{18}O_{10}$	24,82		417,08218
33	Isorhamnetin-3-O-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	24,87		477,10330
34	Kaempferol-O-pentoside isomer 2	$C_{20}H_{18}O_{10}$	25,17		417,08218
35	Kaempferol-O-malonylhexoside	$C_{24}H_{22}O_{14}$	25,55		533,09314
36	Kaempferol-O-3-Hydroxy-3-methylglutaroylhexoside	$C_{27}H_{28}O_{15}$	25,78		591,13500
37	Tetrahydroxy(iso)flavone-O-acetylhexoside	$C_{23}H_{22}O_{12}$	26,49		489,10331
38	Daphnoretin	$C_{19}H_{12}O_{7}$	26,71		351,05048
39	Dihydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_{4}$	26,76		253,05009
40	Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_{5}$	27,14		271,06065
41	Dimethoxy-tetrahydroxy(iso)flavone	$C_{17}H_{14}O_{8}$	27,77		345,06105
42	Sebacic acid	$C_{10}H_{18}O_{4}$	27,92		201,11268
43	Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_{6}$	29,25		285,03991
44	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 1	$C_{16}H_{12}O_{6}$	29,36		299,05556
45	Cirsiliol (6,7-Dimethoxy-3',4',5-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_{7}$	29,43		329,06613
46	Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_{5}$	29,60		269,04500
47	Methoxy-trihydroxy(iso)flavone isomer 2	$C_{16}H_{12}O_{6}$	29,70		299,05556
48	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 1	$C_{18}H_{16}O_{8}$	29,72		359,07669
49	Pilosin (4',6-Dimethoxy-5,7,8-trihydroxyflavone)	$C_{17}H_{14}O_{7}$	29,79		329,06613
50	Liquiritigenin (4',7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_{4}$	29,91		255,06573
51	Hydroxy(iso)flavone	$C_{15}H_{10}O_{3}$	30,71	239,07082	
52	Hydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_{4}$	30,77	269,08139	
53	Medicarpin (3-Hydroxy-9-methoxypterocarpan)	$C_{16}H_{14}O_{4}$	30,97	271,09704	
54	Trihydroxy-trimethoxy(iso)flavone isomer 2	$C_{18}H_{16}O_{8}$	31,22		359,07669
55	Pinocembrin (5,7-Dihydroxyflavanone)	$C_{15}H_{12}O_{4}$	32,16		255,06573
56	Dihydroxy-methoxy(iso)flavone	$C_{16}H_{12}O_{5}$	32,38		283,06065
57	Dihydroxy-trimethoxy(iso)flavone	$C_{18}H_{16}O_{7}$	33,08	345,09743	
58	Dihydroxy-tetramethoxy(iso)flavone	$C_{19}H_{18}O_{8}$	33,17		373,09235
59	Chrysin (5,7-Dihydroxyflavone)	$C_{15}H_{10}O_{4}$	33,19	255,06573	
60	Dodecanedioic acid	$C_{12}H_{22}O_{4}$	33,26		229,14399

5. TARTIŞMA

Karsinojenez süreci, protoonkogenler de dahil olmak üzere mutasyon gibi bir dizi olayla gerçekleşir. ROS (Reaktif Oksijen Türleri) kaynaklı DNA hasarı mutasyonların oluşumuna neden olur [27]. *L. corniculatus* bitkisinin DNA koruma aktivitesine bakıldığında su ekstraktı, oksidatif reaktife karşı yaklaşık %50 DNA koruyucu etki göstermiştir, EA ve MeOH ekstraktları ise yaklaşık %25 olarak daha az DNA koruma aktivitesine sahiptir. Ekstraktların DNA koruma aktivitesi, *Lotus corniculatus* bitkisi toprak üstü kısımların farklı metabolik bileşiklerinin varlığı ile açıklanabilir. Ekstraktlarda, naringenin, apigenin, kuersetin ve türevleri belirlenmiştir. Önceki çalışmalara göre, diyet (beslenme yoluyla alınan) flavonoidler antioksidan özelliklere bağlı olarak kanserde kemopreventif etkiler göstermişlerdir [166]. Örneğin, kuersetinin yeşil çay ekstraktındaki H_2O_2 ile muamele edilen MeI-Ab hücreleri üzerindeki hidrojen peroksitin neden olduğu oksidatif strese karşı hücreleri koruduğu bir çalışmada gösterilmiştir [167]. Kuersetin ve türevlerinin, özellikle lipitler, proteinler ve DNA gibi farklı biyomoleküller ile reaksiyona girdiğinde, ROS'a karşı en güçlü antioksidan olduğu bilinmektedir [168]. Ayrıca önceki çalışmamızda baklagil ailesinin başka bir türü olan *Ononis natrix subsp. hispanica* bitkisinin DNA koruma aktivitesi incelenmiş olup yüksek miktarda kuersetin içeren su ekstraktının DNA %78 oranında koruduğu görülmüştür [169]. Ayrıca, naringenin (5,7,4'-trihidroksiflavanon), de güçlü antioksidan, antikarsinojenik, anti-enflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antimutagenik, antiaterojenik, serbest radikal temizleyici, hepatoprotektif ve antiferogenik ajan olarak farmakolojik açıdan önemli bir başka bileşiktir. [170, 171]. Bu bileşik, greyfurt (*Citrus paradisi*) ve portakal (*Citrus sinensis*) gibi turunçgillerde bol miktarda bulunan bir flavonoid türüdür. Bir başka çalışmada naringeninin DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir [172]. Başka bir çalışmada, naringenin kurşun kaynaklı oksidatif hasara karşı antioksidan etki gösterdiğini ve karaciğer ve sıçan böbreklerini hasardan koruduğu gösterilmiştir [173]. *L. corniculatus* bitkisinin su ekstraktında bulunan diğer önemli içerik olan riboflavin (7,8-dimetil-10-ribitil-izoalokoksazin), çok çeşitli yiyeceklerde bulunan suda çözünebilen bir vitamindir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hepatokarsinojenlere maruz kalan sıçanlarda

riboflavin eksikliğinin, DNA iplikçik kırılmasında artışa yol açtığını göstermiştir. Riboflavin eksikliği bulunan hayvanlarda, malign transformasyonlarda ilaca dirence katkıda bulunan onarım enzimlerinin indüksiyonunun arttığı görülmüştür. Riboflavin eksikliği olan sıçanlarda DNA'ya kanserojen bağlanmasının arttığının gözlenmesiyle riboflavinin karsinojenezdeki koruyucu rolü desteklenmiştir [174]. Ayrıca, bir çalışmada riboflavin eksikliğinin antioksidan sistemin bozulması yoluyla oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, riboflavinin, NF-kβ, TOR, MLCK ve Nrf2 gibi hücreiçi sinyal yollarını da düzenlediği ortaya çıkarılmıştır [175]. Bu nedenle, *L. corniculatus* bitkisinin su extraktının yüksek kuersetin, naringenin ve riboflavin (vitamin B2) içerikleri nedeniyle DNA'nın korunmasında potansiyel bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilir.

L. corniculatus toprak üstü kısımlarının ekstraktlarının triple negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücresi ve östrojen reseptörü pozitif MCF-7 meme kanseri hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT hücresi canlılık testi kullanılarak belirlenmiştir. Meme kanseri hücreleri, 24, 48 ve 72. saatlerde farklı dozlarda ekstraktlarla muamele edilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre canlılıkları zamana ve doza bağlı olarak azalmıştır. Su ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerinde diğer ekstraktlara göre daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, 1000 µg/ml su ekstraktının 72 saatte MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını azalttığı görülmüştür. En önemli sitotoksik etki her iki meme kanseri için de EA ve MeOH ekstraktlarında belirlenmiştir. MTT hücre canlılık testine göre ekstraktların hücreler üzerindeki IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Su ekstraktı ile muamele edilen meme kanser hücrelerinin canlılığı %50'den fazla olduğu için IC_{50} değerleri hesaplanamamıştır. Bir sonraki analizler için EA ve MeOH ektraktlarının en düşük IC_{50} değerleri seçilmiştir. MCF-7 kanser hücrelerine karşı inhibe edici konsantrasyonlar EA için 245,8 µg/ml ve MeOH için 589,4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Ayrıca, MDA-MB-231 kanser hücrelerine karşı IC_{50} değerleri ise EA için 161,7 µg/ml ve MeOH için 442,9 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu kantitatif ölçüm, belirli bir biyolojik prosesin ortaya çıkarılması için bir ilacın veya inhibitörün ne kadarının gerekli olduğunu gösterir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin ölüm mekanizmalarının aydınlatılması için *L. corniculatus* EA ve MeOH ekstraktlarının IC_{50} dozlarıyla muamele edilmiştir. Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının analizi için *Bax* (pro-apoptotik gen) ve *Bcl-2* (anti-apoptotik gen) gen ifadeleri analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, MCF-7

