

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *NERİUM*
OLEANDER BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Tuğçe Deniz KARACA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ

Ortak danışman : Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Haziran 2008

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE *NERİUM*
OLEANDER BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN
ANTİKANSEROJEN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

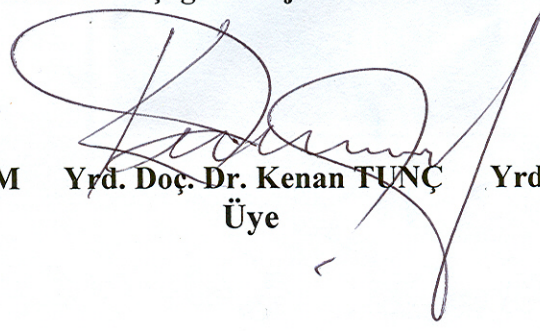
YÜKSEK LİSANS TEZİ

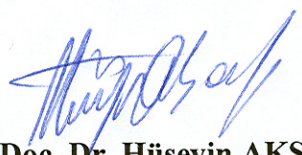
Biyolog Tuğçe Deniz KARACA

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 11/06/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Kudret YILDIRIM
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Kenan FUNÇ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY
Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde ve tezimin oluşmasında gösterdiği ilgi ve katkılarından dolayı değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ'a, Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültür Laboratuvarında deneysel çalışmalarında beni yönlendiren ve her konuda bilgisini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e, deneysel çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, tezimin her aşamasında ve her konuda her zaman yanımda olan ve büyük desteklerini gördüğüm başta ablam Doç. Dr. Alev DOĞAN ve annem Sabiha KARACA olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xviii
ÖZET.....	xix
SUMMARY.....	xx
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Biyolojisi.....	4
2.2. Hücre Siklusu.....	6
2.2.1. Hücre siklusu kontrol noktaları.....	6
2.3. Tümör Süpresör Gen, p53.....	6
2.4. Apoptoz.....	7
2.5. Meme Kanseri.....	7
2.5.1. Meme kanseri gelişiminde en belirgin risk faktörleri.....	8
2.5.2. Meme kanserinin belirtileri.....	9
2.6. Vepesid (VP-16, Etoposide).....	9
2.7. <i>Nerium oleander</i>	12
2.7.1. <i>Nerium oleander</i> 'in etki ve kullanılışı	14
2.7.2. <i>Nerium oleander</i> 'in toksikolojik etkisi.....	14

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	18
3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	19
3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	19
3.1.3.1. PBS çözeltisinin hazırlanması.....	19
3.1.3.2. Tripsin solüsyonunun hazırlanması.....	20
3.1.3.3. MTT Solüsyonunun Hazırlanması.....	20
3.1.3.4. DMEM F12 (Dulbecco's minimum essential medium) medyumun hazırlanması.....	20
3.1.3.5. Sentetik ve bitkisel bileşiklerin solüsyonlarının hazırlanması.....	21
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Hücre kültürü.....	21
3.2.1.1. Sıvı azot tankından alınan hücrelerin kültürünün yapılması ve tripsinizasyonu.....	21
3.2.1.2. Hücre sayımı.....	22
3.2.2. MCF-7 hücrelerinin <i>in vitro</i> kültürünün hazırlanması.....	23
3.2.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre sayısı ve plaklar.....	23
3.2.4. Vepesidin antikanserojen etkisinin MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmesi.....	23
3.2.5. <i>Nerium oleander</i> 'in antikanserojen etkisinin MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmesi.....	24
3.2.6. Hücre kültürü etken dozunun hesaplanması.....	25

BÖLÜM 4.

DENEYSEL BULGULAR.....	26
4.1. MCF-7 Hücrelerinin Mikroplaklardaki Adaptasyonu.....	26
4.2. Vepesidin Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme.....	29

4.3. Vepesidin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini ve Morfolojik İnceleme.....	42
4.4. Vepesidin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin EC ₅₀ 'ye Göre Hesaplanması.....	53
4.5. <i>Nerium oleander</i> Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme.....	53
4.5.1. <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi.....	54
4.5.2. <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi.....	57
4.5.3. <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi.....	60
4.5.4. <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi.....	64
4.6. <i>Nerium oleander</i> Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini ve Morfolojik İnceleme.....	67
4.7. <i>Nerium oleander</i> Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Antikanserojen Etkisi.....	80
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	82
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μ l	: Mikrolitre
μ g	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
gr	: Gram
$^{\circ}$ C	: Derece santigrat
A	:Absorbans
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EC ₅₀	: Etkili konsantrasyonun %50'si
FBS	: Fetal sığır serumu
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum bifosfat
MTT	: Thiazoly blue tetrazolium bromide
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücresi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hücre siklusunun fazları.....	5
Şekil 2.2.	Vepesidin kimyasal formülü.....	10
Şekil 2.3.	<i>Nerium oleander</i> 'in doğadaki görüntüsü.....	13
Şekil 2.4.	Olenadrinin kimyasal formülü.....	14
Şekil 4.1.	MCF-7 hücrelerinin mikrolakta ilk ekildikleri andaki mikroskopik görüntüsü (20x).....	26
Şekil4.2.	MCF-7 hücrelerinin mikrolakta 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	27
Şekil 4.3.	MCF-7 hücrelerinin mikrolakta 48 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	28
Şekil 4.4.	MCF-7 hücrelerinin mikrolakta 72 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	28
Şekil 4.5.	Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	30
Şekil 4.6.	Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	30
Şekil 4.7.	Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	31
Şekil 4.8.	Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	31
Şekil 4.9.	Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	32
Şekil 4.10.	Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	32
Şekil 4.11.	Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	33

Şekil 4.12.	Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	33
Şekil 4.13.	Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	34
Şekil 4.14.	Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	34
Şekil 4.15.	Son konsantrasyon 6 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	35
Şekil 4.16.	Son konsantrasyon 6 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	35
Şekil 4.17.	Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	36
Şekil 4.18.	Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	36
Şekil 4.19.	Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	37
Şekil 4.20.	Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	37
Şekil 4.21.	Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	38
Şekil 4.22.	Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	38
Şekil 4.23.	Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	39
Şekil 4.24.	Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	39
Şekil 4.25.	Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	40
Şekil 4.26.	Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	40
Şekil 4.27.	Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	41

Şekil 4.28.	Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	41
Şekil 4.29.	Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	42
Şekil 4.30.	Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	43
Şekil 4.31.	Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	43
Şekil 4.32.	Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	44
Şekil 4.33.	Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	44
Şekil 4.34.	Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	45
Şekil 4.35.	Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	45
Şekil 4.36.	Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	46
Şekil 4.37.	Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	46
Şekil 4.38.	Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	47

Şekil 4.39.	Son konsantrasyon 6,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	47
Şekil 4.40.	Son konsantrasyon 6,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	48
Şekil 4.41.	Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	48
Şekil 4.42.	Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	49
Şekil 4.43.	Son konsantrasyon 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml ve 300 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	49
Şekil 4.44.	Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin (formazan kristalleri oluşmamıştır) mikroskopik görüntüsü (20x).....	50
Şekil 4.45.	Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin (formazan kristalleri oluşmamıştır) mikroskopik görüntüsü (20x).....	50
Şekil 4.46.	Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin (formazan kristalleri oluşmamıştır) mikroskopik görüntüsü (20x).....	51
Şekil 4.47.	Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin (formazan kristalleri oluşmamıştır) mikroskopik görüntüsü (20x).....	51
Şekil 4.48.	Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin (formazan kristalleri oluşmamıştır) mikroskopik görüntüsü (20x).....	52

Şekil 4.49.	MCF-7 hücreleri üzerine DMSO ilave edildikten 15 dakika sonra çözünen formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	52
Şekil 4.50	Farklı konsantrasyonlardaki vepesidin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi.....	53
Şekil 4.51.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	55
Şekil 4.52	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	55
Şekil 4.53.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	56
Şekil 4.54.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	56
Şekil 4.55.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	57
Şekil 4.56.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	57
Şekil 4.57.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	58
Şekil 4.58.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	58
Şekil 4.59.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	59

Şekil 4.60.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	59
Şekil 4.61.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	60
Şekil 4.62.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	60
Şekil 4.63.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	61
Şekil 4.64.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	61
Şekil 4.65.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	62
Şekil 4.66.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	62
Şekil 4.67.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	63
Şekil 4.68.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	63
Şekil 4.69.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	64
Şekil 4.70.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)	65

Şekil 4.71.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	65
Şekil 4.72.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	66
Şekil 4.73.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	66
Şekil 4.74.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x).....	67
Şekil 4.75.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	68
Şekil 4.76.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	68
Şekil 4.77.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	69
Şekil 4.78.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	69
Şekil 4.79.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	70

Şekil 4.80.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin suluekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	70
Şekil 4.81.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	71
Şekil 4.82.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	71
Şekil 4.83.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	72
Şekil 4.84.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	72
Şekil 4.85.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	73
Şekil 4.86.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	73
Şekil 4.87.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	74

Şekil 4.88.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	74
Şekil 4.89.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	75
Şekil 4.90.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	75
Şekil 4.91 .	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	76
Şekil 4.92.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	76
Şekil 4.93.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	77
Şekil 4.94.	Son konsantrasyon 12,5 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	77
Şekil 4.95.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	78

Şekil 4.96.	Son konsantrasyon 25 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	78
Şekil 4.97	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	79
Şekil 4.98.	Son konsantrasyon 50 µg/ml <i>Nerium oleander</i> yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x).....	79
Şekil 4.99.	Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi	80
Şekil 4.100.	Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki <i>Nerium oleander</i> çiçeğinin etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi.....	80
Şekil 4.101.	Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki <i>Nerium oleander</i> yaprağının sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi.	81
Şekil 4.102.	Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki <i>Nerium oleander</i> yaprağının etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi.....	81

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler.....	19
--	----

ÖZET

Anahtar Sözcükler: Vepesid, *Nerium oleander*, MCF-7, MTT

Kanser günümüzde henüz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Meme kanseri kadınların yaşamı üzerinde önemli risk oluşturan kanser türlerinden biridir. Hastalığın tedavisinde amaç, bütün kanser hücrelerinin yok edilmesidir ve bu amaçla uygulanan tedavi yöntemleri ise cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Kemoterapi yöntemi ile kanserli hastaların % 80'i iyileştirilebilmekte, ancak % 20'lik bölümdeki hastaların kanser hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmekte ya da ölümcül toksisite geliştirmektedirler. Bu nedenle günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle son yıllarda meme kanserine karşı yeni antikanserojen ilaçların, özellikle bitkisel kökenli ilaçların araştırılmasına daha fazla önem verilmektedir.

Bu çalışmada ilk kez olarak, *in vitro* şartlarda meme kanseri hücre kültüründe *Nerium oleander* bitkisinin yaprak ve çiçeğinden elde edilen sulu ve etanollü ekstraktların antikanserojen etkisinin araştırılması ve sentetik antikanserojen (vepesid) ilacın etkisi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Deneyler; MCF-7 hücre kültürünün yapılması, hücre sayımı, hücrelerin morfolojik olarak değerlendirilmesi ve MTT yöntemi olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerde *Nerium oleander* bitkisinin çiçek ve yaprağından elde edilen etanollü ve sulu ekstraktlarının MCF-7 hücre kültürü üzerinde belirgin bir sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür. Yaprak ekstresinin sitotoksik etkisinin çiçek ekstresinin sitotoksik etkisinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *Nerium oleander* ekstraktlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanserojenik etkisi antikanserojen ilaç olan vepesidin hücreler üzerinde gösterdiği etkiyle benzer olup, sadece uygulanan konsantrasyon miktarına göre fark gösterdiği tespit edilmiştir.

THE INVESTIGATION OF THE ANTICANCEROGENIC EFFECTS OF EXTRACTS FROM *NERIUM OLEANDER* ON HUMAN BREAST CANCER CELL CULTURE

SUMMARY

Key words: Vepesid, *Nerium oleander*, MCF-7, MTT

Cancer is accepted as an important health problem that has not been solved nowadays. Breast cancer is a type of cancer which makes risk in women's life. The aim of the disease's treatment is to clear off all the cancer cells and the treatment's methods are surgery, radiotherapy and chemotherapy. 80 per cent of cancer patients can get cured by chemotherapy, but 20 per cent of the patients do not have resistance to the chemotherapeutic drugs or have fetal toxicity. Therefore, today the basic methods and the drugs that are applied on cancer treatments are clearly defective. For this reason, in the last few years it is more important to research new anticancerogen drugs specially drugs from plants against to breast cancer.

For the first time, in this study it was aimed to investigate the anticancerogenic effects of the water and the ethanol extracts from *Nerium oleander*'s leaves and flowers and compare with the effects of synthetic drugs (vepesid) on human breast cancer cells' culture in *in vitro* conditions.

Experiments were realized by various methods like MCF-7 cells' culture, cells' counting, considering the cells by morphological and MTT method. The results were considered by morphologically. The ethanol and water extracts from *Nerium oleander* have cleared cytotoxic effect on MCF-7 cell culture.

The anticancerogenic effects of *Nerium oleander*'s extracts on breast cancer's cells are the same as the effect of anticancerogen drug vepesid on cells, there was only a difference determined according to applied doses of concentrations.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Günümüzde kanser henüz çözümlenememiş önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Meme, akciğer, kolorektal, rahim ve deri kanserleri kadınlarda en sık görülen kanser türlerindendir. Özellikle meme kanseri kadınların yaşamı üzerinde önemli risk oluşturmaktadır ve meme kanseri, kadınlarda görülen diğer kanser türlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır. Toplumda her 10 kadından birinde meme kanseri görülmektedir. 40–44 yaş arasındaki kadınlarda, meme kanserine bağlı ölümler ilk sırada yer almaktadır [1, 2].

Son yıllarda meme kanseri vakasında artışlar gözlenmektedir. Örneğin, 1940 ve 1987 yılları arasında hastalığın görülme sıklığında yıllık % 4 oranında artış saptanmıştır. Meme kanseri, günümüzde görülme sıklığının bu kadar yüksek olmasının yanı sıra tedavisinde karşılaşılan problemlerle de büyük ölçüde önem kazanmaktadır [3, 4].

Meme kanserinin tedavisinde; tamoxifen, taxol, vepesid gibi sentetik antikanser ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçların etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemekte ancak güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları belirtilmektedir [5-7].

Kemoterapide uygulanan antikanser etkili bir ilaç, kanser hücresi üzerine toksik etki gösterirken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerine de toksik etki göstermekte ve etkilenen sağlıklı hücrelerin bulunduğu organların tahrip olmasına neden olmaktadır. Antikanser ilaçların istenmeyen bu yan etkileri ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan çalışmalarda kanser kemoterapisi uygulanan hastalarda tedavide kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç olduğu belirlenmiştir. Kemoterapi kanserli hastaların % 80'ini iyileştirebilmekte, ancak % 20'lik bölümdeki hastaların kanser hücreleri kemoterapötik ilaçlara karşı direnç geliştirmekte ya da ölümcül toksisite oluşturmaktadırlar [8]. Bundan dolayı

günümüzde kanser tedavisinde uygulanan temel yöntemler ve kullanılan ilaçların yetersiz olduğu düşünülmektedir.