hücrelerinin EA ekstraktı ile muamelesinden sonra, *Bax* gen ifadesi azalırken, *Bcl-2* gen ifadesi arttığı görülmüştür. Sonuç olarak, kaspaz-3 bağımsız MCF-7 meme kanseri hücre hattında mRNA seviyesinde apoptotik hücre ölümü saptanmamıştır. MDA-MB-231 hücrelerinin EA ekstraktı ile muamelesinden sonra *Bax* gen ekspresyonu artmış ve *Bcl-2* gen seviyesi azalmıştır. Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinin MeOH ekstraktı ile muamele edilmesinden sonra *Bax/Bcl-2* gen oranında önemli bir değişiklik saptanmamıştır. MDA-MB-231 hücrelerinin EA ekstraktı ile muamele edilmesinden sonra mRNA transkript seviyesinde apoptotik hücre ölümü tespit edilmiştir. Daha sonra, apoptoz, DNA seviyesinde apoptotik DNA fragmantasyon analizi ile de doğrulanmıştır. EA ekstraktının MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi, bir yağlı amid lipit molekülü olan linoleik asitten türetilmiş "linoleamid" ile ilişkili olduğu düşünülmüştür [176]. Önceki çalışmalarda, konjuge linoleik asitlerin (CLA) kanser koruyucu ajanlar olduğu rapor edilmiştir [177]. Ayrıca CLA'nın MDA-MB-231 hücrelerinde pro-apoptotik *Bax* geninin ekspresyonuna neden olduğu bir çalışmada gösterilmiştir [178]. Daha önce, oleamidin yapısal analoğu olan linoleamidin T24 hücreleri (insan mesane kanseri hücreleri) üzerindeki etkisi belirlendi ve doza bağlı bir şekilde Ca^{+2} artışına sebep olduğu gösterilmiştir [179]. Hücre çekirdeğinde Ca^{+2} artışı, gen ekspresyonu ve hücre döngüsünde yapısal değişimlere sebep olarak programlanmış hücre ölümüne ve dolayısıyla da apoptoza yol açmaktadır. Ca^{+2} birikimi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu yoluyla da apoptotik hücre ölümü mekanizmasında kritik adımı tetiklemiştir [180, 181]. Bulguların diğer çalışmalarla karşılaştırılması, EA ekstraktında linoleamid varlığının, MDA-MB-231 kanser hücrelerinin proliferasyonunu apoptoz mekanizması ile inhibe ettiğini doğrulamaktadır. DNA fragmantasyonu, apoptozun biyokimyasal bir işaretidir ve kaspaz 3 inhibitörü vardığında ortaya çıkar. CAD (Caspase-Activated DNase), kromozomal DNA'yı nükleer fragmentlere parçalar ve apoptozu başlatır [182]. DNA ladder metodu kullanılarak MCF-7 meme karsinomu hücre hattında apoptoz belirlenemez, çünkü MCF-7 hücre hattı, kaspaz-3-bağımsız olduğu için diğer efektör ölüm kaspazları vasıtasıyla apoptoz geçirir [183, 184]. *Bcl-2* ailesi proteinleri, bazı translasyon sonrası mekanizmaların sonucu olarak birçok kanserde aşırı eksprese edilir [185]. *Bcl-2* ailesi proteinleri, *Bax* aktivasyonuyla birlikte mitokondriden kaspaz aktivasyonuyla mitokondriyal dış membran geçirgenliğinden (MOMP) sitokrom c

salınımını uyararak apoptozu başlatır. *Bcl-2* ailesi üyeleri, pro-apoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinler olarak sınıflandırılabilir. Pro-apoptotik proteinler arasında, *Bax* ve *Bak* gen ifadeleri MOMP'yi indüklemek için yeterlidir [186]. *Bcl-2* ile ilişkili proteinler ayrıca apoptoz ve otofaji arasında çapraz etkileşimlere neden olur. *Beclin-1*, tekli-BH3-protein ile etkileşerek anti-apoptotik *Bcl-2* proteinlerine bağlanabilir ve böylece otofajiyi düzenler [186]. İmmünohistokimya raporlarına göre, *Beclin-1* protein ekspresyonu meme karsinomunda anlamlı bir şekilde azalmıştır [187]. *Bad*, *Bax* ve tekli-BH3-proteinleri, *Beclin-1* ve *Bcl-2* ailesi proteinlerini birbirlerinden yarışmalı bir şekilde ayırmaya ve böylece otofajiyi başlatmaya neden olurlar [188]. İmmünohistokimyasal analizlere göre, *Beclin-1* ve *LC3-II* genleri insan akciğer kanseri dokularında ifadesinin azaldığı görülmüştür. Fosfatidilinositol 3-fosfat kinaz (PI3K) -AKT – mTOR sinyal yolu, hücrenin hayatta kalmasından sorumludur ve bu yol mekanizması vasıtasıyla otofaji uyarılır [189]. Çalışmamızda, *L. corniculatus* EA ekstraktı ile muamele edildikten sonra *Beclin-1* ve *LC3-II* otofajik genler, kaspaz-bağımsız MCF-7 hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilirken, *Bax* geni ifade seviyesinin azaldığı görülmüştür. *Bcl-2* geni ifade seviyesi, otofajik mekanizma nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Kaspazdan bağımsız MCF-7 hücrelerinde, EA ekstraktları ile muameleden sonra, otofajinin, tip 2 hücre ölüm mekanizmasına (apoptotik olmayan hücre ölüm mekanizması) neden olmuş olabileceği görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde MeOH ekstraktı muamelesinden sonra gen ifadelerinde belirgin bir değişiklik olmadığı görülmüştür. EA ve MeOH ekstraktlarıyla muamele sonrasında, MDA-MB-231 hücrelerinin *Beclin-1* gen ekspresyonunda bir değişiklik olmadığı görülmüştür. *LC3-II* gen ifade seviyesinde ise çok az bir azalma görülmüştür. MeOH ekstraktı ile muamele sonrasında ise MCF-7 hücrelerinde, *LC3-II* gen ifade seviyesinde artış tespit edilmiştir. *LC3-II* gen ifadesinin artışının, MeOH ekstraktı içerisinde bulunan kaempferol-O-koumaroilheksosid-O-deoksiheksosid izomer 2 ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çünkü bir çalışmada kaempferolün, SNU-216 gastrik kanser hücrelerinde ATG7 ve LC3-II/I'nin protein ifade seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir [190]. MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin *L. corniculatus* EA ve MeOH ekstraktları ile muamelesinden sonra telomeraz aktivite belirleyici geni *TERT-1* incelenmiştir. Çalışmada, kanserlerde ifade seviyesi yüksek olan hTERT (insan TERT) geni kullanılmıştır. Kanser hücreleri ölümsüzlüğü için telomeraz aktivitesi oldukça önemlidir. Telomeraz

aktivitesi kanser tedavisi için bir strateji olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, yalnız MDA-MB-231 hücrelerinin *L. corniculatus* MeOH ekstraktları ile muamelesinden sonra *TERT-1* gen ifadesinde önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Telomeraz aktivitesinin, kanser proliferasyonunda tanısal bir belirteç olarak kullanılabileceği önceki çalışmalarla belirlenmiştir [191]. Yukarıda da belirtildiği gibi, kaempferolün, SNU-216 hücre canlılığını ve proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür, bu nedenle MDA-MB-231 hücrelerinin antiproliferatif aktivitesi, MeOH ekstraktı içerisindeki kaempferol metabolik bileşiği varlığı ile ilişkilendirilebilir. Bu kapsamlı gen ekspresyonu analizine ek olarak, *L. corniculatus*'un anti-metastatik aktivitesini tespit etmek amacıyla hücre göçü analiz testi yapılmıştır. Hücrelerdeki EA ve MeOH ekstraktlarının anti-metastatik etkinliği, oleamid ve linoleamid türevleriyle bağlantılı olabilir. Endojen uykuya neden olan lipid hormonu olan oleamid ve türevlerinin BL6 fare melanom hücrelerinde spontan metastazı inhibe ettiği bildirilmiştir [192]. Başka bir çalışmada, 3'-0-metillenmiş kuersetinin bir metaboliti olan isorhamnetin, tek başına mide kanser hücrelerinin göç kabiliyetini belirgin şekilde önlediği görülmüştür [193]. Başka bir çalışmada da, isorhamnetin PANC-1 pankreas adenokarsinom hücre hattında hücre göç aktivitelerini inhibe etmiştir. Literatüre göre, MeOH ekstraktı içindeki aktif flavonoid olan isorhamnetinin, yemek borusu, mide, lösemi, melanoma, kolon ve akciğer kanserlerine karşı bir anti-kanser madde olarak bilinir [194]. İzoramnetin (Isorhamnetin), bir çeşit besin flavonoidi olup, maydanoz, dereotu otu, frenk soğanı, soğan, su teresi, armut ve şarapta bol miktarda bulunur. Başka bir çalışmada, isorhamnetinin anti-melanoma etkileri araştırılmış ve bunun neoplastik hücre transformasyonu kaynaklı epidermal büyüme faktörü (EGF) inhibisyonuyla ile ilişkili olduğu bulunmuştur [195, 196].

C. varia bitkisinin DNA koruma aktivitesine bakıldığında, MeOH ve su ekstraktları, plazmit DNA'yı fenton karışımına karşı korumuş ve belirgin DNA bantları oluşturmuştur. Buna göre, su ekstraktı yaklaşık %50'den fazla bir koruma etkisi ile en yüksek koruma aktivitesine sahip olmuştur. Su ekstraktından sonra MeOH ekstraktının yaklaşık %40 DNA koruma aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. EA ekstraktında pozitif kontrole kıyasla çok az koruma aktivitesi görülmüştür. Ekstraktların biyolojik aktiviteleri *Coronilla varia L.* bitki ekstraktlarının fenolik içerikleriyle açıklanmıştır. Özellikle apigenin maddesinin bütün ekstraktlarda

dominant olarak var olduğu tespit edilmiştir. Apigenin ardından, MeOH ekstraktında kuersetin türevleri, 7-hidroksikoumarin (umbelliferone), tetrahidroksi (izo) flavanon-C-heksosid izomer 2 ve rutin (Quercetin-3-O-rutinoside) varlığı tespit edilmiştir. Su ekstraktında ise sitrik asit, pantotenik asit, riboflavin, naringenin-C-heksosid izomer 2 ve noscapine (narcotine) varlığı belirlenmiştir. Bunlar arasında antioksidan aktivite ile ilişkili metabolik bileşikler tartışılmıştır. Daha önceki çalışmalarımızda belirtildiği gibi, kuersetin ve türevleri iyi serbest radikal temizleyicileridir ve antioksidanlar ve Fenton reaksiyonuna karşı DNA koruma yeteneğine sahiptirler [169, 197].

Kimyasal olarak 4',5,7-trihidroksiflavon olarak bilinen apigenin, sebzeler, meyveler, içecekler, maydanoz, üzüm, elma, papatya çayı ve şarap içeriğinde bol miktarda bulunur. Son çalışmalara göre apigenin, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sisteminin II sınıfı içinde tanımlanmıştır. Fizyolojik olarak anti-kanser, antioksidan, antiviral, antibakteriyel, anti-inflamatuar ve kan basıncını düşürücü etkileri ile bilinir [198]. Apigenin iyi bir kanser kemopreventif maddesidir ve *in vitro* olarak sitostatik ve antianjiyojenik etki göstermiştir [199].

Bir çalışmada rutin ve kuersetinin fenton reaksiyonu içerisinde süperoksit ve hidroksi radikal oluşumunu önlediği bildirilmiştir [199]. Başka bir çalışma rutinin, toplam antioksidan aktivitesini, serbest radikal ve süperoksit anyon radikal temizleyici etkisini, hidroksil radikal temizleme etkinliği ve konsantrasyona bağlı bir şekilde lipit peroksidasyon etkisini göstermiştir [200]. Bir çalışmada umbelliferonenin antioksidan özellikleri değerlendirilmiş ve sonuç olarak bu flavonoidin STZ-diyabetik sıçanlarda lipid peroksidasyon aktivitesini azalttığı görülmüştür [201]. Su ekstraktında bulunan riboflavin ise suda çözülebilen bir vitamindir ve bir raporda riboflavin eksikliğinin balıkların solungaçlarında oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir [175]. Diğer önemli bileşik pantotenik asit, memeli hücrelerinde koenzim A (CoA) 'nın biyosentezini sağlayan temel bir vitamindir. CoA, yağ asitlerinin, karbonhidratların, piruvat, laktat, keton cisimlerinin ve amino asitlerin oksidasyonu için bir kofaktör enzimidir [202]. C vitamini, E, β-karoten gibi bazı vitaminler yüksek antioksidan kapasiteleri ile bilinir. Ayrıca, pantotenatın da (pantotenik asit) bir çalışmada deoksiriboz oksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür [203].

C.varia ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki toksisite analizi, MTT bazlı sitotoksisite testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler ekstraktlarla 24, 48 ve 72 saatlik çeşitli dozlarda muamele edilmiştir. Sonuç olarak, her iki hücrenin canlılığı da zaman ve doza bağlı bir şekilde azalmıştır. En etkili ekstrakt, düşük etkili dozda EA ve EA sonrasında, MeOH ekstraktı olarak belirlenmiştir. Su ekstraktının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde MCF-7 hücrelerinden daha etkili olduğu görülmüştür. Hücre canlılığı testine göre, hücreler üzerindeki ekstraktların IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. MCF-7 hücreleri için MeOH ve EA'nın en düşük IC_{50} değerleri sırasıyla 817 ug/ml ve 371 ug/ml olarak belirlenmiştir. MCF-7 hücreleri üzerinde su ekstraktı için IC_{50} değeri belirlenememiştir. MDA-MB-231 hücreleri için MeOH, EA ve su ekstraktlarının en düşük IC_{50} değerleri sırasıyla 597,7 µg/ml, 386,4 µg/ml ve 824,1 µg/ml olarak belirlenmiştir. Maddelerin IC_{50} değeri hücreiçi sinyal iletim yolundaki biyolojik aktivitelerin aydınlatılması için önemli konsantrasyondur. mRNA transkript seviyesindeki hücre ölüm mekanizmasını belirlemek için MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri, IC_{50} değerleri ile muamele edilmiştir. Bulgularımıza göre, MDA-MB-231 hücrelerinde *C. varia* su ekstraktı ile muamele sonrası *Bax* pro-apoptotik gen ifade seviyesi artmış ve *Bcl-2* anti-apoptotik gen ifadesi azalmıştır. Bu sonuçlar, MDA-MB-231 hücrelerinde su ekstraktı muamelesi sonrası apoptotik hücre ölüm mekanizmasının başlamış olabileceğini düşündürmüştür. Ancak DNA fragmentasyon analizi sonucu apoptotik hücre ölümü geçirmediği tespit edilmiştir. Su ekstraktı, diğer ekstraktlardan farklı olan noskapin (narkotin) içerir. Noskapin, kalp çarpıntısı karşıtı, anti-kanser ve öksürük kesici de dahil olmak üzere çeşitli tıbbi uygulamalara sahiptir. Düşük toksisitede etkin olarak kullanılan güvenli bir ilaç olan noskapin, bazı çalışmalara göre mitotik büyüme fazındaki hücrelerde proliferasyonu engellemiştir [204]. Ayrıca, fare meme tümörlerinde mikrotübüllerin bağlanmasını inhibe ederek ve mitoz evresinde hücrelerin bölünmesini durdurarak apoptoza sebep olmuştur [205]. Ayrıca, noskapinin, ilaç direnç mekanizmasını tersine çevirebildiği ve OVCAR3 hücre hatlarının vinkristin ve doksorubisine karşı duyarlılığını arttırdığı görülmüştür [206]. Ayrıca, K562 apoptoz dirençli hücrelerde, *Bax/Bcl-2* oranını da arttırdığı görülmüştür [204]. *Bax* ve *Bcl-2* gen ifadeleri, MDA-MB-231 hücrelerinde EA ekstraktı ile muamele edildikten sonra azalmış olup MeOH ekstraktı ile muamele edildikten sonra *Bax* geni ifadesi azalırken, *Bcl-2* geni ifade seviyesi artmıştır. Bu

bulgular, MDA-MB-231 hücrelerinin MeOH ekstraktı ile muamele sonrasında hücre ölüm mekanizmasının, apoptoz olmadığını açıkça göstermiştir. Öte yandan, MCF-7 hücrelerinde EA ekstraktı ile muamele edildikten sonra *Bax* geninin ekspresyonu artmış ve *Bcl-2* geni ifadesi azalmıştır. Apigenin, *C.varia* bitkisinde her üç ekstraktın, özellikle EA ekstraktının dominant fenolik içeriğidir. İnsan kanserlerinde, apigenin içsel veya dışsal yol yoluyla apoptozun güçlü bir başlatıcısı olduğu gösterilmiştir [198]. Bir çalışmada, apigeninin insan promyelositik lösemi HL-60 hücrelerinde mitokondriyal dış membran potansiyelini (MOMP) azalttığı ve mitokondriden sitokrom c'nin sitozole salınımı uyararak ve procaspaz 9'ın aktifleşmesiyle intrinsik yol yoluyla apoptotik hücre ölüm mekanizmasını gerçekleştirdiği bildirilmiştir [207]. MCF-7 hücrelerinde MeOH ekstraktı ile muamele edildikten sonra *Bax* ve *Bcl-2* gen ifadeleri artmıştır. Beklenmeyen bu sonucun MeOH ekstraktlarındaki metabolik maddelerin sinerjistik olmayan etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Otofajik mekanizmayı değerlendirmek için *Beclin-1* ve *LC3-II* genleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, EA ekstraktları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin *Beclin-1* ve *LC3-II* gen ifadelerinin, *Bcl-2* geninden bağımsız olarak arttığı görülmüştür. Buna karşılık, MeOH ekstraktları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde *Beclin-1* ve *LC3-II* gen ifadelerinin, *Bcl-2* geninden bağımsız olarak azaldığı görülmüştür. Ayrıca, EA ekstraktları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde *Beclin-1* ve *LC3-II* gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Ancak, MeOH ekstraktları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde *LC3-II* gen ifadesinin arttığı, *Beclin-1* gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Su ekstraktlarıyla muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise *Beclin-1* gen ifadesinin azaldığı görülmüş, *LC3-II* gen ifadesinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bazı beklenmedik sonuçların, otofaji ve apoptoz belirleyici genler arasındaki çapraz etkileşimden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. *C. varia* ekstraktları ile muamele edilen MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin telomeraz altivitesini belirlemek için *TERT-1* geni kullanılmıştır. Sonuçlara göre, MDA-MB-231 hücrelerinde *TERT-1* gen ifadesi, sadece EA ekstraktı ile muamele edildikten sonra azalmış ve MCF-7 hücrelerinde ise, sadece MeOH ekstraktı muamelesinden azalmıştır. MCF-7 meme kanseri hücrelerindeki telomeraz aktivitesi azalmasının MeOH ekstraktında bulunan rutin (Quercetin-3-O-rutinoside) ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Kanser hücrelerinin telomeraz aktivitesi, malign

hücrelerin yüksek proliferatif kabiliyetleriyle ilgilidir. Önceki çalışmalarda rutinin, kolorektal kanser hücre hatlarında hücre büyümesini ve anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir [208].

C. varia ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-metastatik aktivitesini değerlendirmek amacıyla, hücre göçü testi kullanılmıştır. Sonuç olarak, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin hücre göç kabiliyeti EA ve MeOH ekstraktları ile muamelesinden sonra inhibe edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde yara, su ekstraktı ile muamele edildikten sonra 48 saate gelindiğinde kapanmıştır, hücre metastazı devam etmiştir. İyi huylu tümörlerden farklı olarak kötü huylu tümörler diğer dokulara invazyon yoluyla metastaz yapabilir. Metastatik aktivite, ilaca karşı artan direnç mekanizmasından dolayı kemoterapi ilaçlarının temel problemlerinden biridir. *In vitro* kanser hücreleri ve *in vivo* hayvan modellerinde yapılan deneyler, apigenin kanser hücresi göçünü ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermiştir [198]. Başka bir çalışmada, prostat kanseri DU145 hücrelerinde, apigeninin doza bağlı bir şekilde hücre invazyonunu ve göçünü önlediği görülmüştür [209].

6. SONUÇLAR

Bu çalışma, *L. corniculatus* ve *C. varia* bitkilerinin toprak üstü kısımlarının biyolojik, farmakolojik ve meme kanseri hücrelerinde anti-kanser etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır. Ekstraktların *in vitro* DNA koruma ve anti-kanser etkileri ortaya konulmuştur.

L. corniculatus EA ekstraktı ile muamele edilmiş triple negatif bazal tip MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde mRNA transkript seviyesinde ve DNA fragmentasyon analizi ile apoptoz mekanizması tespit edilmiştir. Fragmentlerine ayrılmış DNA, apoptozun biyokimyasal olarak geçekleştiğini gösteren en net belirteçtir. Bu mekanizmanın gerçekleşmesini sağlayan ve yalnız EA ekstraktında bulunan maddenin linoleamid maddesi kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Linoleamidin, hücre içi Ca^{+2} miktarının artışına sebep olmasıyla birlikte mitokondriden sitokrom c salınımıyla apoptozun başlamasına sebep olduğu düşünülmüştür.

L. corniculatus EA ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde otofaji gen ifadelerinin artışıyla ve *Bax/Bcl-2* oranının azalmasıyla tip 2 hücre ölümünün (otofajik) gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür.

L. corniculatus su ekstraktının DNA koruma aktivitesinin ekstrakt içerisinde ağırlıklı olarak bulunan naringenin, apigenin ve kuersetin türevleri içeriklerinden kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

C. varia su ve MeOH ekstraktlarının DNA koruma aktivitesinin ekstraktlar içerisinde ağırlıklı olarak bulunan naringenin, apigenin, kuersetin türevleri, riboflavin ve pantotenik asit içeriklerinden kaynaklı olmuş olabileceği düşünülmüştür.

C. varia EA ekstraktı ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerinde *Bax/Bcl-2* oranı artışının apoptotik hücre ölümü kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu aktivitenin EA ekstraktında yoğun olarak bulunan apigenin türevlerinden kaynaklı olabileceği, literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

C. varia su ekstraktı ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde *Bax/Bcl-2* oranı artışının su ekstraktında bulunan, noskapin (narkotin) maddesi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

L. corniculatus ve *C. varia* bitkilerinin EA ve MeOH ekstraktlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde metastatik aktiviteyi inhibe ederek hücre göçünü baskıladığı görülmüştür.