Tedavide karşılaşılan bu problemler, yeni ilaçlar bulma ve meme kanserini bilinmeyen yönleriyle araştırma çabalarını hızlandırmaktadır. Bu araştırmaların asıl amacı en az toksisite ile daha etkili bir tedavi sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda son zamanlarda yapılan çalışmalarda meme kanserine karşı sentetik ve bitkisel ilaçların antikanser etkileri araştırılmaktadır. Özellikle bitkilerden elde edilen ekstraktlar ile yapılan çalışmalar daha ümit verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Avrupa ülkeleri başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde bu konu ile ilgili çalışmalar yoğun şekilde yürütülmektedir [1, 9–12].

Tıbbi bitkilerin ekstraktlarının antikanser aktivitelerinin araştırılması konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalarda, *Lampetra tridentata* (gür çalılık) (Creosote Bush) ve *Juniperus communis* L. (Juniper Berry) (ardıç) gibi bitkiler meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerinde antikanser etkinliği araştırılan bitkiler arasında bulunmaktadır. Araştırma sonuçları, *Lampetra tridentata* ve *Juniperus communis* L. bitki ekstraktlarının meme kanser hücrelerinin çoğalmalarını önemli ölçüde yavaşlattığını ortaya koymuştur. Meme kanseri üzerinde etkinliği araştırılan ilaçlar olmasına rağmen henüz tedavide % 100 etkili sentetik veya bitkisel ilaç bulunmamaktadır [13-15].

Bu çalışmada ilk kez olarak, *in vitro* şartlarda meme kanseri hücre kültüründe *Nerium oleander* bitkisinin yaprak ve çiçeğinden elde edilen sulu ve etanollü ekstraktların, antikanserojen etkisinin araştırılması ve sentetik antikanserojen ilacın (vepesid) etkisi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen ekstraktlar ile vepesidin, insan meme kanseri hücre kültürü üzerindeki antikanserojen etkileri morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Biyolojisi

Kanser, Latinceye yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiştir. Yunanlı hekim Hipokrat, hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu tanımlamayı yapmıştır. Kanseri vücudtaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelmektedir. Normalde hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde olmaktadır. Ancak hücrelerin anormal şekil ve hızla büyümeye ve çoğalmaya başlamaları, tümör adı verilen kitlenin oluşumuna yol açarlar. Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir. Bu anormal hücreler hangi organdan kökenleniyorsa hastalık buna göre isimlendirilir (akciğer, meme, prostat kanseri gibi) [16-18]. Kanserin altı önemli özelliği vardır:

- a) Büyüme sinyallerinde otonomi: Normal hücrelerin bölünebilmesi için dışardan büyüme faktörü sinyalini alması gerekir, kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildir, mutasyonlar düzenli olmayan büyümeye sebep olurlar.
- b) Büyüme sinyalleri engelleyicileri: Normal hücreler engelleyici sinyallere homeostasi sağlamak için cevap verirler (vücudtaki hücrelerin çoğu aktif olarak bölünmez), kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermez, mutasyonlar engelleyici yolları etkiler.

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

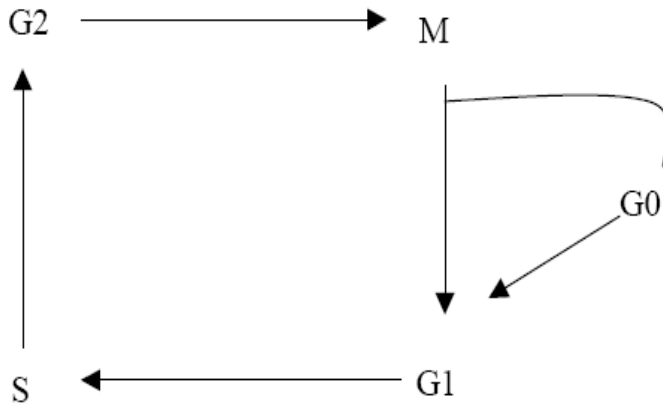
d) Sınırsız replikasyon potansiyeli: Normal hücreler senesens olduktan sonra hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma düzeneğine sahiptirler. Bu hücre sel sayaç, her DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kromozom uçlarının kısalmasını belirler (telomerler), kanser hücrelerinde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

e) Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu): Normal hücrelerin oksijen ve besleyici oksijen ve besleyici sağlayabilmesi için kan damarlarına gerek vardır, fakat olgun bir insanda dolaşım mimarisi sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü tümör sağkalımı ve yayılması için yeni kan damarların büyümesi gerekir.

f) İnvazyon ve metastaz: Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler, mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini değiştirir ve hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler adezyon moleküllerini değiştirirler [16-19].

2.2. Hücre Siklusu

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktive edilir ve ardından inaktifleştirilir. Hücre siklusunun fazları şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Hücre siklusunun fazları

Şekil 2.1’deki G0; istirahat fazı, G1; ara faz, interfaz, S; DNA sentezi fazı, M; mitozis fazı olarak adlandırılır.

- a) G0 (istirahat fazı): Hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.
- b) G1 (ara faz, interfaz): Spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
- c) S (DNA sentezi fazı): Hücre içindeki DNA’nın miktarı ikiye katlanır.
- d) G2 fazı: DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik “spindle”ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir.
- e) M (mitozis): Protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler.

Hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinler siklinlerdir. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktifleştirirler ve etkilerini düzenlerler.

Hücre siklusunda çeşitli fazlarda, çeşitli siklinler sentezlenir, ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar [18, 19].

2.2.1. Hücre siklusu kontrol noktaları

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre G1 fazını terketmeden önce DNA'nın doğru (hasarsız) bir durumda olması gerekmektedir. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptozise giderek ölürler. İkinci kontrol noktası hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanamamışsa, veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri, ve mitozisin tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanamamışsa hücre bu kontrol noktasında her şey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer. Sonuç olarak hücre, siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur [16-19].

2.3. Tümör Süpresör Gen; p53

Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozuna neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen p53 geninin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni *bax* proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptoza giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur [20].

2.4. Apoptoz

Gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüne apoptoz denir [21]. Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Apoptoz olarak adlandırılan bu önceden programlanmış hücre ölümüyle hücre çoğalması (mitozis) arasında kontrollü bir denge vardır. Bu dengenin bozulması çok sayıdaki önemli hastalığın ortaya çıkma nedenidir. Apoptozda hücreler su kaybederek küçülürler, büzülürler, şekilleri bozulur ve komşu hücrelerle bağlantılarını kaybederler. Sitoplazma yoğunlaşır ve organeller birbirine yaklaşır. Organeller genel olarak sağlamdır ve hücre membranı apoptozun geç evrelerine dek bütünlüğünü korur. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin (hücre bölünmesi sırasında yoğunlaşarak kromozomları oluşturan nükleik asit-protein kompleksi), çekirdek zarına yakın bölgede yoğunlaşır ve hilal şeklinde çekirdek zarının iç yüzeyine yerleşir. Çekirdek de büzülür, yoğunlaşır ve bazen zarla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Apoptoz süreci ilerledikçe, sitoplazmik çıkıntılar ve tomurcuklanmalar oluşur. Hücre daha sonra, sıkıca paketlenmiş organelleri, sitoplazma ve çekirdek parçalarını içeren “apoptotik cisimcik”lere parçalanır. Bu parçalar komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosit edilecek (sindirilerek) dokudan uzaklaştırılır. Böylece herhangi bir doku reaksiyonunun ortaya çıkması engellenir [20-22].

2.5. Meme Kanseri

İnsan hayatını tehdit eden pek çok kanser türünden biri de meme kanseridir. Gelişmiş ülkelerde en sık gözlenen kanser tipidir ve meme kanseri tüm ülkelerde bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda meme kanseri vakasında artış gözlenmektedir. Örneğin ABD’de son yıllarda yaklaşık 240000 yeni meme kanseri tanısı konulacağı ve yaklaşık 40000 kadının da meme kanserinden öleceği olasılığı üzerinde fikirler öne sürülmektedir [23]. Yapılan araştırmalara göre, ABD’de sekiz kadından birisi meme kanserine yakalanmaktadır. Bu oran Avrupa ülkelerinde on kadında birdir.

Ancak, hastalığın tedavisinde uygulanan ana tedavi yöntemleri ve alternatif olarak yeni tamamlayıcı yöntemler, meme kanserinin iyileşme oranının artırılmasında önemli rol oynamaktadır [24–27].

2.5.1. Meme kanseri gelişiminde en belirgin risk faktörleri

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi birçok deneysel ve toplumsal çalışmalar yapılmasına rağmen meme kanserinin nedeni tam olarak henüz anlaşılamamıştır. Fakat yapılan bu çalışmalar meme kanseri oluşum ve gelişim dönemlerinde etkili olabilen pek çok faktörün tanınmasını sağlamıştır [2-4].

Tanımlanan faktörler aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

- a) Yaş: Yaş ilerledikçe risk artmaktadır
- b) Doğum yeri: Meme kanserinin bölgesel olarak yüksek görüldüğü yerlerde çocuk doğurmak riski arttırmaktadır (Örneğin: Kuzey Amerika)
- c) Genetik yatkınlık ve genetik belirleyiciler: Birinci dereceden yakınlarda meme kanseri bulunanlarda bu hastalığın görülme şansı normal popülasyona göre fazladır. Hastalık genetik faktöre bağlı olunca aile içinde iki taraflı hastalık artmaktadır. Tümör daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır.
- d) Sosyo-Ekonomik Durum: Eğitim düzeyi ve gelir miktarı arttıkça risk de artmaktadır.
- e) Şişmanlık ve beslenme biçimi: Birçok ülkede meme kanseri sıklığının insan başına tüketilen yağ, şeker ve protein miktarlarına uygunluk gösterdiği saptanmıştır.
- f) Doğurganlık dönemi ve bağıntıları: Evlilik, doğum yapma sayısı ve ilk doğum yaşı, adet görme durumu ve diğer faktörler (Örneğin: Sık X ışını kullanılarak radyolojik incelemeler (Ultrasonografi ve magnetik rezonans hariç)).

2.5.2. Meme kanserinin belirtileri

Meme kanseri başlangıçta hiç belirti vermeyebilir. Ancak, aşağıdaki bulgular olası bir meme patolojisinin önemli işaretleri olabilir:

- a. Memede kitle
- b. Memede ağrı
- c. Meme başında çekilme
- d. Meme başında akıntı
- e. Koltuk altında kitle
- f. Meme derisinde yara
- g. Meme derisinde kaşıntı
- h. Deri ödemi
- i. Göğüs duvarında kitle ve yol ödemi

Son yıllarda meme kanseri tedavisinde oldukça önemli gelişmeler olmuştur. Bir çok tedavi olanakları ortaya çıkmıştır. Hastalığın tedavisinde cerrahi ve sonraki dönemde sistemik ilaç tedavisi ve radyoterapi bir çok hastaya uygulanmaktadır. Tamoxifen, taxol ve vepesid gibi antikanser ilaçlar bu amaçla kullanılan ilaçlardan bazılarıdır. Bu ilaçların etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemekte ancak güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları belirtilmektedir [5–7, 28–37].

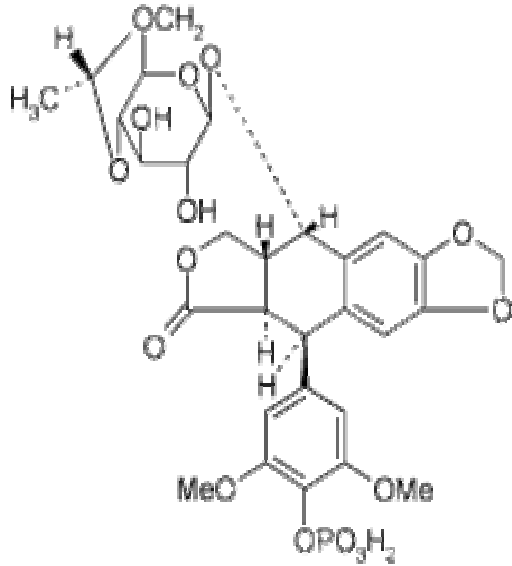
2.6. Vepesid (VP-16, Etoposide)

Vepesid bitkisel alkaloidler grubundandır, *Podophylum peltatum* bitkisinden elde edilir ve podophylotoksinin yarı sentetik bir türevidir.

Uygulaması damar yoluyla en az 30 dakika şeklindedir. İlaç çok hızlı verildiği takdirde şiddetli hipotansiyon (düşük kan basıncı) ortaya çıkabilmektedir. Vepesid aynı zamanda ağız yoluyla da verilmektedir. İlacın damar dışına kaçmasından kaçınılmalıdır. Başlıca yan etkisi kemik iliği baskılanmasıdır. Uygulamalardan sonra bulantı kusma ve iştah kaybı ortaya çıkabilir. Diğer yan etkiler; saç dökülmesi, baş

ağrısı, ateş ve düşük kan basıncıdır nadiren kalp krizi, kalp yetmezliği, sinir hasarı, yorgunluk, uyku, eller ve ayaklarda karıncalanma ortaya çıkabilir [38, 39].

Vepesidin kimyasal formülü Şekil 2.2’de görülmektedir.



Şekil 2.2. Vepesidin kimyasal formülü

Literatür incelendiğinde, vepesidin çeşitli kanser türleri üzerine antikanserojen etkisinin araştırıldığı son derece önemli çalışmalar vardır. Mork ve arkadaşlarının (2007), meme kanseri hücreleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, vepesid ile yapılan tedavinin etkili olduğunu belirlemişler ve EI24/PIG8 fibroblast ile meme kanser hücrelerinde vepesidin inhibe edici etkisi olduğunu belirtmişlerdir [5].

Klamt ve arkadaşları (2007), insan tümör hücre hatlarında retinol ve vepesidin birlikte etkisini araştırmışlardır. Araştırmalarının sonucunda retinol ile yapılan tedavinin ilaca karşı dirençte % 40 azalmaya ve vepesidin toksik etkisinin artmasına neden olduğunu bulmuşlardır [37].

Vetoshaskina ve arkadaşları (2007), vepesidin fare akciğerindeki toksik etkisini ve morfolojik fonksiyonlarını araştırmışlardır. 36 fareye vepesid belirli dozlarda enjekte edilmiş ve enjeksiyondan sonra farelerde oluşan değişiklikler rapor edilmiştir [6].

Borovskaya ve arkadaşlarının (2006), fareler ile 1, 3 ve 6 ay boyunca yapmış oldukları bir çalışmada, dişi fare gametlerinin erkek fare gametlerine oranla vepesidin toksik etkisine hassasiyet göstermesi nedeni ile dişi farelerin canlılığında önemli ölçüde azalma meydana geldiği belirlenmiştir [7].

Fiegl ve arkadaşları (2005), yaşlı ve yoğun kemoterapi almış, akut myeloid leukemia (AML) hastaları üzerinde oral vepesidin faz I/II çalışmasını yapmışlardır. Uygulamalardan sonra hastaların % 73'ünde kötüleşme görülmüştür [28].

Schroeder ve arkadaşları (2004), kanserli hastalara yüksek dozda vepesid vererek ilacın farmokinetiğini araştırmışlardır. Dexrazoxane (ICRF-187) ajanıyla birlikte uygulandığında vepesidin farmokinetiğinin etkisiz olduğunu bulmuşlardır [29].

Allahverdiyev ve arkadaşları (2002), HSV Tip II üzerine vepesidin antiviral etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda vepesidin herpes simplex tip 2 virüsünün viral replikasyonunu önlediğini bulmuşlardır [30].

Cory ve Cory'nin (2001), yapmış oldukları bir çalışmada insan meme kanseri hücrelerinin özellikleri karşılaştırılmış ve seçilmiş MCF-7 hücrelerinin vepeside karşı dirençleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda MCF-7 hücrelerinin vepeside dirençsiz oldukları tespit edilmiştir [31].

Osaki ve arkadaşlarının (1998), yapmış oldukları bir çalışmada, meme kanseri hastaları üzerinde vepesid ile beraber kombine bir tedavi uygulamışlar ve tedavi sonucunda hastaların % 18,7'sinin tedaviye olumlu cevap verdiği, % 21,9'unun kısmen cevap verdiği ve kemik ağrısı bulunan diğer hastaların da ağrılarında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu kombine tedavinin ileri meme kanseri hastalarında ikinci bir tedavi olarak uygulanabileceğini önermişlerdir [32].

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalar üzerinde Paprota ve arkadaşları (1996), cisplatin ve vepesidin birlikte kullanıldığı kombine bir tedavi uygulamışlardır. Araştırma sonucuna göre, cisplatin ve vepesidin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur [36].

Martin ve arkadaşları, (1993), metastatik meme kanserli 27 bayanda kronik oral vepesidin (50 mg/m²/gün x 21 gün) faz II çalışmasını yapmışlar ve hastaların ilaca karşı gösterdikleri tepkiyi araştırmışlardır. Hastaların % 74'ünde leukopenia, % 22'sinde thrombositopenia ve % 69,5'da anemi gibi yan etkiler görülmüştür [33].

Fields ve arkadaşlarının (1993), yapmış oldukları meme kanseri ile ilgili diğer bir çalışmada, 66 bayan hastada yoğun dozlarda vepesid de içeren bir tedavi uygulamışlardır. Hastalara ifofamid, karboplatin ve vepesid belirli dozlarda verilmiş ve bütün hastalarda ölçülebilen metastatik hastalık oranı % 50 olarak belirlenmiştir [34].

Cocconi ve arkadaşlarının (1986), yapmış oldukları klinik bir araştırmada, metastatik meme kanserli hastalarda, vepesid ile platinin kombine bir tedavisi uygulanmış ve bu kombine tedavinin kemoterapiye cevap vermeyen ileri seviyedeki metastatik meme kanserli hastalarda olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir [35].

Ayrıca, meme kanserinin son yıllarda görülme sıklığındaki artış, hastalığın tedavisinde yeni ilaçlar bulma ve meme kanserini bilinmeyen yönleriyle araştırma çabalarını hızlandırmaktadır. Bu nedenle ana tedavi yöntemlerine alternatif olabilecek tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden birisi de özellikle bitkilerden elde edilen ekstraktlar ile yapılan çalışmalardır. Bu bitkilerden biri; Apocynaceae familyasına ait olan ve Türkiye'de halk arasında zakkum adı ile bilinen, (ağı çiçeği, kan ağ, zıkkım ağ), *Nerium oleander*'dir.

2.7. *Nerium oleander*

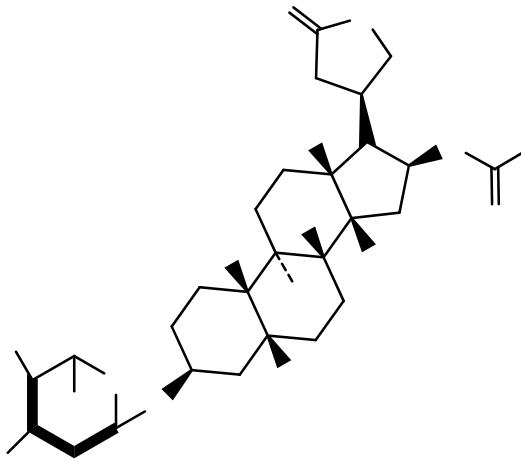
Zakkum bitkisi, Akdeniz bölgesi ülkeleri ile Türkiye'de sulak yerlerde yabani olarak yetiştiği gibi süs bitkisi olarak park ve bahçelerde de yetiştirilir (Şekil 2.3). Bu bitki 5-6 metre kadar yükselebilen ve kışın yapraklarını dökmeyen bir ağaççıktır. Yapraklar mızrak biçiminde, sivri uçlu, 6-30 cm uzunluk ve 1-3 cm genişlikte, derimsi, orta damar alt yüzde dışarı doğru çıkık, yan damarlar orta damara hemen hemen dikey ve birbirlerine paralel, her iki yüzde de tüsüzdür. Çiçekler dal uçlarında toplanmış, korolla 5 parçalı, pembe veya kırmızı nadiren beyaz renkli, kaliks 5

parçalı, 5-7 mm uzunluktadır. Meyva 10-18 cm uzunlukta, boyuna çizgili, olgunlaşma döneminde bir yandan açılır. Tohumlar 4 mm kadar uzunlukta ve tüylüdür. Kokusuz ve keskin lezzetlidir [40-44].



Şekil 2.3. *Nerium oleander*'in doğadaki görüntüsü

Zakkum bitkisi bazı glikozitler içermektedir. Başlıca etkili glikozid oleandrin olup hidroliz sonunda aglikon olarak oleandringen (16-asetildigitoksigenin) ve şeker olarak da oleandroz (cimarın'ın izomeri) verir. Oleandringen *Digitalis* (yüksük otu) türlerinde rastlanan digitoksigenine yakın bir yapıdadır. Aralarındaki tek fark oleandringen'in 16 numaralı karbon atomunda bir asetil grubu taşımasıdır [45, 46]. Oleandrinin kimyasal formülü şekil 2.4'de görülmektedir.



Şekil 2.4. Olenadrinin kimyasal formülü

2.7.1. *Nerium oleander*'in etki ve kullanılışı

Dahilen idrar arttırıcı ve kalp kuvvetlendirici etkisi vardır. Tıbbi miktarın üzerinde alındığı zaman kalp yetmezliği, kusma ve ishal ile kendini gösteren ağır zehirlenmeler yapar. Dahilen ancak hekim kontrolü altında kullanılabilir. Haricen zeytinyağındaki maserasyonu vücut parazitlerine karşı kullanılır (bilhassa uyuz parazitlerine).

2.7.2. *Nerium oleander*'in toksikolojik etkisi

Zakkum, zehirliliği antik dönemlerden beri bilinen bir bitkidir. Zehirlenmeler genellikle yaprakların tedavi amacıyla kullanılması sırasında tıbbi dozun aşılması sırasında meydana gelmektedir. Zehirlenme mide ve bağırsak bozuklukları, solunum güçlüğü ve nabız yavaşlaması gibi belirtilerle ortaya çıkar. Zehirlilik kurutma ve kaynatma ile giderilemez. Dal ve yaprakların suya konulması sonucu etkili maddeler suya da geçer ve bu suyun içilmesi zehirlenmeye de sebep olur [46].

Nerium oleander ekstraktı kanser tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. İlk olarak 8. yüzyılda arap hekimleri tarafından kanser tedavisinde kullanılmıştır [47].

Türk hekimlerinden de Opr. Dr. Ziya Önel, *Nerium oleander* yapraklarından hazırladığı bir sulu ekstraktı kullanarak bazı kanser türlerinde başarılı sonuçlar

aldığını belirtmiştir [42]. Bu bitkinin uluslararası patenti Amerika Birleşik Devletleri'nde anvirzel adı ile alınmıştır [48, 49].

Son yıllarda yapılan *in vitro* çalışmalarda *Nerium oleander*'in çeşitli kanser hücreleri üzerinde antikanserojenik etkisi olduğu belirlenmiştir. Huang ve arkadaşlarının (2007), yapmış oldukları çalışmada, *Nerium oleander* ile endofitik mantarların ilişkisini araştırmışlardır. Bu çalışma *Nerium oleander*'den izole edilen endofitik mantarların potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğu belirlenmiştir [50].

Barbosa ve arkadaşları (2007), oleandrinin keçilerde sebep olduğu patolojik etkisi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırma sonuçlarında, keçilerin de oleandrine diğer hayvan türleri ile benzer tepkiler gösterikleri bulunmuştur [51].

Srevinasan ve arkadaşlarının (2006), yapmış oldukları çalışmada, bazı tümör hücrelerinde oleandrinin etkisini araştırmışlardır. Araştırmalarının sonuçlarında oleandrinin tümör hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirlenmiştir [52].

Pietsch ve arkadaşları (2005), oleandrin zehirinin ölümcül olmayan dozunun belirlenmesi üzerine, 47 yaşındaki bir bayan üzerinde klinik bir araştırma yapmışlardır. Serum örneklerindeki oleandrin konsantrasyonunu yaklaşık 1,6 ng/ml olarak bulmuşlar ve bulguları daha önceki çalışmalarla karşılaştırmışlardır [53].

Afaq ve arkadaşları (2004), *Nerium oleander* yapraklarından elde edilen oleandrinin anti-inflammatuar ve tümör hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre oleandrinin antitümör etkisini bulmuşlardır [54].

Erdemoğlu ve arkadaşları (2003), *Nerium oleander*'in kuru ve taze yaprakları ile *Rhododendron ponticum* bitkisinin yapraklarının, farede karrajene karşı güçlü bir anti-inflammatuar etki gösterdiğini bulmuşlardır [55].

Sreenivasan ve arkadaşları (2003), yapmış oldukları çalışmalarının sonucunda oleandrinin primer hücrelerde etkili olmadığını bulmuşlardır [56].

Smith ve arkadaşları (2001), *Nerium oleander*'in bir ekstraktı olan anvirzel üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda, anvirzel ve oleandrinin; prostat kanser hücre serilerinde, antitümör aktivitelerinin, kanser tedavilerine katkı sağlayabileceğini belirlemişlerdir [57].

Newman ve arkadaşlarının (2001), anvirzel ile yaptıkları bir çalışmada, *Nerium oleander*in içerdiği oleandrin, oleandringen, ouabain gibi bazı kimyasal bileşiklerin hücre serileri üzerindeki etkileri araştırılmıştır [49].

Mekhail ve arkadaşları (2001), anvirzelin maksimum tolere edilebilen dozu (MTD), güvenilirliği ve farmakokinetiğinin belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Çalışma sonucunda anvirzelin 1,2 ml/m²/gün doza kadar güvenle uygulanabileceği belirlenmiştir [58].

Patak ve arkadaşları (2000) yapmış oldukları çalışmalarında, insan, fare ve köpek tümör hücrelerinde, farklı konsantrasyonlarda anvirzel (1 ng/ml-500 µg/ml) ve oleandrinin (0,01 ng/ml-50 µg/ml) tümör öldürücü etkisini araştırmışlardır. İnsan kanser hücrelerinde her iki ekstraktın da etkili olduğu, diğer yandan fare kanser hücrelerinde oleandrinin anvirzelden daha etkili olduğunu belirtmişlerdir [48].

Wang ve arkadaşları (2000) kanser tedavisinde zakkum ekstraktının LC/MS/MS analizleri üzerine bir çalışma yapmışlardır. Aynı zamanda anvirzelin kas içi enjeksiyonunu takiben insan plazmasında oleandringen, neritalosid ve odorosid'in belirlenmesi için analitik bir metot uygulamışlardır [59].

Conkey ve arkadaşları (2000), anvirzelin insan tümör hücrelerinde etkili olduğunu klinik çalışmaları sonucu belirlemişlerdir. Bu etkilerin *Nerium oleander*'in antitümör aktivitesinden kaynaklandığını söylemişler ve oleandrinin anvirzelden 50 kat daha fazla etkili olduğunu belirtmişlerdir [60].

Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, *Nerium oleander* ekstreleri ve antikanser ilaç olan vepesidin toksik ve antikanserojenik etkileri üzerine özellikle MCF-7 hücre kültüründe yapılan pek fazla bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle bu çalışmada, *Nerium oleander* yaprak ve çiçeğinin sulu ve etanollü ekstraktlarının ve sentetik antikanser ilaç olan vepesidin *in vitro* olarak MCF-7 hücre kültüründeki sitotoksik etkilerinin araştırması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, günümüzde en çok kullanılan MTT yöntemini kullanılmıştır [61].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

İnsan meme kanseri hücre kültüründe (MCF-7) *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen sulu ve etanollü ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi ve setetik ilaç olan vepesidin antikanserojen etkisiyle karşılaştırılması amacıyla planlanan bu çalışmada kullanılan MCF7 hücre kültürü Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarından ve *Nerium oleander* bitki materyali Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalından, vepesid (100 mg/5ml) eczaneden temin edilmiştir. Çalışmanın tamamı Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Fakültesi Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar

- ELISA
- Etüv
- pH metre
- Hassas Terazî
- Santrifüj
- Vorteks
- Bidistile Su Cihazı
- Manyetik Karıştırıcı
- Laminar Hava Akışlı Kabin
- İnkübatör (37 °C % 5 CO₂'li)
- Ters Mikroskop
- Derin Dondurucu (-45°C)
- Otoklav

3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Firma
DMEM	Sigma
Nutrient Mixture F-12	Sigma
L-Glutamin	Biological Industries
Penisilin-Streptomisin (PEST)	Biological Industries
Fetal Sığır Serum	Seromed
Tripsin EDTA	Biological Industries
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma
Sodyum Klorür (NaCl)	Atabay
Potasyum Klorür (KCl)	Carlo Erba
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Riedel de Haen
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Riedel de Haen
Tripan Mavisi	Sigma
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma

3.1.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve solüsyonlar

Deneysel çalışmalarda PBS çözeltisi, tripsin solüsyonu, MTT solüsyonu, DMEM F12 (Dulbecco’s Minimum Essential Medium) medyum, sentetik ve bitkisel bileşiklerin solüsyonları kullanılmıştır. Çözelti ve solüsyonların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

3.1.3.1. PBS çözeltisinin hazırlanması

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g

KH₂PO₄ 0,24 g
Distile su 500 ml

Çözeltinin pH'sı 7,4 olacak şekilde ayarlanır ve çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edilir.

3.1.3.2. Tripsin solüsyonunun hazırlanması

Tripsin 62,5 mg
PBS 50 ml

Solüsyon sırasıyla; 0,45 µm' lik ve 0,22 µm' lik filtrelerden geçirilerek steril edilir.