7. ÖNERİLER

Bugüne kadar bitki ekstraktlarının fitokimyasal içeriklerinin gıda ve ilaç endüstrisinde farmakolojik olarak önemli özelliklerinin var olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmada apoptoz ve hücre göçü inhibisyonuna sebep olan oleik asit türevi olan linoleamidin tek veya kombine olarak öncelikle *in vitro* ve *in vivo* testlerde uygulamaları yapılabilir. Özellikle, kanser kemoterapisinde ilaç direncinin önüne geçebilecek bu maddenin ticari kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonu yapılarak hormon reseptörü olmayan meme kanseri türlerinde daha etkin bir tedavi stratejisi olabileceği düşünülmektedir. Meme kanserlerinde ilaç direncinin önüne geçebilecek, potansiyel ilaç adayı olabilecek olan bu maddenin keşfiyle ilerleyen çalışmaların önünün açılmış olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Foulds, L. (1958). The natural history of cancer. *Journal of chronic diseases, 8*(1), 2-37.

[2] Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*: Oxford University Press.

[3] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell, 100*(1), 57-70.

[4] Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Hıfzıssıhha Mektebİ Müdürlüğü, T. C. S. B. R. S. H. M. B. H. M. (2014). Ulusal Hastalık Yükü ve Maliyet-Etkililik Projesİ Hastalık Yükü Final Rapor

[5] Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine, 4*(4), 59-64.

[6] Otshudi, A. L., Vercruysse, A., & Foriers, A. (2000). Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of ethnopharmacology, 71*(3), 411-423.

[7] Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine, 10*(8), 789.

[8] Vogt, P. K. (1993). Cancer genes. *The Western journal of medicine, 158*(3), 273-278.

[9] Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England journal of medicine, 358*(5), 502-511.

[10] Molyneux, E. M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., . . . Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *The Lancet, 379*(9822), 1234-1244.

[11] Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., & Goeddel, D. V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature, 302*(5903), 33.

[12] McCoy, M. S., Toole, J. J., Cunningham, J. M., Chang, E. H., Lowy, D. R., & Weinberg, R. A. (1983). Characterization of a human colon/lung carcinoma oncogene. *Nature, 302*(5903), 79.

[13] Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., & Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science, 228*(4706), 1440-1443.

[14] Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C., & Croce, C. M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t (11; 14) chromosome translocation. *Science, 224*(4656), 1403-1406.

[15] Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., . . . Chang, E. H. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature, 300*(5888), 143.

[16] Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology, 4*(5), E131.

[17] Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., & Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annual review of biochemistry, 60*(1), 349-400.

[18] Salgia, R., & Skarin, A. T. (1998). Molecular abnormalities in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology, 16*(3), 1207-1217.

[19] Arteaga, C. L. (2002). Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The oncologist, 7*(Supplement 4), 31-39.

[20] Khan, F. M., & Gibbons, J. P. (2014). *Khan's the physics of radiation therapy*: Lippincott Williams & Wilkins.

[21] Goldschmidt, H., & Sherwin, W. K. (1980). Reactions to ionizing radiation. *Journal of the American Academy of Dermatology, 3*(6), 551-579.

[22] Ambrosone, C. B., Sweeney, C., Coles, B. F., Thompson, P. A., McClure, G. Y., Korourian, S., . . . Hutchins, L. F. (2001). Polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTM1 and GSTT1) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer research, 61*(19), 7130-7135.

[23] Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology, 166*(1-2), 3-10.

[24] Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., & Jeffrey, A. M. (2000). Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminofluorene and diethylnitrosamine. *Toxicologic pathology, 28*(3), 388-395.

[25] Sun, Y. (1990). Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine, 8*(6), 583-599.

[26] Cross, C. E., HALLIWELL, B., BORISH, E. T., PRYOR, W. A., AMES, B. N., SAUL, R. L., . . . HARMAN, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine, 107*(4), 526-545.

[27] Kang, D.-H. (2002). Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Advanced Critical Care, 13*(4), 540-549.

[28] Feig, D. I., Reid, T. M., & Loeb, L. A. (1994). Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer research, 54*(7 Supplement), 1890s-1894s.

[29] Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine, 18*(2), 321-336.

[30] Baguley, B. C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Molecular biotechnology, 46*(3), 308-316.

[31] Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., . . . Berk, D. A. (2001). Role of tumor–host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(8), 4628-4633.

[32] Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology, 8*(1), 67-113.

[33] Ramachandra, M., Ambudkar, S. V., Chen, D., Hrycyna, C. A., Dey, S., Gottesman, M. M., & Pastan, I. (1998). Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry, 37*(14), 5010-5019.

[34] Sauna, Z. E., & Ambudkar, S. V. (2000). Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 97*(6), 2515-2520.

[35] Sauna, Z. E., & Ambudkar, S. V. (2001). Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein the two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *Journal of Biological Chemistry, 276*(15), 11653-11661.

[36] Wong, S. T., & Goodin, S. (2009). Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 29*(8), 954-965.

[37] Trock, B. J., Leonessa, F., & Clarke, R. (1997). Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *Journal of the National Cancer Institute, 89*(13), 917-931.

[38] Yardley, D. A. (2013). Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes. *International journal of breast cancer, 2013*.

[39] Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., & Remiao, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & therapeutics, 149*, 1-123.

[40] Varma, M. V., Ashokraj, Y., Dey, C. S., & Panchagnula, R. (2003). P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacological research, 48*(4), 347-359.

[41] Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. *Nature Reviews Cancer, 2*(1), 48.

[42] Rivera, E., & Gomez, H. (2010). *Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: the evolving role of ixabepilone.* Paper presented at the Breast Cancer Research.

[43] O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., . . . Weinstein, J. N. (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer research, 57*(19), 4285-4300.

[44] Dumontet, C., & Sikic, B. I. (1999). Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *Journal of Clinical Oncology, 17*(3), 1061-1061.

[45] Castro, A. F., & Altenberg, G. A. (1997). Inhibition of drug transport by genistein in multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Biochemical pharmacology, 53*(1), 89-93.

[46] Katayama, K., Masuyama, K., Yoshioka, S., Hasegawa, H., Mitsuhashi, J., & Sugimoto, Y. (2007). Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure–activity relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology, 60*(6), 789-797.

[47] Singh, A. K., Schultz, B. D., Katzenellenbogen, J. A., Price, E. M., Bridges, R. J., & Bradbury, N. A. (2000). Estrogen inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride secretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 295*(1), 195-204.

[48] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology, 35*(4), 495-516.

[49] Horvitz, H. R. (1994). Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans *Apoptosis* (pp. 1-13): Springer.

[50] Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research, 301*(1), 5-17.

[51] Nagata, S. (2018). Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annual review of immunology, 36*, 489-517.

[52] Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology, 15*(1), 49.

[53] Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure, 21*(4), 501-515.

[54] Renehan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj, 322*(7301), 1536-1538.

[55] Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H., Liebermann, D. A., . . . Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene, 9*(6), 1799-1805.

[56] Vaux, D. (2002). Apoptosis and toxicology—what relevance? *Toxicology, 181*, 3-7.

[57] Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature, 284*(5756), 555.

[58] Hofmann, W.-K., de Vos, S., Tsukasaki, K., Wachsman, W., Pinkus, G. S., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2001). Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood, 98*(3), 787-794.

[59] Vallat, L., Magdelénat, H., Merle-Béral, H., Masdehors, P., de Montalk, G. P., Davi, F., . . . Delic, J. (2003). The resistance of B-CLL cells to DNA damage–induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood, 101*(11), 4598-4606.

[60] Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2000). Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods in enzymology, 322*, 15-18.

[61] Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy, 14*(2), 207-215.

[62] Kocaturk, N. M., Akkoc, Y., Kig, C., Bayraktar, O., Gozuacik, D., & Kutlu, O. (2019). Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 134*, 116-137.

[63] Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology, 19*(6), 365.

[64] Kocaturk, N. M., & Gozuacik, D. (2018). Crosstalk Between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, 6*, 128.

[65] Kang, R., Zeh, H., Lotze, M., & Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation, 18*(4), 571.

[66] Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy *Autophagosome and Phagosome* (pp. 77-88): Springer.

[67] Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell, 40*(2), 280-293.

[68] Del Bel, M., Abela, A. R., Ng, J. D., & Guerrero, C. A. (2017). Enantioselective Chemical Syntheses of the Furanosteroids (−)-Viridin and (−)-Viridiol. *Journal of the American Chemical Society, 139*(20), 6819-6822.

[69] Pasquier, B. (2015). SAR405, a PIK3C3/Vps34 inhibitor that prevents autophagy and synergizes with MTOR inhibition in tumor cells. *Autophagy, 11*(4), 725-726.

[70] Rubinsztein, D. C., Codogno, P., & Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews Drug discovery, 11*(9), 709.

[71] Irimie, A. I., Braicu, C., Zanoaga, O., Pileczki, V., Gherman, C., Berindan-Neagoe, I., & Campian, R. S. (2015). Epigallocatechin-3-gallate suppresses cell proliferation and promotes apoptosis and autophagy in oral cancer SSC-4 cells. *OncoTargets and therapy, 8*, 461.

[72] Rahmani, A. H., Al Zohairy, M. A., Aly, S. M., & Khan, M. A. (2014). Curcumin: a potential candidate in prevention of cancer via modulation of molecular pathways. *BioMed research international, 2014*.

[73] Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., & Kondo, Y. (2007). Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Molecular pharmacology, 72*(1), 29-39.

[74] Shinojima, N., Yokoyama, T., Kondo, Y., & Kondo, S. (2007). Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy, 3*(6), 635-637.

[75] Gozuacik, D., & Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene, 23*(16), 2891.

[76] Gorski, S. M., Chittaranjan, S., Pleasance, E. D., Freeman, J., Anderson, C. L., Varhol, R. J., . . . Marra, M. A. (2003). A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. *Current Biology, 13*(4), 358-363.

[77] Lee, C.-Y., Clough, E. A., Yellon, P., Teslovich, T. M., Stephan, D. A., & Baehrecke, E. H. (2003). Genome-wide analyses of steroid-and radiation-triggered programmed cell death in Drosophila. *Current Biology, 13*(4), 350-357.

[78] Elmore, S. P., Qian, T., Grissom, S. F., & Lemasters, J. J. (2001). The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *The FASEB Journal, 15*(12), 2286-2287.

[79] Lemasters, J. J., Nieminen, A.-L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y., . . . Brenner, D. A. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1366*(1-2), 177-196.