3.1.3.3. MTT solüsyonunun hazırlanması

MTT 5 mg
PBS 1 ml

Solüsyon 0,45 µm' lik filtreden geçirilerek steril edilir. Elde edilen stok solüsyon bu haliyle + 4 °C' de en fazla bir ay karanlık ortamda saklanabilir. MTT çalışma solüsyonu hazırlanacağı zaman, bu stok solüsyonundan alınır ve kültür medyumuna ile karıştırılarak kullanılır (Deneylerde kullanılan kuyucuk sayısına göre kültür medyumuna ile karıştırılacak olan MTT oranı hesaplanır). MTT'nin ışığa hassasiyeti nedeni ile işlemler karanlıkta yapılır.

3.1.3.4. DMEM F12 (Dulbecco's Minimum Essential Medium) medyumun hazırlanması

% 1 200 mM L-Glutamine (5 ml)
% 0,5 Penisilin-Streptomisin (2,5 ml)

DMEM F12 500 ml

Elde edilen solüsyondan daha sonra;

DMEM F12 45 ml

FCS 5 ml olacak şekilde medyum hazırlanır.

3.1.3.5. Sentetik ve bitkisel bileşiklerin solüsyonlarının hazırlanması

Deneylerde *Nerium oleander* ve vepesidin farklı konsantrasyonları PBS ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Vepesid (100 mg/5ml) eczaneden satın alınmış ve *Nerium oleander*, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

1- Vepesidin kullanılan konsantrasyonları:

0,01µg/ml, 0,05µg/ml, 1,00µg/ml, 2,00µg/ml, 4,00µg/ml, 6,00µg/ml, 10,00µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml, 200µg/ml, 300µg/ml

100 mg/5 ml vepesidden belirtilen konsantrasyonlar için stoklar hazırlanır. 0,01-0,05 µg/ml konsantrasyonları için 10 µl vepesid üzerine 3 ml PBS ilave edilerek Stok A hazırlanır, 1,00-2,00 µg/ml konsantrasyonları için 30 µl Stok A üzerine 970 µl PBS ilave edilir ve her bir konsantrasyon için kuyucuklara eklenecek ilaç miktarı hesaplanır.

2- *Nerium oleander*'in kullanılan konsantrasyonları:

12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml

10 mg *Nerium oleander* yaprak ve çiçeğinin sulu ve etanollü ekstarkatları 2'şer ml PBS ile çözülür. Her bir konsantrasyon için kuyucuklara eklenecek ilaç miktarları hesaplanır.

3.2. Metot

3.2.1. Hücre kültürü

3.2.1.1 Sıvı azot tankından alınan hücrelerin kültürünün yapılması ve tripsinizasyonu

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler musluk suyu altında kısa sürede çözülür. Steril ortamda Laminar kabin içerisinde 15 ml' lik falkon tüpe 5 ml

%10 FCS içeren DMEM F12 medyumunu konur ve tanktan çıkarılarak çözülen hücreler falkona aktarılır. Falkon 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet el yardımı ile hafifçe vurularak süspanse edilir. Süspansiyondan alınan hücreler thoma lamında sayılır. Sayımdan sonra 25 cm²' lik flaska 7,5 ml %10 FCS içeren DMEM F12 medyum koyulur ve üzerine 1x10⁵ hücre eklenir. Flask 37 °C' de % 5 CO₂'li inkübatöre kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınır ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum dökülür ve flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1ml PBS ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra PBS dökülür ve 1ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 5-10 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrıldıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktararak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti süspanse edilir.

3.2.1.2. Hücre sayımı

Hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamalarında yapılır. Santrifüj sonrasında falkon tüpün dip kısmında kalan hücrelerden 2 µl çekilerek bir ependorf tüpüne konulur. Üzerine 50 µl besiyeri (DMEM-F12) ve 48 µl tripan blue eklenir. İyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra karışımdan 50 µl çekilerek thoma lamına yayılır. Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamaları alınır. Tripan blue ölü hücrelerin içine girme özelliğindedir ve bu nedenle sayım yaparken koyu mavi gözüken hücreler ölü, açık renkteki parlak hücreler canlı olarak sayılır. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra aşağıda verilen formüle göre toplam hücre sayısı elde edilir.

$$\text{Toplam Hücre} = \frac{\text{Ortalama Sayılan Hücre Sayısı} \times \text{Lamin Büyütme Oranı} \times \text{Seyreltme Oranı}}{4}$$

3.2.2. MCF 7 hücrelerinin *in vitro* kültürünün hazırlanması

Dondurulmuş halde sıvı azot tankında bulunan kriyotüplerdeki MCF-7 hücreleri tanktan alınarak musluk suyu altında hafifçe sallanarak çözülür. Falkon tüp içerisine, %10 FCS içeren DMEM F12 medyumı koyulur ve çözünen MCF-7 hücreleri falkona aktararak 1000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet 7,5 ml %10 FCS içeren DMEM F12 medyumı ile süspanse edilip 25 cm²'lik flaska aktarılır. Flask kapağı hafif gevşetilerek 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulur. Her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak, yüzey kaplaması tamamlandığında kültür tripsinize edilerek hücreler yeni bir flaska aktarılır.

3.2.3. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre sayısı ve plaklar

Deneyler için 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanılır. Mikrolakta deneylerde kullanılacak uygun hücre sayısının belirlenebilmesi amacıyla her bir hücre sayısı için 5 ayrı kuyucuğa ekim yapılır. Her biri 5000, 7000 ve 10.000 hücre içeren 100 µl DMEM F12 % 10 FCS medyum her bir kuyucuğa ekilir ve mikrolak 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatöre konulur. Her 24 saatte bir mikrolakta hücrelerin çoğalması mikroskopik olarak gözlenir. Deney sonucunda hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak uygun olan hücre miktarı her bir kuyucuk için 10000 hücre olarak saptanmıştır.

3.2.4. Vepesidin antikanserojen etkisinin MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmesi

Kolorimetrik metot olarak ilk kez Mossmann (1983) tarafından tanımlanan MTT yönteminde, sarı tetrazolium tuzu canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolium halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri izopropanol ve DMSO gibi çözücülerde çözülmesi sonucu ortamda oluşan renk, spektrofotometrik yöntemle ölçülür ve ölçülen değer canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir [61].

Vepesidin antikanserojen etkisinin MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi ile aşağıdaki şekilde incelenmiştir:

Bir falkon tüpe 2 ml % 10 FCS içeren DMEM F12 konulur ve üzerine 100000/ml hücre eklenir. İyi bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra 96 kuyulu mikroplağın 20 kuyucuğunun her birine bu süspansiyondan 100 µl eklenir. Mikroplak 37 °C' de % 5 CO₂'li inkübatörde 48 saat kültüre olması için inkübasyona bırakılır. 48 saat boyunca her 24 saatte bir kültürün yüzey kaplaması mikroskopta bakılarak gözlenir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda farklı konsantrasyonlardaki antikanserojen etkisi incelenecek olan ilaç kuyucuklara eklenir. Hücresiz olarak medyum ile ilacın etkileşiminin değerlendirilebilmesi için, yine 20 kuyucuğa medyum ile farklı konsantrasyonlardaki ilaç miktarları eklenir. Aynı şekilde hücresiz mikroplak da 37 °C' de % 5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılır. İlaç eklendikten 24 saat sonra hücreler mikroskopik olarak incelenerek meydana gelen sitopatolojik değişiklikler tespit edilir ve kontrol grupları ile karşılaştırılır. Mikroplağın 24 saatlik inkübasyonundan sonra, 25 µg MTT/50 µl hazırlanır ve hücreli ve hücresiz olarak her kuyucuğa hazırlanan MTT solüsyonundan 50 µl eklenir. Mikroplak tekrar 37 °C' de % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonunda mikroskopik olarak hücreler üzerinde meydana gelen formazan kristallerinin oluşumuna bakılır. Hücrelerde oluşan formazan kristalleri, hücreli ve hücresiz her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenerek oda sıcaklığında pipetaj yapılarak çözülür. DMSO ile kristaller çözüldükten sonra mikroplak ELİSA ile 570 nm' de okutulur ve sonuçlar hesaplanır.

3.2.5. *Nerium oleander*'in antikanserojen etkisinin MCF-7 hücrelerinde MTT yöntemi ile incelenmesi

Nerium oleander bitkisinin yaprak ve çiçeğinden elde edilen sulu ve etanolü ekstraktlarının 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml'lik konsantrasyonlarının antikanserojen etkileri MCF-7 hücrelerinde Bölüm 3.2.4.'de anlatılan MTT yöntemi ile tayin edilir.

3.2.6. Hücre kültürü etken dozunun hesaplanması

Mikroplağın her bir kuyucuğunda bulunan ilaç ile muamele edilmiş hücrelerin morfolojileri mikroskopik olarak değerlendirilir. Her bir kuyucuktaki hücreler üzerine MTT ilave edilerek formazan kristallerinin oluşumu gözlenir. Oluşan kristaller DMSO ile çözdürülerek mikropalak ELİSA’da okutulur. ELİSA sonuçlarına göre, hücreli ve hücresiz her bir konsantrasyon için kuyucuklardan okunan değerlerin ortalaması alınır. Hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hücresiz kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alınır ve formüle uygulanarak % canlılık hesaplanır. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden kültürün % 50’sini enfekte eden doz hesaplanır.

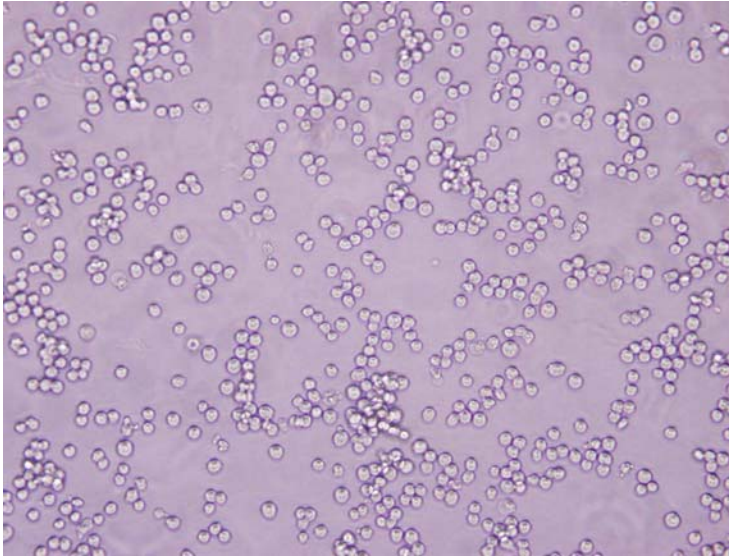
$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubu}}{\text{Kontrol}} \times 100$$

BÖLÜM 4. DENEYSEL BULGULAR

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan temin edilen *Nerium oleander* bitkisel ekstraktlarının *in vitro* şartlarda MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı antikanser etkisini araştırmak ve sentetik (vepesid) ilacın antikanser etkisi ile karşılaştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada kullanılan ilaç ve bileşiklerin değişik konsantrasyonları MCF-7 hücre kültüründe morfolojik olarak incelenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. MCF-7 Hücrelerinin Mikroplaklarda Adaptasyonu

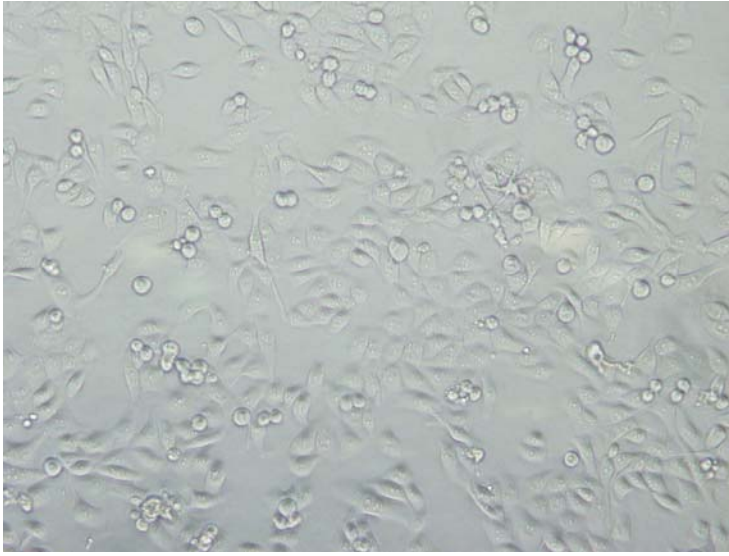
MCF-7 hücre kültürü tripsinize edilip thoma lamı ile sayıldıktan sonra mikroplakta her bir kuyucuğa 100 µl'de 10000 MCF-7 hücresi ekilmiş ve hücrelerin durumu mikroskopik olarak incelenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinin mikroplakta ilk ekildikleri andaki mikroskopik görüntüsü (20x)

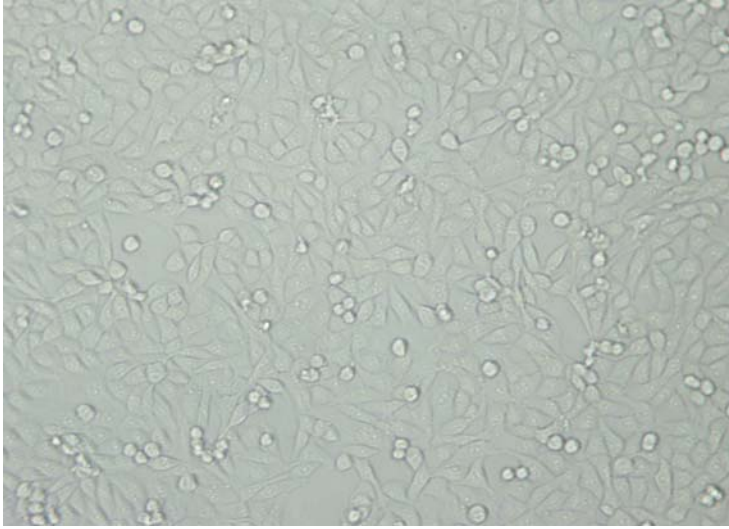
Hücreler ilk ekildikleri anda mikroskopik olarak incelendiklerinde; yuvarlak şekilli, parlak ve henüz yüzeye tutunmamış halde bulundukları tespit edilmiştir.