[80] Desai, B. N., Myers, B. R., & Schreiber, S. L. (2002). FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99*(7), 4319-4324.

[81] Piacentini, M., Evangelisti, C., Mastroberardino, P., Nardacci, R., & Kroemer, G. (2003). Does prothymosin-α act as molecular switch between apoptosis and autophagy? : Nature Publishing Group.

[82] Chen, D., Yu, J., & Zhang, L. (2016). Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1865*(2), 228-236.

[83] Lalaoui, N., Lindqvist, L. M., Sandow, J. J., & Ekert, P. G. (2015). *The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis.* Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.

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

[85] Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *New England journal of medicine, 370*(5), 455-465.

[86] Christofferson, D. E., & Yuan, J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current opinion in cell biology, 22*(2), 263-268.

[87] Ofengeim, D., & Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature reviews Molecular cell biology, 14*(11), 727.

[88] Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity, 38*(2), 209-223.

[89] Vanlangenakker, N., Berghe, T. V., & Vandenabeele, P. (2012). Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell death and differentiation, 19*(1), 75.

[90] Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., . . . Barker, P. A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell, 30*(6), 689-700.

[91] Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF-α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *cell, 133*(4), 693-703.

[92] Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., . . . Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science, 297*(5579), 259-263.

[93] Long, J., & Ryan, K. (2012). New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene, 31*(49), 5045.

[94] Berghe, T. V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., & Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews Molecular cell biology, 15*(2), 135.

[95] Xie, T., Peng, W., Liu, Y., Yan, C., Maki, J., Degterev, A., . . . Shi, Y. (2013). Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure, 21*(3), 493-499.

[96] Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research, 25*(3), 585-621.

[97] Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiological reviews, 99*(2), 1047-1078.

[98] Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1996). Telomeres, telomerase and cancer. *Scientific American, 274*(2), 92-97.

[99] Granger, M. P., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Telomerase in cancer and aging. *Critical reviews in oncology/hematology, 41*(1), 29-40.

[100] Holt, S. E., & Shay, J. W. (1999). Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *Journal of cellular physiology, 180*(1), 10-18.

[101] Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., . . . Shay, J. W. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes & development, 13*(7), 817-826.

[102] Herbert, B.-S., Pitts, A., Baker, S., Hamilton, S., Wright, W., Shay, J., & Corey, D. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 96*(25), 14276-14281.

[103] Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., . . . Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science, 279*(5349), 349-352.

[104] Wright, W. E., & Shay, J. W. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Current opinion in genetics & development, 11*(1), 98-103.

[105] Kirkpatrick, K., Clark, G., Ghilchick, M., Newbold, R., & Mokbel, K. (2003). hTERT mRNA expression correlates with telomerase activity in human breast cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO), 29*(4), 321-326.

[106] Heidenreich, B., & Kumar, R. (2017). TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 771*, 15-31.

[107] Colebatch, A. J., Dobrovic, A., & Cooper, W. A. (2019). TERT gene: its function and dysregulation in cancer. *Journal of clinical pathology, 72*(4), 281-284.

[108] Lipinska, N., Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Toton, E., Kopczynski, P., & Rubis, B. (2017). Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and molecular life sciences, 74*(22), 4121-4132.

[109] Shin, J.-S., Foot, T., Hong, A., Zhang, M., Lum, T., Solomon, M. J., & Lee, C. S. (2012). Telomerase expression as a predictive marker of radiotherapy response in rectal cancer: in vitro and in vivo study. *Pathology, 44*(3), 209-215.

[110] Dong, X., Liu, A., Zer, C., Feng, J., Zhen, Z., Yang, M., & Zhong, L. (2009). siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells. *BMC cancer, 9*(1), 133.

[111] Welsh, J. (2013). Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer *Animal models for the study of human disease* (pp. 997-1018): Elsevier.

[112] Harbeck, N., & Gnant, M. (2016). Early breast cancer: treatment concepts and biology.

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

[114] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians, 65*(2), 87-108.

[115] Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Akslen, L. A. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature, 406*(6797), 747.

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

[117] Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *Jama, 321*(3), 288-300.

[118] Joshi, H., & Press, M. F. (2018). Molecular oncology of breast cancer *The Breast* (pp. 282-307. e285): Elsevier.

[119] Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., . . . Jackisch, C. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England journal of medicine, 353*(16), 1659-1672.

[120] Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine, 363*(20), 1938-1948.

[121] Gorodetska, I., Kozeretska, I., & Dubrovska, A. (2019). BRCA genes: the role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *Journal of Cancer, 10*(9), 2109.

[122] Papa, A., Caruso, D., Tomao, S., Rossi, L., Zaccarelli, E., & Tomao, F. (2015). Triple-negative breast cancer: investigating potential molecular therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets, 19*(1), 55-75.

[123] Kawai, H., Li, H., Chun, P., Avraham, S., & Avraham, H. K. (2002). Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells. *Oncogene, 21*(50), 7730.

[124] Harrell, J. C., Pfefferle, A. D., Zalles, N., Prat, A., Fan, C., Khramtsov, A., . . . Perou, C. M. (2014). Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clinical & experimental metastasis, 31*(1), 33-45.

[125] Kenny, P. A., Lee, G. Y., Myers, C. A., Neve, R. M., Semeiks, J. R., Spellman, P. T., . . . Petersen, O. W. (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular oncology, 1*(1), 84-96.

[126] Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute, 51*(5), 1409-1416.

[127] Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 107*(7).

[128] Brooks, S. C., Locke, E. R., & Soule, H. D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry, 248*(17), 6251-6253.

[129] Horwitz, K., Costlow, M., & McGuire, W. (1975). MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids, 26*(6), 785-795.

[130] Bajaj, Y. (1990). Biotechnology in Agriculture and Forestry 10: Legumes and Oilseed Crops I. *New Delhi. India*, 100-113.

[131] Parpia, H. (1975). Utilization problems in food legumes. *Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding. M. Milner, ed*.

[132] Bressani, R. (1972). Legumes in human diets and how they might be improved. *Nutritional improvement of food legumes by breeding*.

[133] Aykroyd, W. R., Doughty, J., & Walker, A. F. (1982). *Legumes in human nutrition* (Vol. 20): Food & Agriculture Org.

[134] Sinclair, J., & Backman, P. (1989). Compendium of Soybean Diseases. Am. Phytopathol. *Society. St. Paul. MN, USA*.

[135] Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology, 131*(3), 872-877.

[136] Duke, J. (1992). Handbook of legumes of economic importance. *Plenum Press: New York, 131*, 872-877.

[137] Arcioni, S., Mariotti, D., Damiani, F., & Pezzotti, M. (1988). Birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus L.), crownvetch (Coronilla varia L.) and sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) *Crops II* (pp. 548-572): Springer.

[138] Larsen, K. (1958). Cytotaxonomical studies in Lotus IV. Some cases of polyploidy. *Bot. Tidsskr., 54*, 44-56.

[139] Urbanska, K. (1984). Polymorphism of cyanogenesis in Lotus alpinus from Switzerland. II. Phenotypic and allelic frequencies upon acidic silicate and carbonate. *Ber. Geobot. Inst. Zurich, 51*, 132-163.

[140] Sridhar, K., & Bhat, R. (2007). Lotus-A potential nutraceutical source. *Journal of Agricultural Technology, 3*(1), 143-155.

[141] Chiej, R. (1984). *The Macdonald encyclopedia of medicinal plants*: Macdonald & Co (Publishers) Ltd.

[142] Rafiq, S., Majeed, R., Qazi, A. K., Ganai, B. A., Wani, I., Rakhshanda, S., . . . Masood, A. (2013). Isolation and antiproliferative activity of Lotus corniculatus lectin towards human tumour cell lines. *Phytomedicine, 21*(1), 30-38.

[143] Dehpour, A., Eslami, B., Rezaie, S., Hashemian, S., Shafie, F., & Kiaie, M. (2014). Chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial and anticancer activity of the hydroalcolic extract from Coronilla varia. *World Academy of Science, Engineering and Technology Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, 1*(12), 1.

[144] Launert, E. (1981). Edible and Medicinal Plants: Covers Plants in Europe: Hamlyn Publishing Group Ltd., London.

[145] Petrovska, B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews, 6*(11), 1.

[146] Subramani, R., & Lakshmanaswamy, R. (2017). Complementary and alternative medicine and breast cancer *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 151, pp. 231-274): Elsevier.

[147] Saquib, J., Madlensky, L., Kealey, S., Saquib, N., Natarajan, L., Newman, V. A., . . . Pierce, J. P. (2011). Classification of CAM use and its correlates in patients with early-stage breast cancer. *Integrative cancer therapies, 10*(2), 138-147.

[148] Kim, M. Y., Choi, S. D., & Ryu, A. (2015). Is complementary and alternative therapy effective for women in the climacteric period? *Journal of menopausal medicine, 21*(1), 28-35.

[149] Amin, A. R., Kucuk, O., Khuri, F. R., & Shin, D. M. (2009). Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *Journal of Clinical Oncology, 27*(16), 2712.

[150] Novak, K. L., & Chapman, G. E. (2001). Oncologists' and naturopaths' nutrition beliefs and practices. *Cancer practice, 9*(3), 141-146.

[151] Elkady, A. I., Abuzinadah, O. A., Baeshen, N. A., & Rahmy, T. R. (2012). Differential control of growth, apoptotic activity, and gene expression in human breast cancer cells by extracts derived from medicinal herbs Zingiber officinale. *Journal of BioMed Research, 2012*.

[152] Shu, L., Cheung, K.-L., Khor, T. O., Chen, C., & Kong, A.-N. (2010). Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews, 29*(3), 483-502.

[153] Ghosh, B. (2000). Polyamines and plant alkaloids.

[154] Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity, 2*(5), 270-278.

[155] Lall, R., Syed, D., Adhami, V., Khan, M., & Mukhtar, H. (2015). Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International journal of molecular sciences, 16*(2), 3350-3376.

[156] Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of nutritional biochemistry, 18*(7), 427-442.

[157] Beatrice Magne Nde, C., Zingue, S., Winter, E., Beatriz Creczynski-Pasa, T., Michel, T., Fernandez, X., . . . Clyne, C. (2015). Flavonoids, breast cancer chemopreventive and/or chemotherapeutic agents. *Current medicinal chemistry, 22*(30), 3434-3446.

[158] Astin, J. A., Marie, A., Pelletier, K. R., Hansen, E., & Haskell, W. L. (1998). A review of the incorporation of complementary and alternative medicine by mainstream physicians. *Archives of Internal Medicine, 158*(21), 2303-2310.