Ekim yapıldıktan 24 saat sonra hücreler mikroskopik olarak incelendiğinde; hücrelerin yüzeye yapışmaya başlayarak sitoplazmik uzantılar oluşturdıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



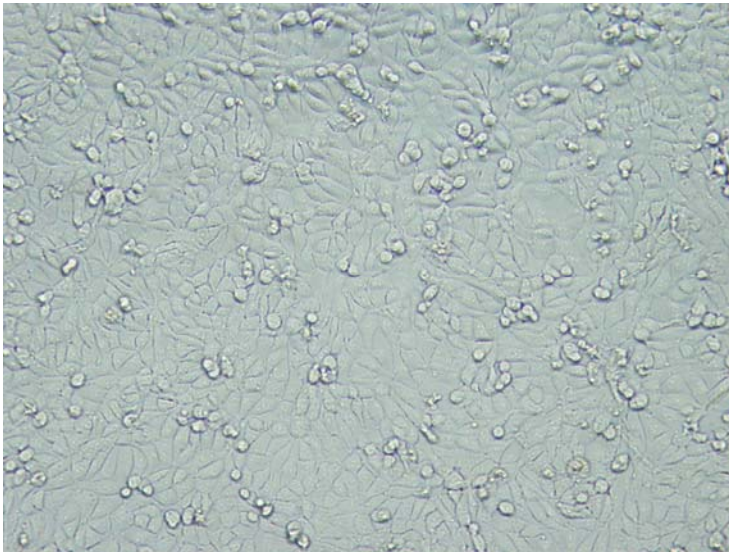
Şeki 4.2. MCF-7 hücrelerinin mikropakta 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

Ekim yapıldıktan 48 saat sonra hücreler mikroskopta incelendiğinde; hücrelerin yüzeye yapıştığı ve az bir kısmının da yüzen ölü hücreler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MCF-7 hücrelerinin mikrolakta 48 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

Ekim yapıldıktan 72 saat sonra hücreler mikroskopik olarak incelendiğinde; bütün hücrelerin yüzeye yapıştığı, monolayer çoğalmalarını tamamladıkları ve ikinci tabakaya geçerek çoğalmaya başladıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



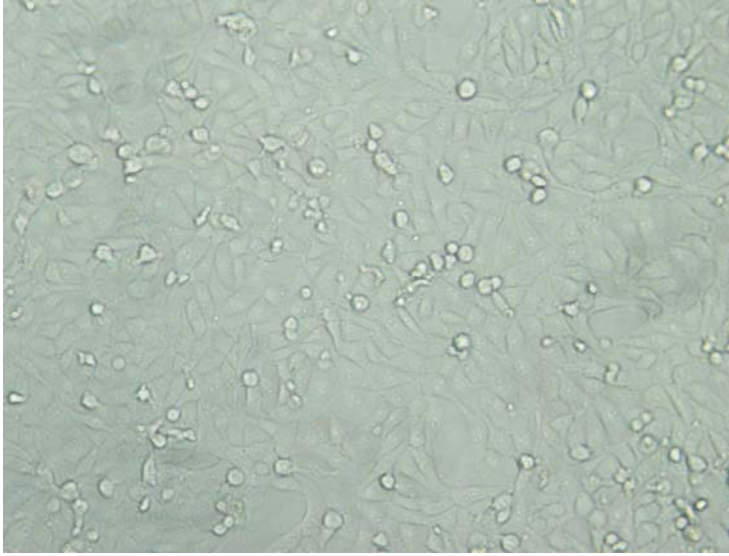
Şekil 4.4. MCF-7 hücrelerinin mikrolakta 72 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

4.2. Vepesidin Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme

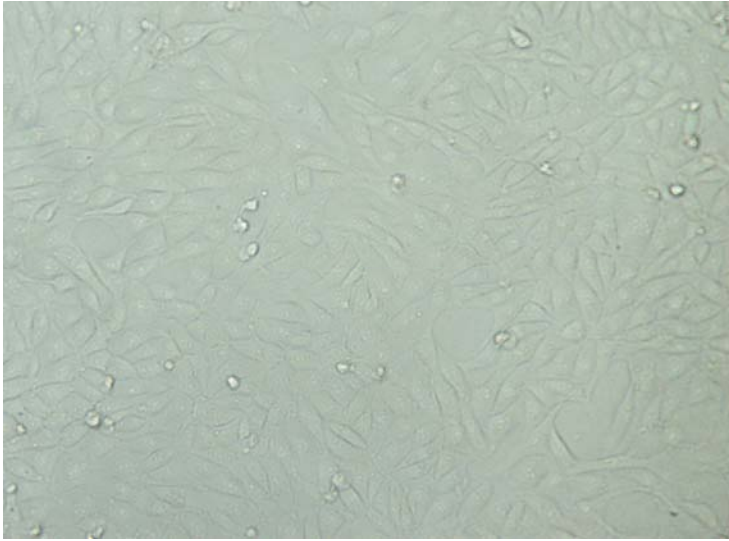
Vepesidin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla (son konsantrasyon 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 1,00 µg/ml, 2,00 µg/ml, 4,00 µg/ml, 6,00 µg/ml, 10,00 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml olacak şekilde) ilacın 12 farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Yapılan deneyde 96 kuyulu mikropalak ve ilacın her konsantrasyonu için 4 ayrı kuyucuk kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için 1 kuyucuk kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. İlacın besiyeri ile etkileşimini değerlendirmek amacıyla hücresiz olarak yine 96 kuyulu mikropalakta aynı konsantrasyonlar çalışılmıştır.

Her bir kuyucuğa 100 µl'de 10000 hücre ekilmiş ve plak inkübatöre koyulmuştur. 48 saatlik inkübasyondan sonra plak mikroskop altında incelenmiş ve hücrelerin durumu değerlendirilmiştir. Hücrelerin plak yüzeyini kapladıkları ve sağlıklı oldukları gözlemlendikten sonra vepesidin belirlenen konsantrasyonları hücreler üzerine ilave edilmiştir.

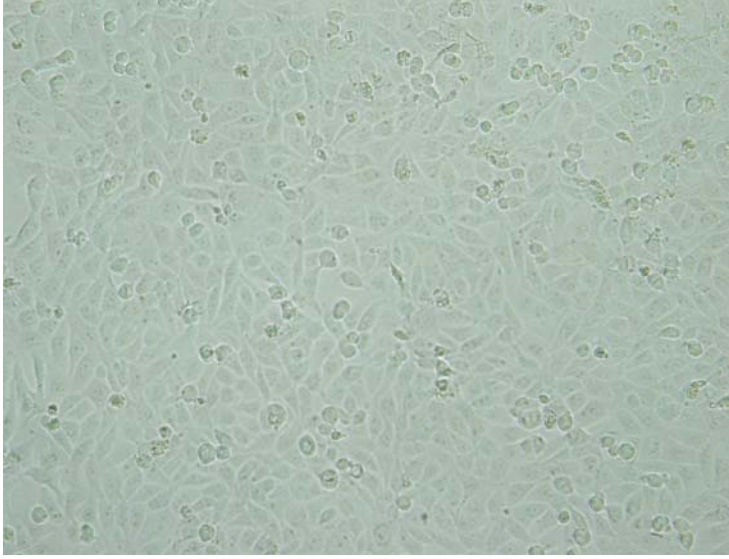
Vepesidin MCF-7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücreler mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). 0,05 µg/ml ile 10,00 µg/ml arasındaki vepesid konsantrasyonlarının ilave edildiği kuyucuklardaki hücrelerin parlaklıklarının kaybolduğu, morfolojilerinin bozulduğu ve hücrelerin atipik hale dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.8- 4.18). İlacın daha yüksek olan 50 µg/ml ile 300 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarında hücrelerin parlaklıklarının kaybolduğu ve görünümünün bulanık olduğu ve tamamen parçalanarak morfolojilerinin bozulduğu ve bu nedenle sayımlarının mümkün olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19- 4.28).



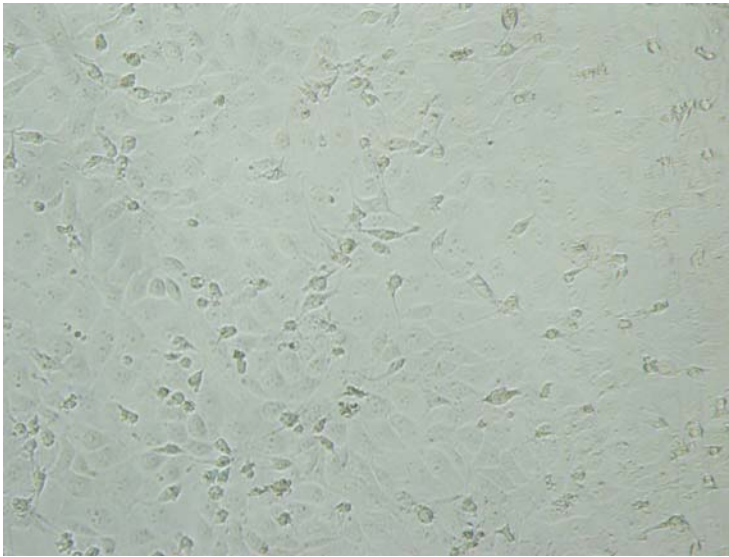
Şekil 4.5. Son konsantrasyon 0,01 $\mu\text{g/ml}$ vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



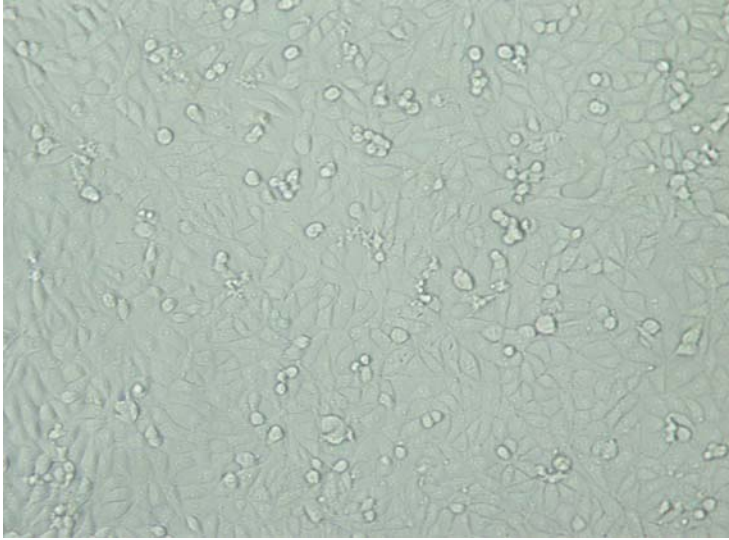
Şekil 4.6. Son konsantrasyon 0,01 $\mu\text{g/ml}$ vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



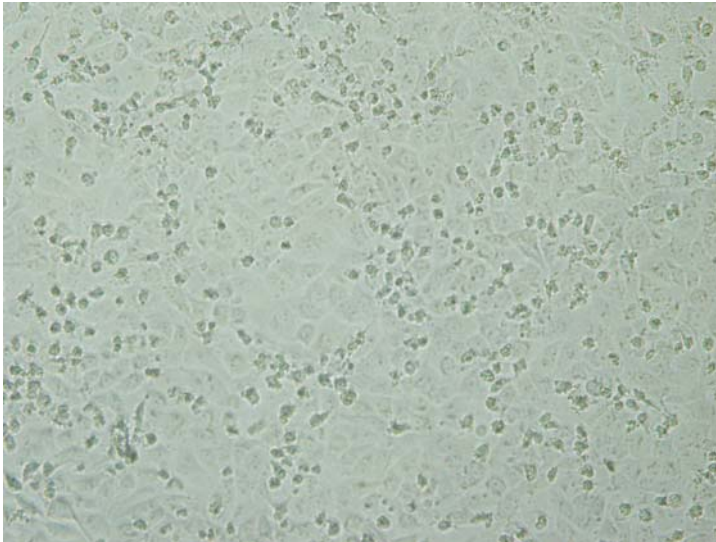
Şekil 4.7. Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



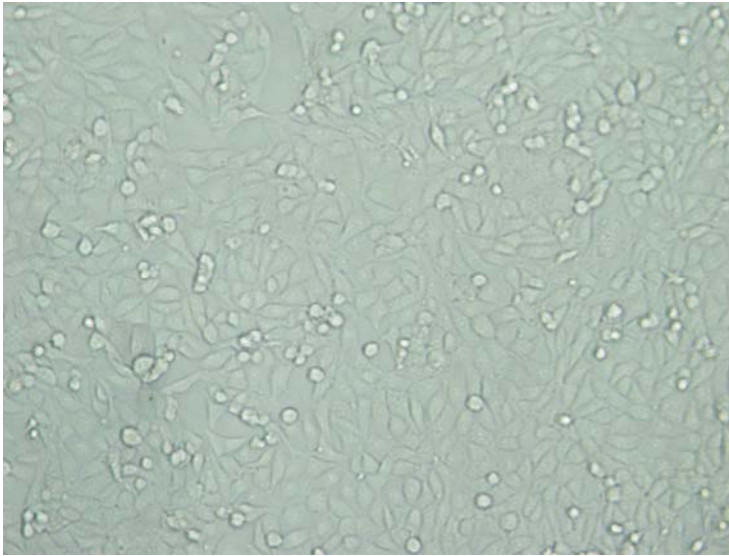
Şekil 4.8. Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



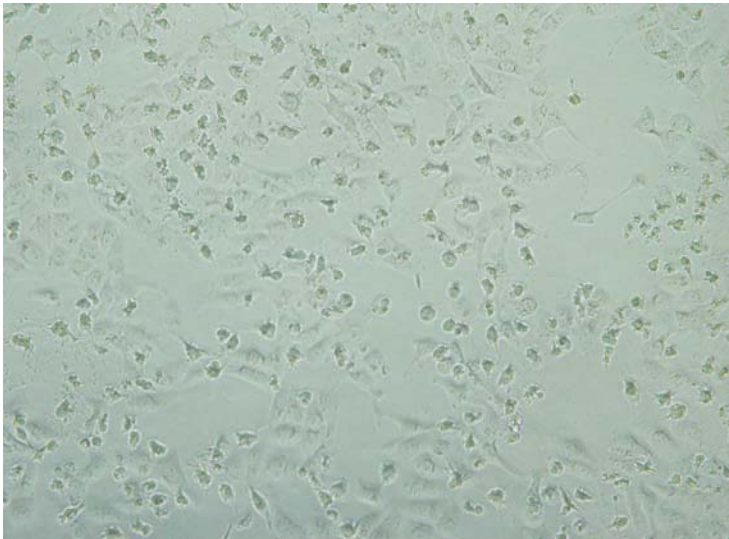
Şekil 4.9. Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



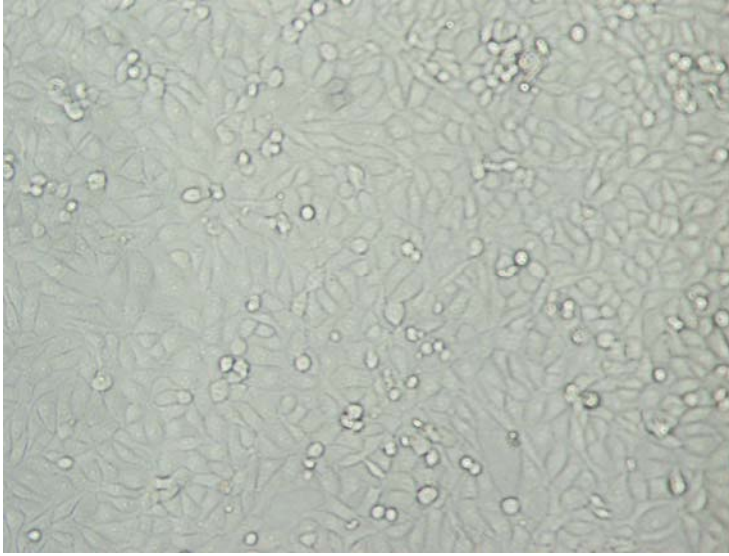
Şekil 4.10. Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



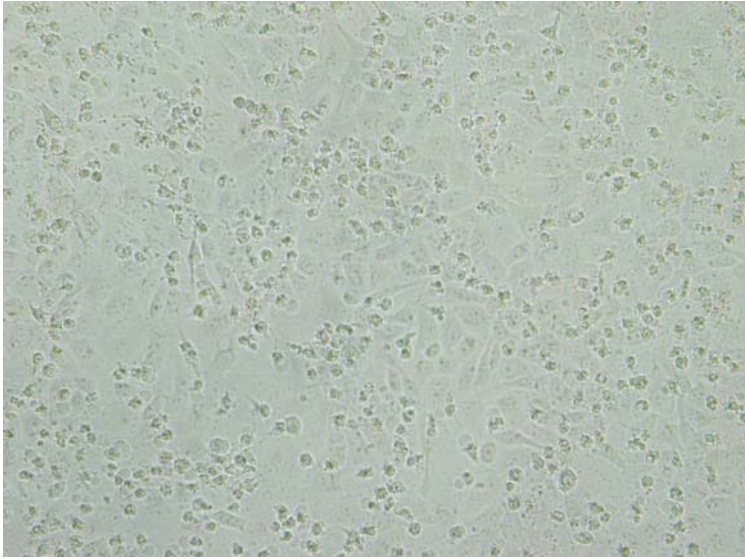
Şekil 4.11. Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



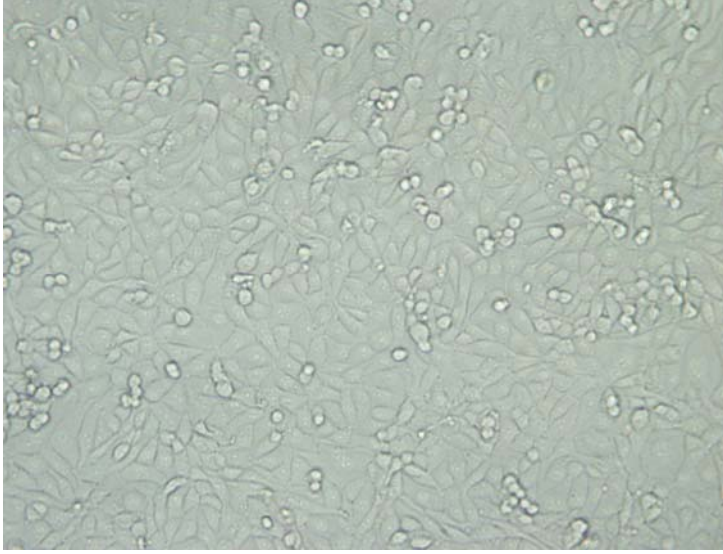
Şekil 4.12. Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



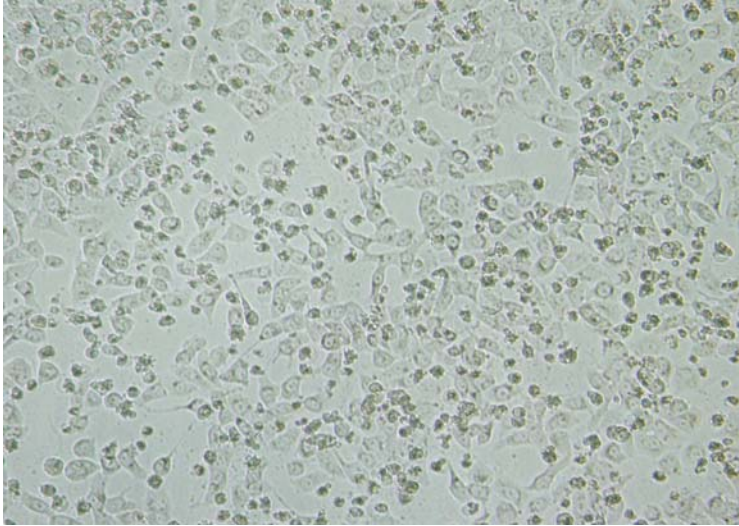
Şekil 4.13. Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



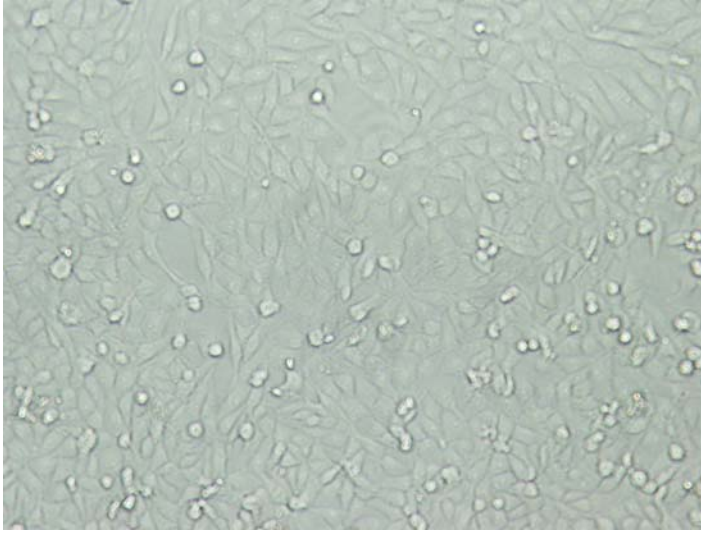
Şekil 4.14. Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



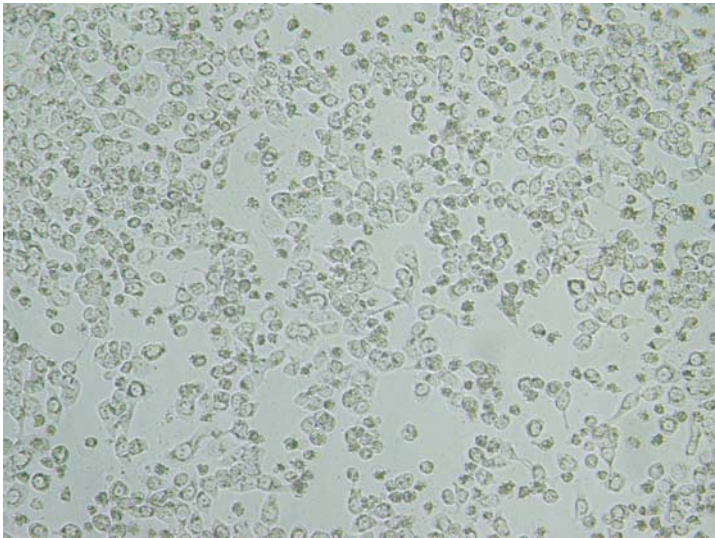
Şekil 4.15. Son konsantrasyon 6 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



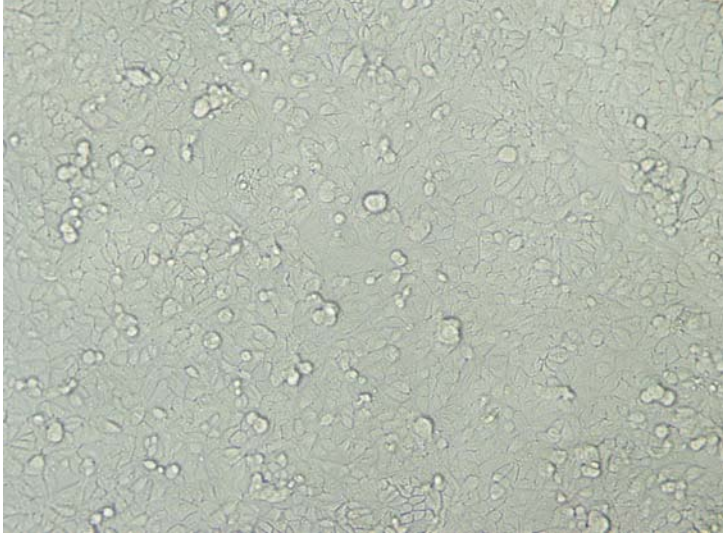
Şekil 4.16. Son konsantrasyon 6 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



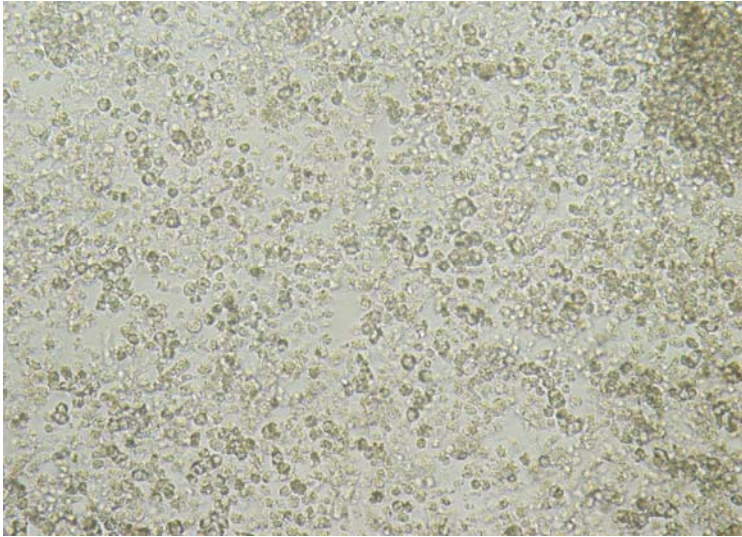
Şekil 4.17. Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



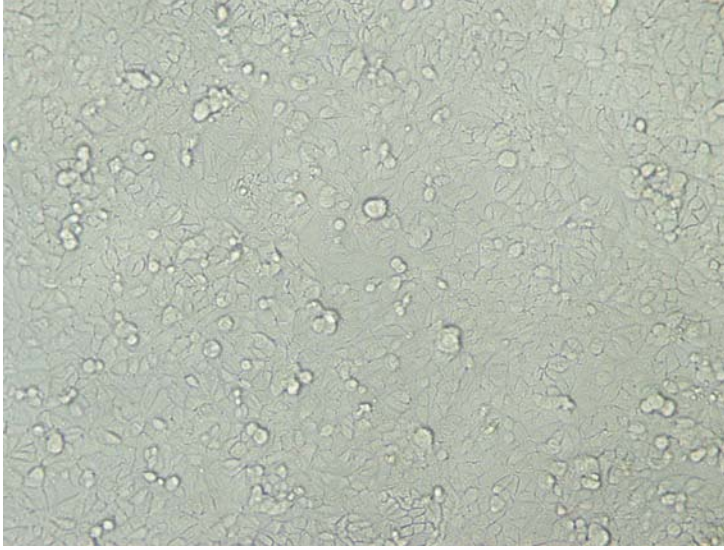
Şekil 4.18. Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.19. Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



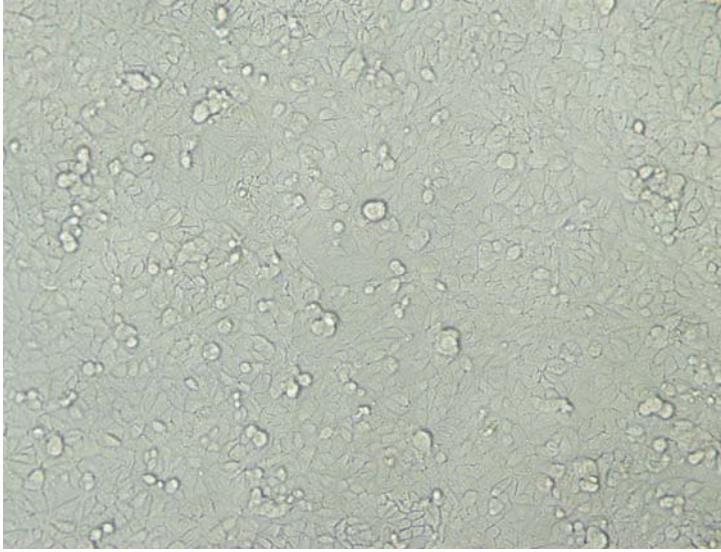
Şekil 4.20. Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.21. Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



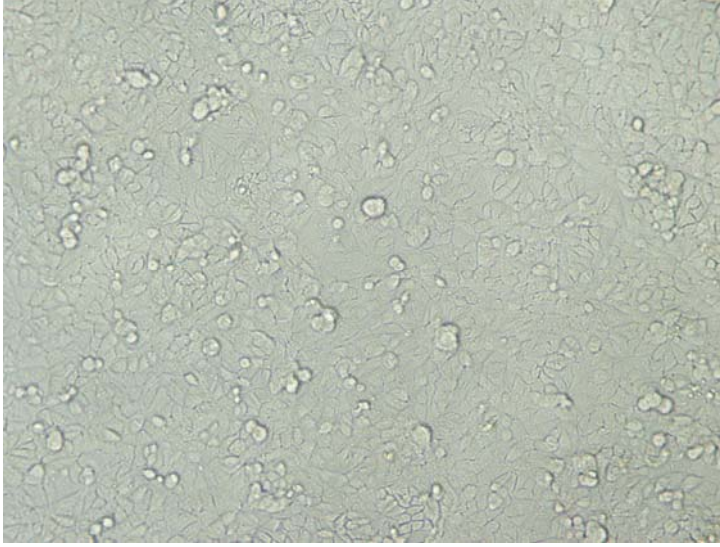
Şekil 4.22. Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.23. Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



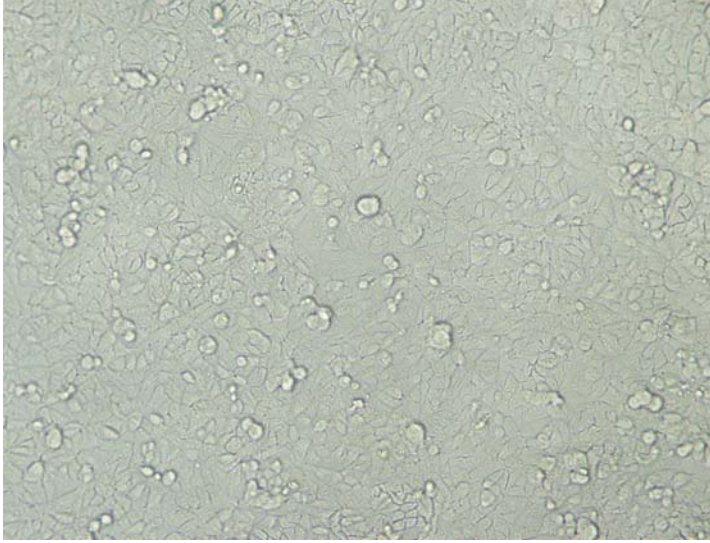
Şekil 4.24. Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.25. Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.26. Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