[159] Nabavi, S. F., Atanasov, A. G., Khan, H., Barreca, D., Trombetta, D., Testai, L., . . . Pittalà, V. (2018). Targeting ubiquitin-proteasome pathway by natural, in particular polyphenols, anticancer agents: Lessons learned from clinical trials. *Cancer letters, 434*, 101-113.

[160] Moghtaderi, H., Sepehri, H., & Attari, F. (2017). Combination of arabinogalactan and curcumin induces apoptosis in breast cancer cells in vitro and inhibits tumor growth via overexpression of p53 level in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 88*, 582-594.

[161] Chow, L., Loo, W., Wai, C., Lui, E., Zhu, L., & Toi, M. (2005). Study of COX-2, Ki67, and p53 expression to predict effectiveness of 5-flurouracil, epirubicin and cyclophosphamide with celecoxib treatment in breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 59*, S298-S301.

[162] Penault-Llorca, F., & Radosevic-Robin, N. (2017). Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology, 49*(2), 166-171.

[163] Yerlikaya, A., Erdoğan, E., Okur, E., Yerlikaya, Ş., & Savran, B. (2016). A novel combination treatment for breast cancer cells involving BAPTA-AM and proteasome inhibitor bortezomib. *Oncology letters, 12*(1), 323-330.

[164] Mahomoodally, M. F., Yerlikaya, S., Llorent-Martínez, E. J., Uğurlu, A., Baloglu, M. C., Altunoglu, Y. C., . . . Puchooa, D. (2019). Pharmacological and polyphenolic profiles of Phyllanthus phillyreifolius var. commersonii Müll. Arg: An unexplored endemic species from Mauritius. *Food Research International, 115*, 425-438.

[165] Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids research, 29*(9), e45-e45.

[166] Cai, Q., Rahn, R. O., & Zhang, R. (1997). Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer letters, 119*(1), 99-107.

[167] Jeong, Y.-M., Choi, Y.-G., Kim, D.-S., Park, S.-H., Yoon, J.-A., Kwon, S.-B., . . . Park, K.-C. (2005). Cytoprotective effect of green tea extract and quercetin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Archives of pharmacal research, 28*(11), 1251.

[168] Shah, P. M., Priya, V. V., & Gayathri, R. (2016). Quercetin-a flavonoid: a systematic review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 8*(8), 878.

[169] Yerlikaya, S., Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M. C., Celik Altunoglu, Y., & Aktumsek, A. (2017). A multidirectional perspective for novel functional products: in vitro pharmacological activities and in silico studies on Ononis natrix subsp. hispanica. *Frontiers in pharmacology, 8*, 600.

[170] Çelik, H., & Arinç, E. (2010). Evaluation of the protective effects of quercetin, rutin, naringenin, resveratrol and trolox against idarubicin-induced DNA damage. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 13*(2), 231-241.

[171] Rao, V., Kiran, S., Rohini, P., & Bhagyasree, P. (2017). Flavonoid: A review on Naringenin. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6*(5), 2778-2783.

[172] Kim, J. H., & Lee, J. K. (2015). Naringenin enhances NK cell lysis activity by increasing the expression of NKG2D ligands on Burkitt's lymphoma cells. *Archives of pharmacal research, 38*(11), 2042-2048.

[173] Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z., & Liu, X. (2012). Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological trace element research, 146*(3), 354-359.

[174] Powers, H. J. (2003). Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American journal of clinical nutrition, 77*(6), 1352-1360.

[175] Chen, L., Feng, L., Jiang, W.-D., Jiang, J., Wu, P., Zhao, J., . . . Zhang, Y.-A. (2015). Dietary riboflavin deficiency decreases immunity and antioxidant capacity, and changes tight junction proteins and related signaling molecules mRNA expression in the gills of young grass carp (Ctenopharyngodon idella). *Fish & shellfish immunology, 45*(2), 307-320.

[176] Walker, J. M., Krey, J. F., Chen, J. S., Vefring, E., Jahnsen, J. A., Bradshaw, H., & Huang, S. M. (2005). Targeted lipidomics: fatty acid amides and pain modulation. *Prostaglandins & other lipid mediators, 77*(1-4), 35-45.

[177] Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., & Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer research, 51*(22), 6118-6124.

[178] MAJUMDER, B., WAHLE, K. W., MOIR, S., SCHOFIELD, A., Choe, S.-N., FARQUHARSON, A., . . . HEYS, S. D. (2002). Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *The FASEB Journal, 16*(11), 1447-1449.

[179] Lo, Y.-K., Tang, K.-Y., Chang, W.-N., Lu, C.-H., Cheng, J.-S., Lee, K.-C., . . . Su, W. (2001). Effect of oleamide on Ca2+ signaling in human bladder cancer cells. *Biochemical pharmacology, 62*(10), 1363-1369.

[180] Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *cell, 80*(2), 259-268.

[181] Nicotera, P., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (1994). Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell calcium, 16*(4), 279-288.

[182] Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research, 256*(1), 12-18.

[183] Kagawa, S., Gu, J., Honda, T., McDonnell, T. J., Swisher, S. G., Roth, J. A., & Fang, B. (2001). Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clinical cancer research, 7*(5), 1474-1480.

[184] Turner, C., Devitt, A., Parker, K., MacFarlane, M., Giuliano, M., Cohen, G., & Gregory, C. (2003). Macrophage-mediated clearance of cells undergoing caspase-3-independent death. *Cell death and differentiation, 10*(3), 302.

[185] Hata, A. N., Engelman, J. A., & Faber, A. C. (2015). The BCL2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anticancer therapeutics. *Cancer discovery, 5*(5), 475-487.

[186] Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell, 37*(3), 299-310.

[187] Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature, 402*(6762), 672.

[188] Luo, S., & Rubinsztein, D. (2010). Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell death and differentiation, 17*(2), 268.

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

[190] Zhang, F., & Ma, C. (2019). Kaempferol suppresses human gastric cancer SNU-216 cell proliferation, promotes cell autophagy, but has no influence on cell apoptosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 52*(2).

[191] Greider, C. W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 95*(1), 90-92.

[192] Nojima, H., Ohba, Y., & Kita, Y. (2007). Oleamide derivatives are prototypical anti-metastasis drugs that act by inhibiting Connexin 26. *Current drug safety, 2*(3), 204-211.

[193] Ramachandran, L., Manu, K. A., Shanmugam, M. K., Li, F., Siveen, K. S., Vali, S., . . . Smoot, D. T. (2012). Isorhamnetin inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis through the modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation pathway in gastric cancer. *Journal of Biological Chemistry, 287*(45), 38028-38040.

[194] Wang, J.-L., Quan, Q., Ji, R., Guo, X.-Y., Zhang, J.-M., Li, X., & Liu, Y.-G. (2018). Isorhamnetin suppresses PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation through S phase arrest. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 108*, 925-933.

[195] Kim, J.-E., Lee, D.-E., Lee, K. W., Son, J. E., Seo, S. K., Li, J., . . . Bode, A. M. (2011). Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer prevention research, 4*(4), 582-591.

[196] Lerman, J. S., Haslem, J., Kim, L., Ponderelli, J., Ma, M., Felson, R., . . . Wright, E. (2015). Collected Research on Phytonutrients: Flavonoids. *Journal of Culinary Science & Technology, 13*(3), 214-241.

[197] Yerlikaya, S., Baloglu, M. C., Diuzheva, A., Jeko, J., Cziáky, Z., & Zengin, G. (2019). Investigation of Chemical Profile, Biological Properties of Lotus corniculatus L. Extracts and Their Apoptotic-Autophagic Effects On Breast Cancer Cells. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.

[198] Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & bioscience, 7*(1), 50.

[199] Horvathova, K., Novotny, L., Tothova, D., & Vachalkova, A. (2004). Determination of free radical scavenging activity of quercetin, rutin, luteolin and apigenin in H~ 2O~ 2-treated human ML cells K562. *Neoplasma, 51*(5), 395-399.

[200] Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology, 41*(6), 1060-1066.

[201] Ramesh, B., & Pugalendi, K. (2006). Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life sciences, 79*(3), 306-310.

[202] Tahiliani, A. G., & Beinlich, C. J. (1991). Pantothenic acid in health and disease *Vitamins & Hormones* (Vol. 46, pp. 165-228): Elsevier.

[203] Hu, M.-L., Chen, Y.-K., & Lin, Y.-F. (1995). The antioxidant and prooxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. *Chemico-biological interactions, 97*(1), 63-73.

[204] Mahmoudian, M., & Rahimi-Moghaddam, P. (2009). The anti-cancer activity of noscapine: a review. *Recent patents on anti-cancer drug discovery, 4*(1), 92-97.

[205] Aneja, R., Zhou, J., Zhou, B., Chandra, R., & Joshi, H. C. (2006). Treatment of hormone-refractory breast cancer: apoptosis and regression of human tumors implanted in mice. *Molecular cancer therapeutics, 5*(9), 2366-2377.

[206] Rahbar-Roshandel, N., Shojaee, S., Motamen, A., & Mahmoudian, M. (2008). Noscapine reverses doxorubicin and vincristine resistance in OVCAR3 cell line. *IJPT*.

[207] Wang, I.-K., Lin-Shiau, S.-Y., & Lin, J.-K. (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of cancer, 35*(10), 1517-1525.

[208] Chen, C.-Y., Li, H., Yuan, Y.-N., Dai, H.-Q., & Yang, B. (2013). Antioxidant activity and components of a traditional Chinese medicine formula consisting of Crataegus pinnatifida and Salvia miltiorrhiza. *BMC complementary and alternative medicine, 13*(1), 99.

[209] Zhu, Y., Wu, J., Li, S., Wang, X., Liang, Z., Xu, X., . . . Chen, H. (2015). Apigenin inhibits migration and invasion via modulation of epithelial mesenchymal transition in prostate cancer. *Molecular medicine reports, 11*(2), 1004-1008.