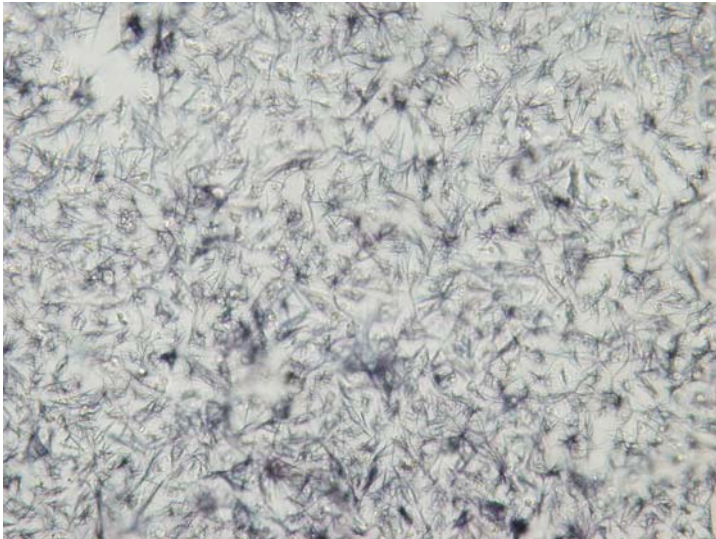
Şekil 4.27. Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesidin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



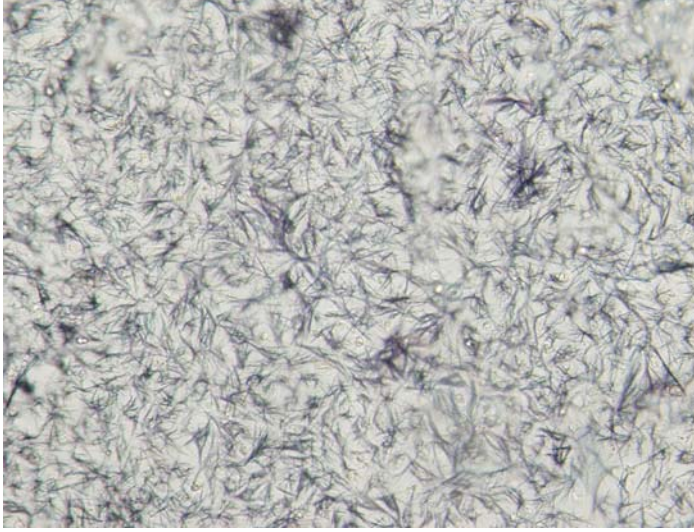
Şekil 4.28. Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesidin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

4.3. Vepesidin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini ve Morfolojik İnceleme

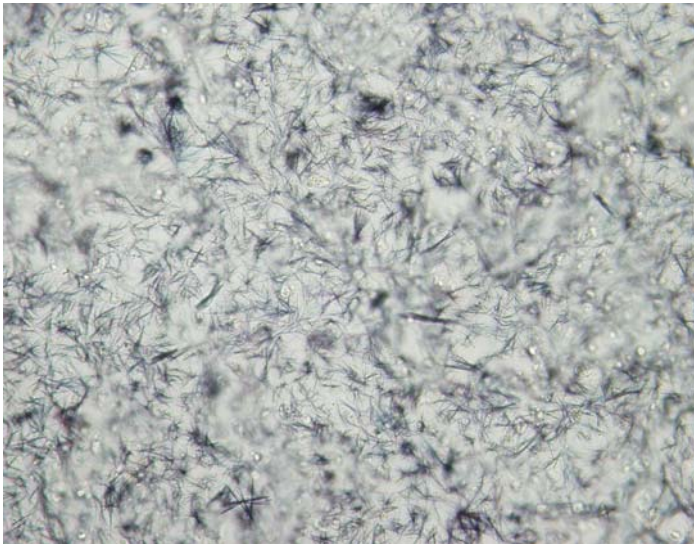
Vepesid ile muamele edilen hücrelerin 24 saatlik inkübasyonundan sonra, Bölüm 3’de belirtilen konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonu her bir kuyucuktaki hücreler üzerine ilave edilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonucu hücrelerin MTT ile etkileşimi sonucu hücrelerde meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu mikroskopik olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda; kontrol grubunda bulunan hücrelerin formazan kristalleri oluşturduğu ve kristal oluşturmayan çok az ölü hücre bulunduğu gözlenmiştir. 0,01µg/ml ve 0,05µg/ml vepesid konsantrasyonlarında kontrol grubundaki hücelere benzer şekilde formazan kristali oluştuğu ve kontrol grubundakinden biraz daha fazla sayıda kristal oluşturmamış ölü hücreler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29-4.31). 1,00 µg/ml ile 10,00 µg/ml arasındaki vepesid konsantrasyonlarında ise artan konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubundaki hücelere oranla daha fazla kristal oluşturmayan ölü hücre olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32-4.42). Buna karşılık 50 µg/ml ile 300µg/ml arasındaki vepesid konsantrasyonlarında hücrelerin formazan kristalleri oluşturmadığı tespit edilmiştir. Görüntüde bulanıklık ve ölü hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.43- 4.48).



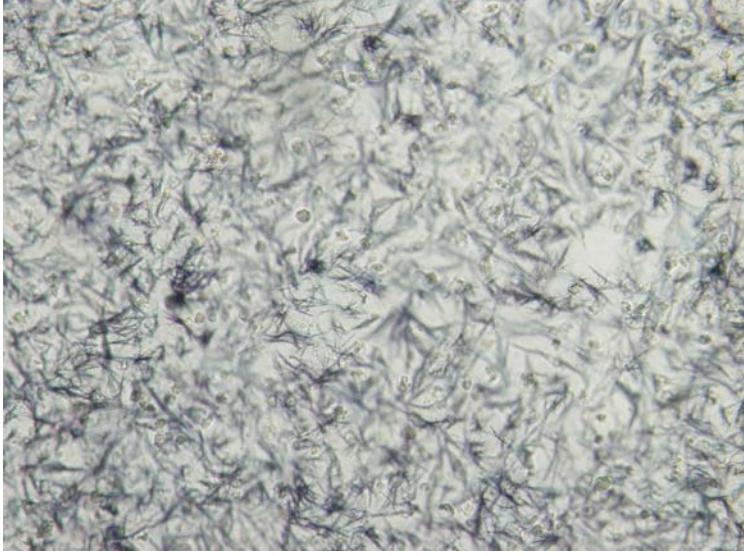
Şekil 4.29. Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



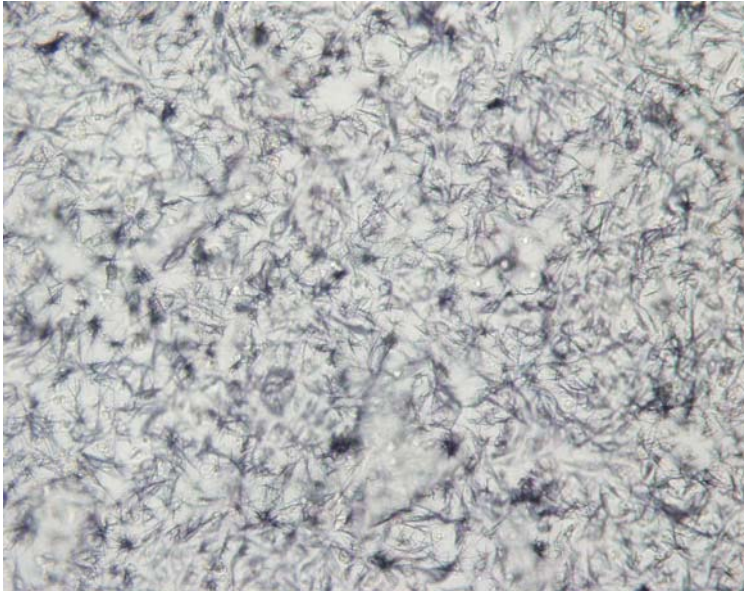
Şekil 4.30. Son konsantrasyon 0,01 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



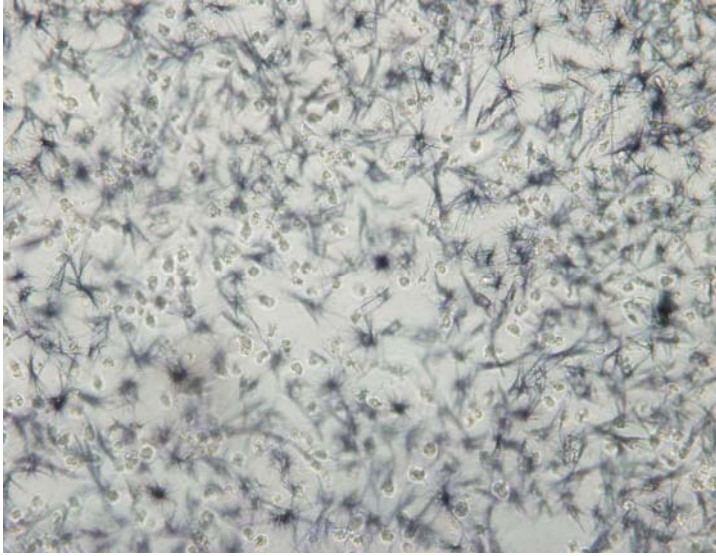
Şekil 4.31. Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



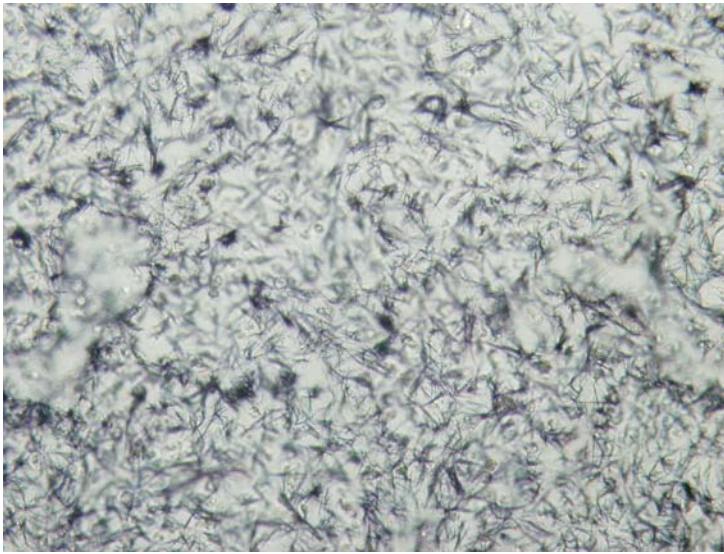
Şekil 4.32. Son konsantrasyon 0,05 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



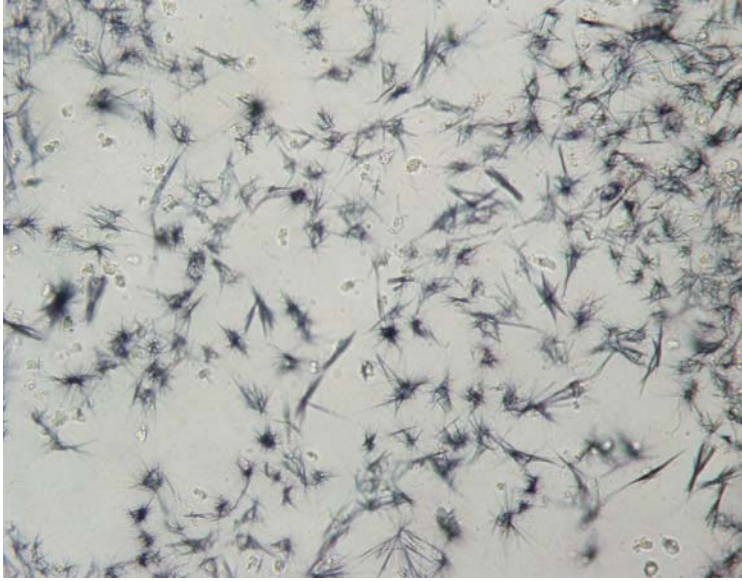
Şekil 4.33. Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



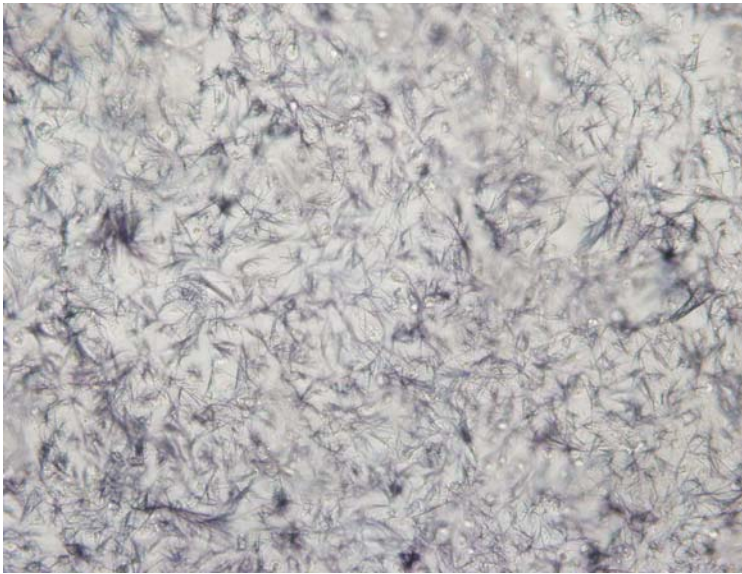
Şekil 4.34. Son konsantrasyon 1,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



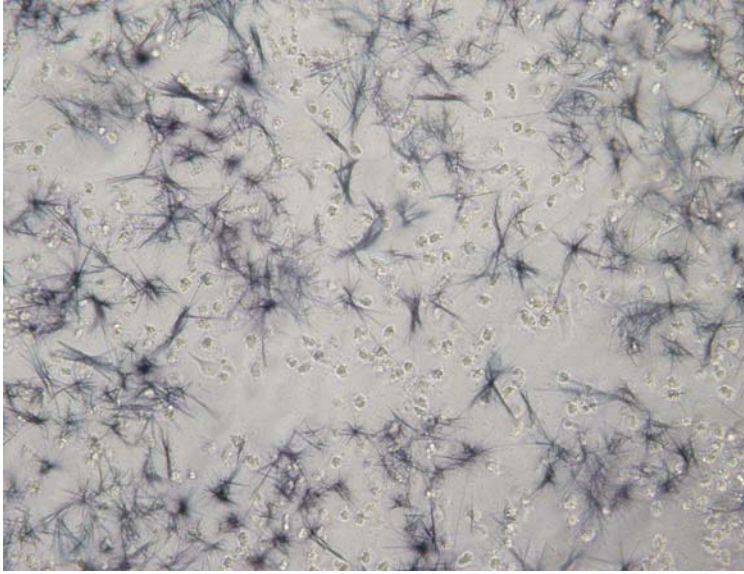
Şekil 4.35. Son konsantrasyon 2,00 µg /ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