EKLER

EK 1 ***Lotus (L.)*** **Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları**

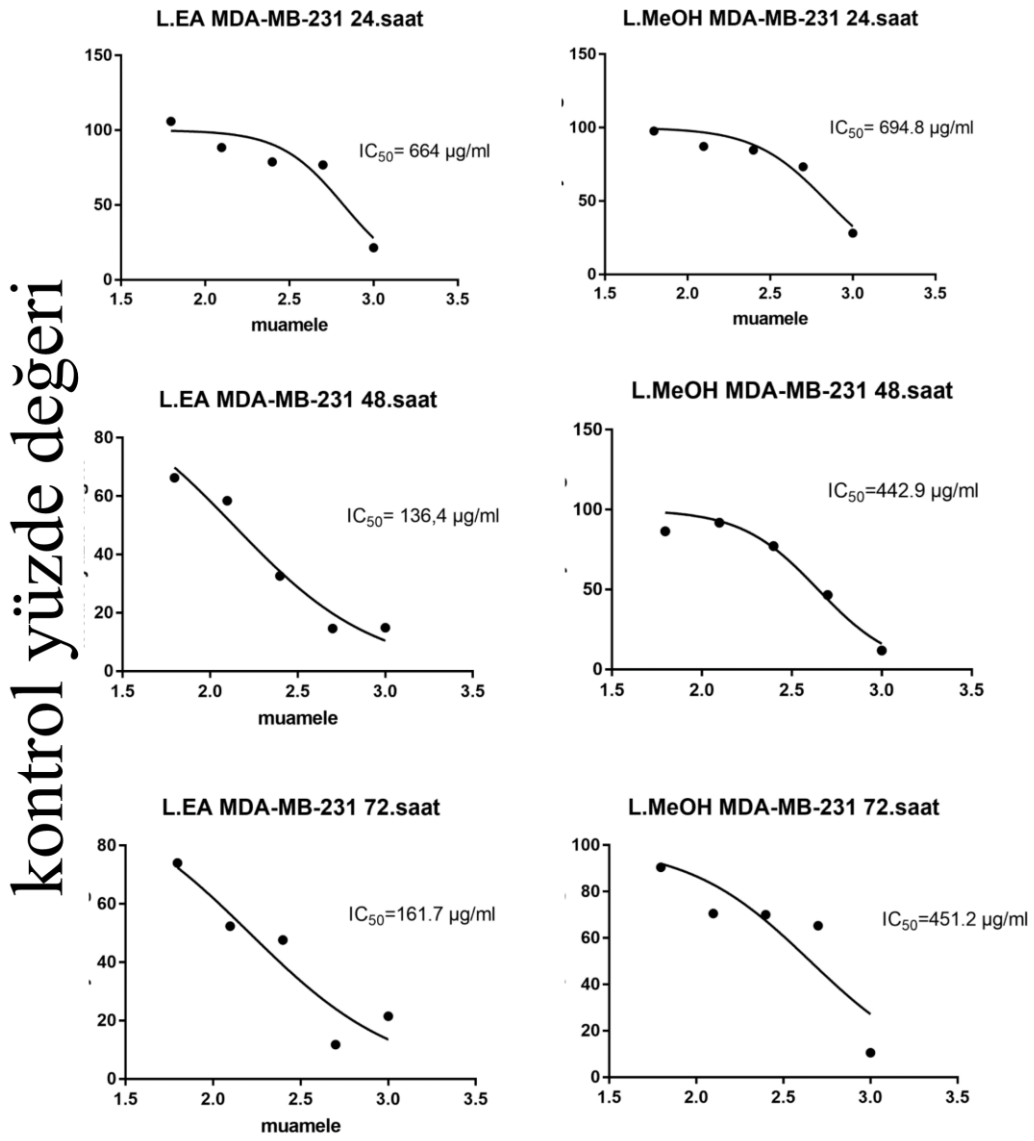
EK 2 ***Coronilla (C.)*** **Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları**

EK 3 ***Lotus (L.)*** **Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları**

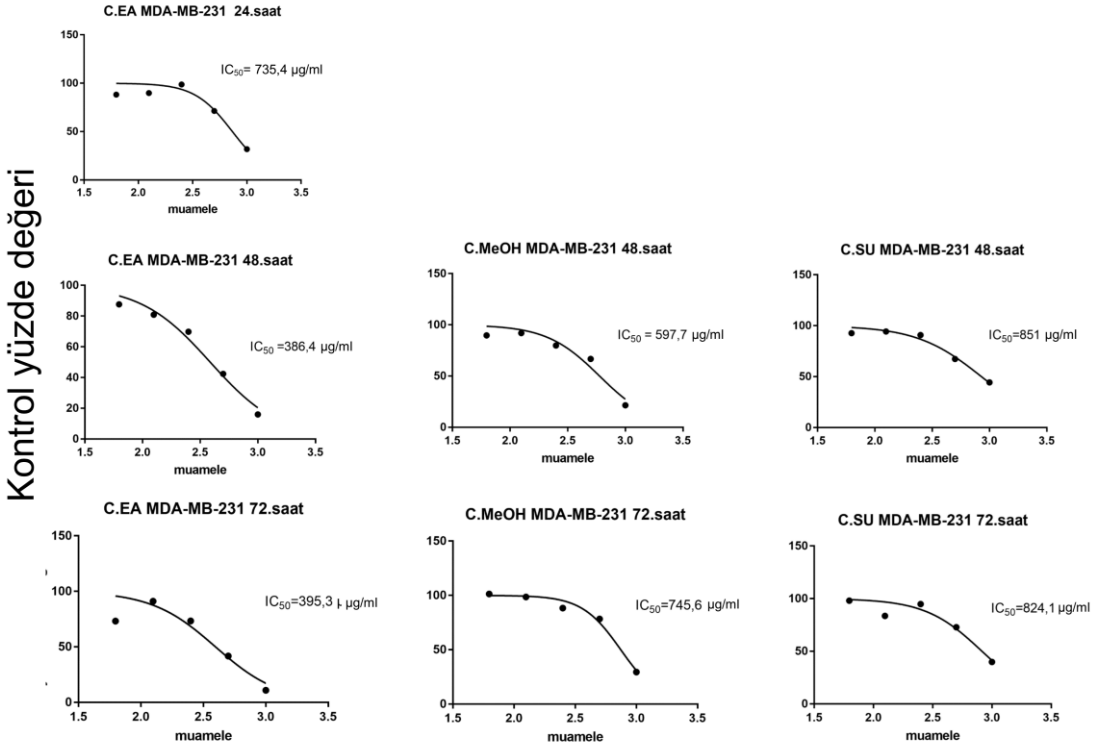
EK 4 ***Coronilla (C.)*** **Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları**

EK 5 Apoptotik, Otofajik Ve Telomeraz Aktivite Genlerinin MDA-MB- 231 ve MCF-7 Hücrelerindeki Erime Eğri Grafikleri

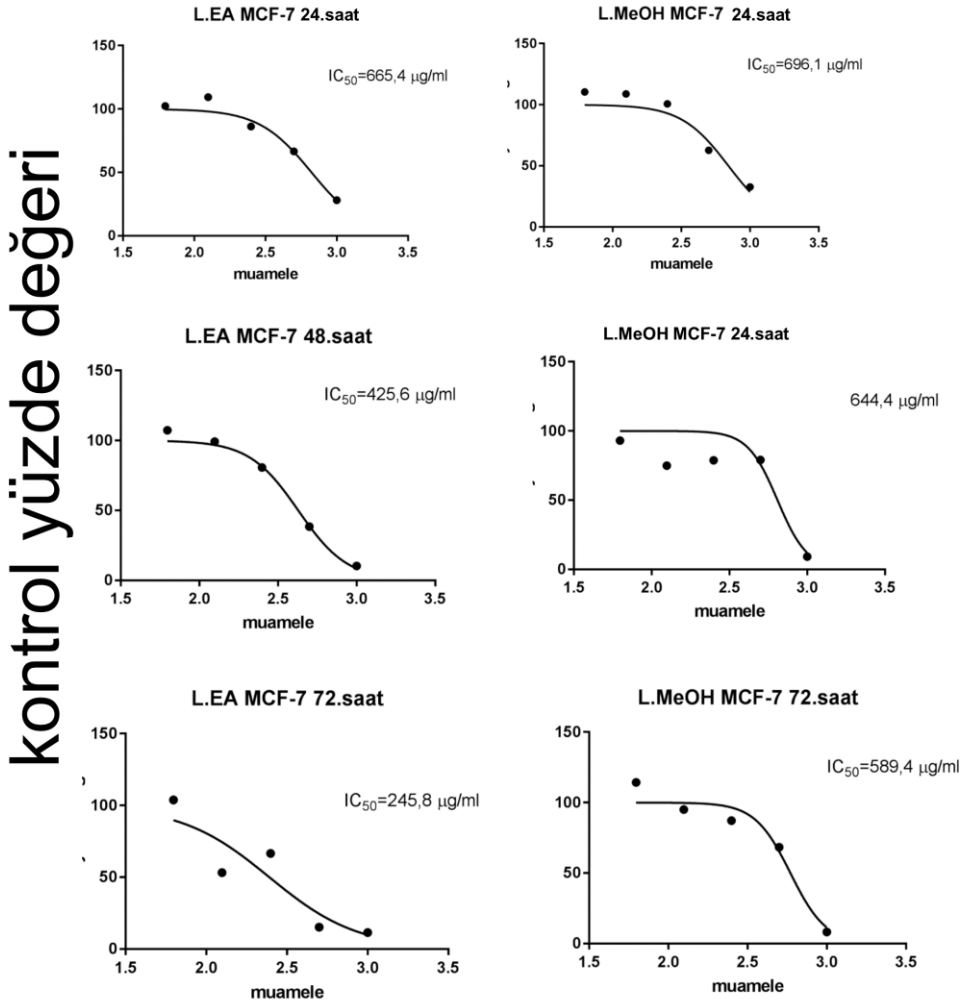
EK 1 *Lotus* (L.) Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları



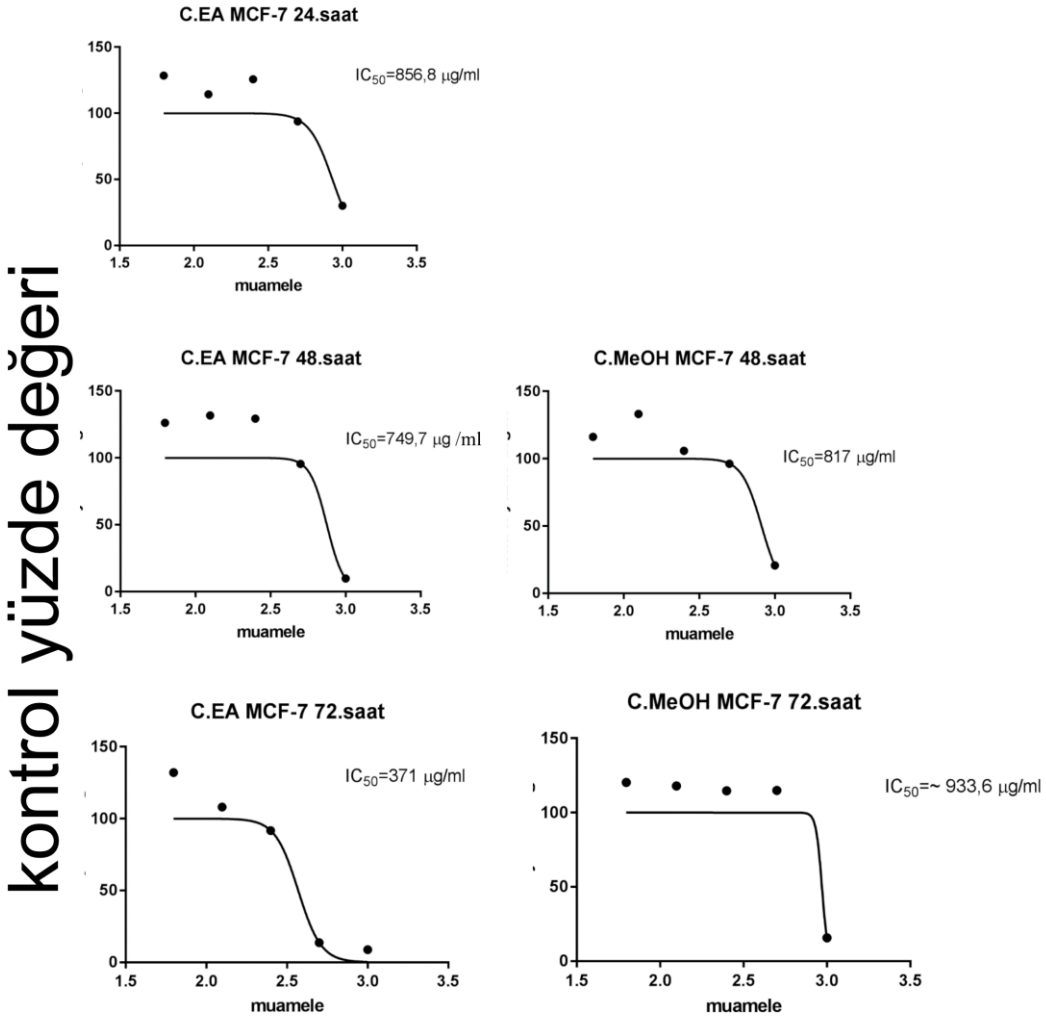
EK 2 *Coronilla* (C.) Ekstraktları MDA-MB-231 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları



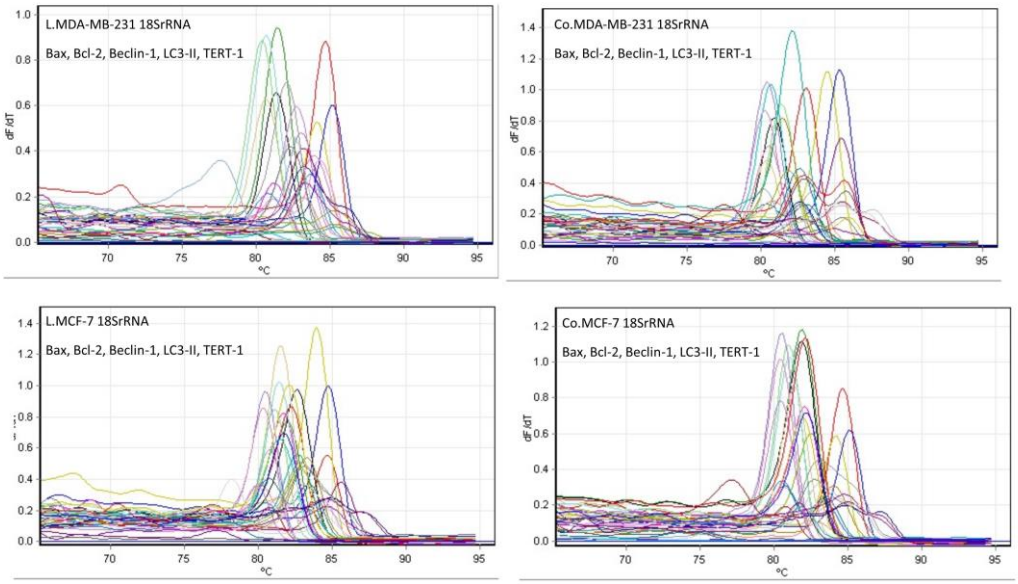
EK 3 *Lotus* (*L.*) Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları



EK 4 *Coronilla* (C.) Ekstraktları MCF-7 Hücreleri Üzerindeki IC_{50} İnhibitör Konsantrasyonları



EK 5 Apoptotik, Otofajik Ve Telomeraz Aktivite Genlerinin MDA-MB- 231 ve MCF-7 Hücrelerindeki Erime Eğri Grafikleri



ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Şerife YERLİKAYA
Doğum Yeri ve Yılı : Konya, 1990
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : serifeyerlikaya@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Kastamonu YDA Kuzeykent Lisesi (2004-2008)
Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi / Biyoloji (% 100 İngilizce) (2008-2013)
Yüksek Lisans : Dumlupınar Üniversitesi / Biyokimya (2014-2016)

Yayınları

1. **Yerlikaya, S.,** Baloglu, M.C., Diuzheva, A., Jekő, J., Cziáky, Z., Zengin, G. Investigation of chemical profile, biological properties of *Lotus corniculatus L.* extracts and Their apoptotic-autophagic effects on breast cancer cells, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2019).

2. Mahomoodally, F.M., **Yerlikaya, S.,** Llorent-Martínez, E.J., Uğurlu, A., Baloglu, M.C., Altunoglu, Y.C., Mollica, A., Kurty, K.D., Aumeeruddy M.Z., Puchooa, D., Zengin, G., Pharmacological and polyphenolic profiles of *Phyllanthus phillyreifolius* var. *Commersonii* Müll. Arg: An unexplored endemic species from Mauritius, *Food Research International* (2019).

3. Locatelli, M., **Yerlikaya, S.,** Baloglu, M.C., Zengin, G., Altunoglu, Y.C.,Cacciagrano, F., Campestre, C., Mahomoodally, F.M., Mollica, A. Investigations into the therapeutic potential of *Asphodeline liburnica* roots: in vitro and in silico biochemical and toxicological perspectives, *Food and Chemical Toxicology* (2018).

4. *Şener, N.,* Mohammed H.,J.,A., **Yerlikaya S.,** Altunoglu, Y.C., Gür, M., Baloglu, M.C., Şener, İ. Anticancer, antimicrobial, and DNA protection analysis of novel 2,4-dihydroxyquinoline dyes, *Dyes and Pigments* (2018).

5. **Yerlikaya, S.,** Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M.C., Altunoglu, Y.C., Aktumsek, A., A Multidirectional Perspective for Novel Functional Products: *In vitro* Pharmacological Activities and *In silico* Studies on *Ononis Natrix subsp.hispanica*, *Frontiers in Pharmacology* (2017).

6.Yerlikaya, A., Erdoğan, E., Okur, E., **Yerlikaya, S.**, Savran, B., A new combination treatment involving GRP78 inhibitor BAPTA-AM and proteasome inhibitor bortezomib for breast cancer cells, *Oncology Letters.* (2016).

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. **Yerlikaya, Ş.**, Okur, E., Yerlikaya, A. Apoptotic mechanism of a new combination involving bortezomib and GRP78 inhibitor BAPTA on 4T1 cancer cells. 3rd Anticancer Agent Development Congress, Dokuz Eylül University, 18-19 Mayıs, 2015, İzmir.

2. Okur, E., **Yerlikaya, Ş.**, Yerlikaya, A. Combined effects of bortezomib and GRP78 inhibitor BAPTA on cell cycle and apoptosis of 4T1 metastatic breast cancer cells. The 5th International Congress of Molecular Medicine, 20-22 Mayıs, 2015, Izmir.

3. **Yerlikaya, S.**, Can, T.H., Bulut A., Altunoglu, Y.C., Baloglu, M.C. Determination and Bioinformatical Analysis of *sHsp* Genes in Melon. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 15-17 May, 2017, Cappadocia, Turkey.

4. **Yerlikaya, S.,** Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M.C., Altunoglu, Y.C., Aktumsek, A., Phytochemical, *in vitro* and *in silico* studies on *Ononis natrix subsp*. *hispanica*: Multidirectional perspectives for novel functional products. International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf, 18-21 October, 2017, Bansko, Bulgaria.

5. Şener, N., **Yerlikaya S.,** Altunoglu, Y.C., Gür, M., Baloglu, M.C., Şener, İ., DNA protection Activity of Different Quinoline Derivatives, International Symposium on Eology, 19-23 June, 2018, Kastamonu, Turkey.

6. Şener, N., **Yerlikaya S.,** Altunoglu, Y.C., Gür, M., Baloglu, M.C., Şener, İ., Determination of Cytotoxic Effect of Novel 2,4- Dihydroxyquinoline Dyes on Cancer Cell Lines, International Symposium on Eology, 19-23 June, 2018, Kastamonu, Turkey.

7. Ulu, F., **Yerlikaya S.,** Altunoglu, Y.C., Baloglu, M.C., Molecular Characterization of Hsp40 Gene in *Ziziphus jujuba,* International Symposium on Eology, 19-23 June, 2018, Kastamonu, Turkey.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. Altunoglu, Y.C., Ünel, M., **Yerlikaya S**.,Baloglu, M.C.,
Salatalık *Hsp70* Genlerinin Tanımlanması ve Analizi", 19. Uluslararası Katılımlı Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, s.113, 1-3 Aralık, 2017, Eskişehir Türkiye

2. **Yerlikaya S**.,Uğurlu A., Zengin G., Altunoglu, Y.C., Baloglu, M.C., Taçlı Fiğ Bitkisinin Metanol Özütünün Antibakteriyal ve DNA Koruma Aktivitesinin Saptanması, 7. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi-Molbiotech, 2018,Kapadokya, Türkiye (özet bildiri).

Yazılan Uluslararası Kitaplar veya Kitaplarda Bölümler

1. Altunoğlu Y.C, Ceylan K., Ceylan Y., **Yerlikaya S.,** Baloglu MC (2018). Biyoinformatik Temelleri ve Uygulamaları. Editör: Baloglu MC. Bölüm adı: Biyolojik Veri Tabanları. Kastamonu Üniversitesi Basımevi, Basım sayısı: 1, Sayfa Sayısı 322, ISBN:978-605-4697-19-9, Türkçe (Ders Kitabı)