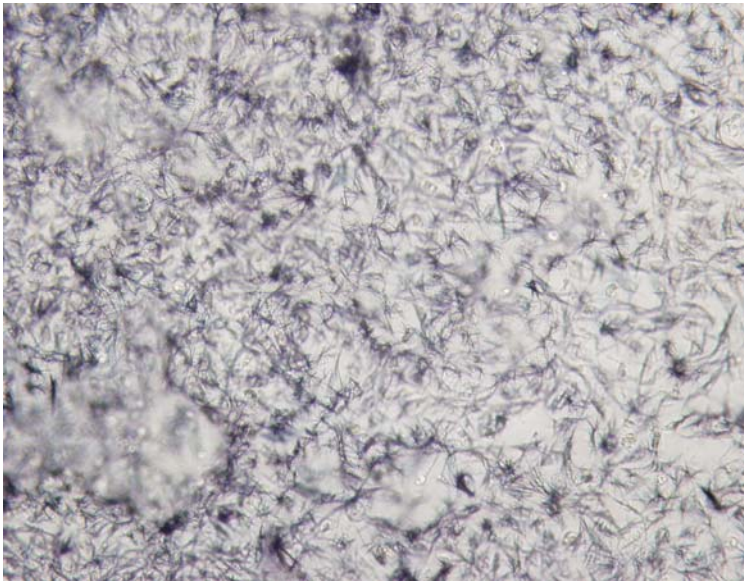
Şekil 4.36. Son konsantrasyon 2,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



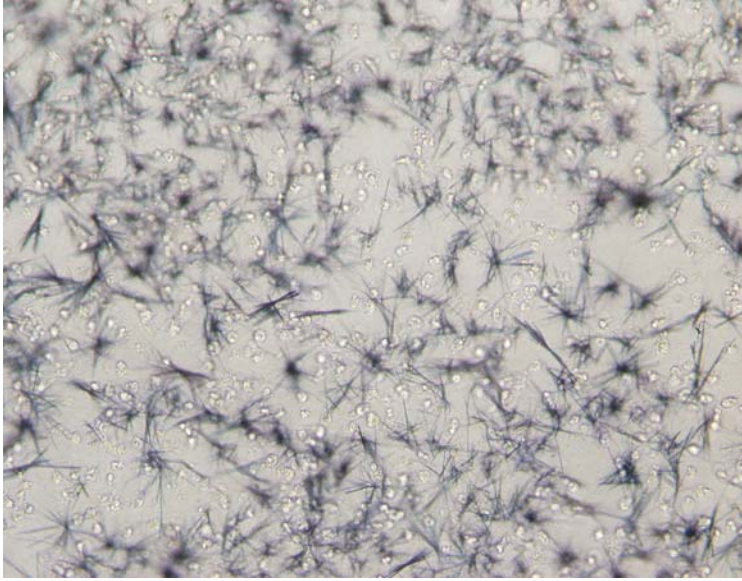
Şekil 4.37. Son konsantrasyon 4,00 µg /ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



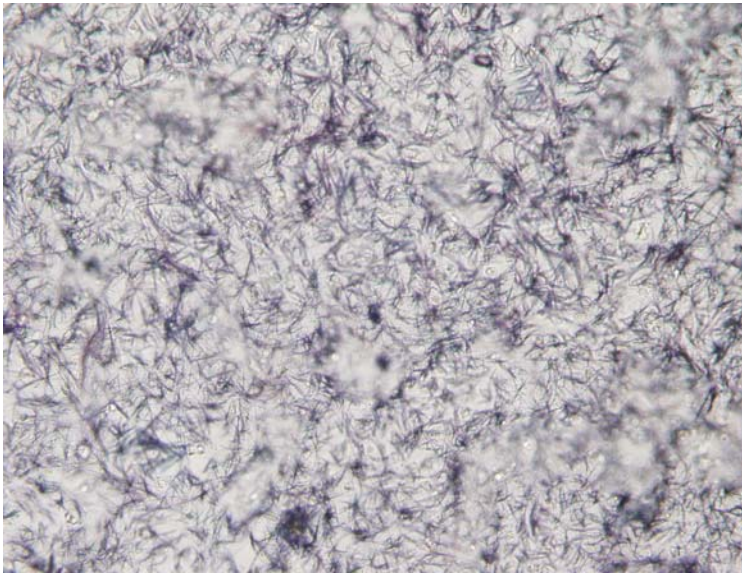
Şekil 4.38. Son konsantrasyon 4,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



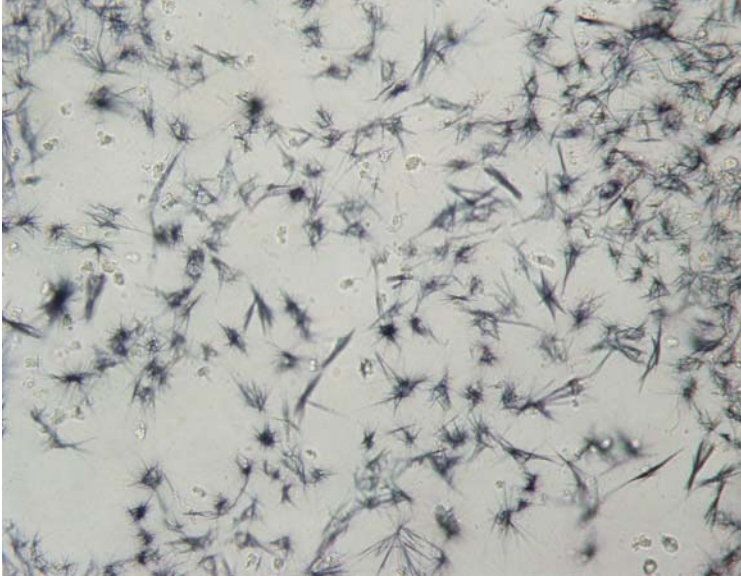
Şekil 4.39. Son konsantrasyon 6,00 µg /ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



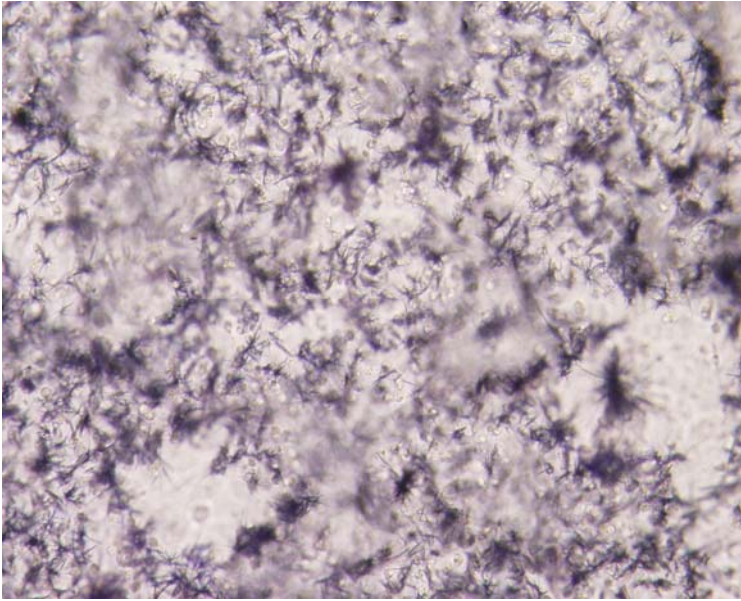
Şekil 4.40. Son konsantrasyon 6,00 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



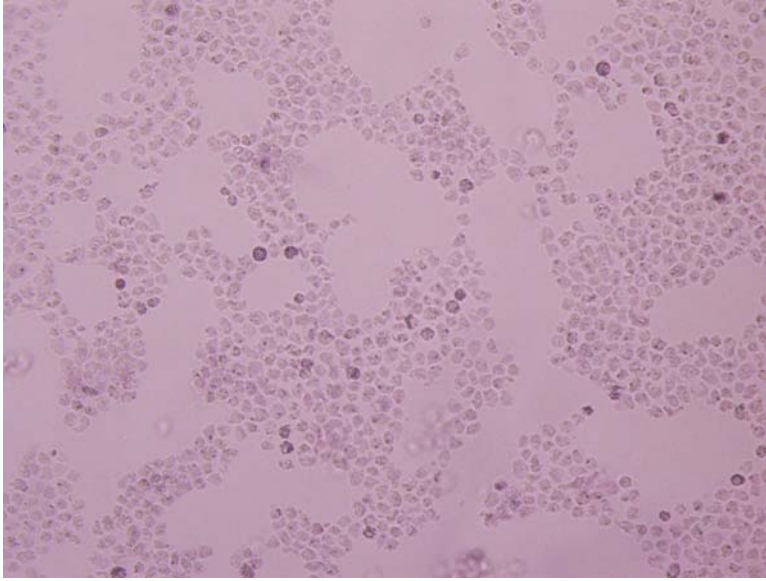
Şekil 4.41. Son konsantrasyon 10 µg /ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



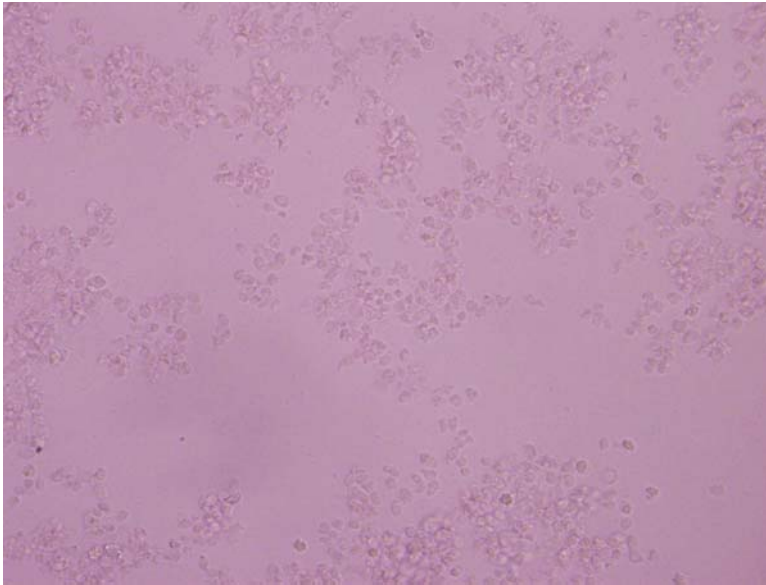
Şekil 4.42. Son konsantrasyon 10 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



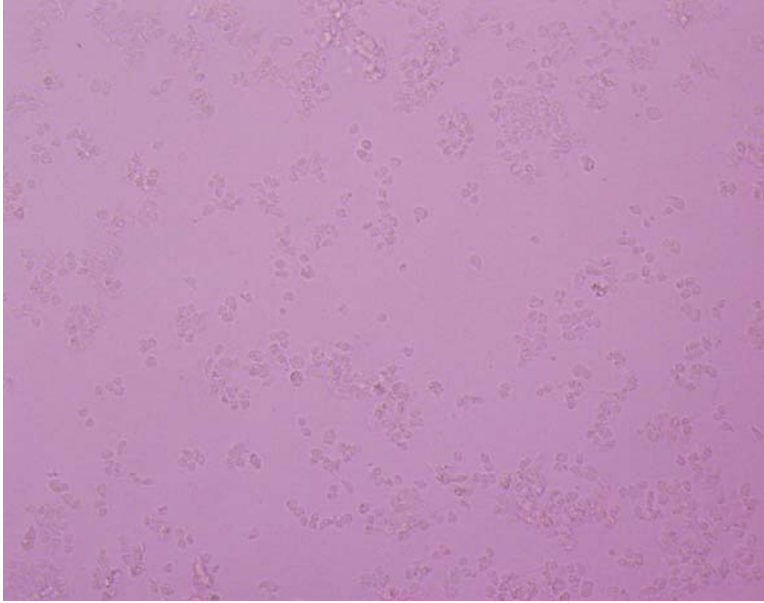
Şekil 4.43. Son konsantrasyon 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml ve 300 µg/ml vepesidin kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



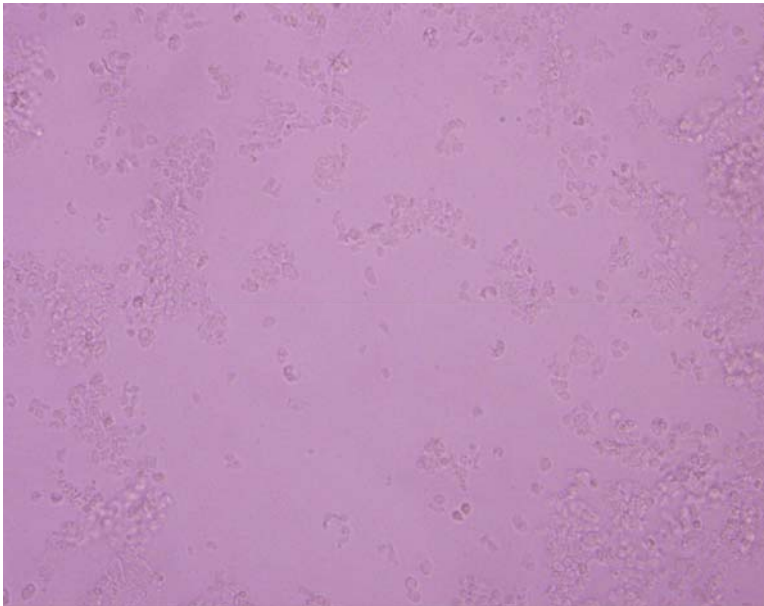
Şekil 4.44. Son konsantrasyon 50 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin mikroskopik görüntüsü (20x)
(Formazan kristalleri oluşmamıştır)



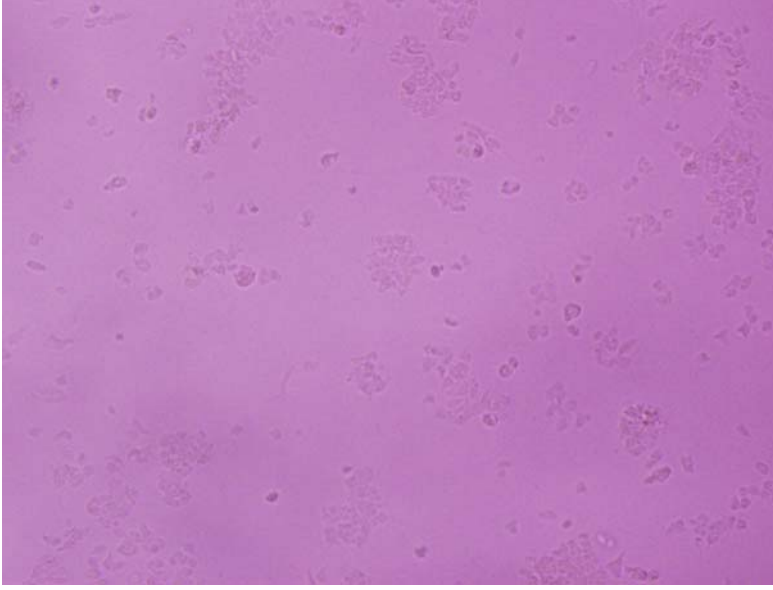
Şekil 4.45. Son konsantrasyon 100 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin mikroskopik görüntüsü (20x)
(Formazan kristalleri oluşmamıştır)



Şekil 4.46. Son konsantrasyon 150 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin mikroskopik görüntüsü (20x)
(formazan kristalleri oluşmamıştır)

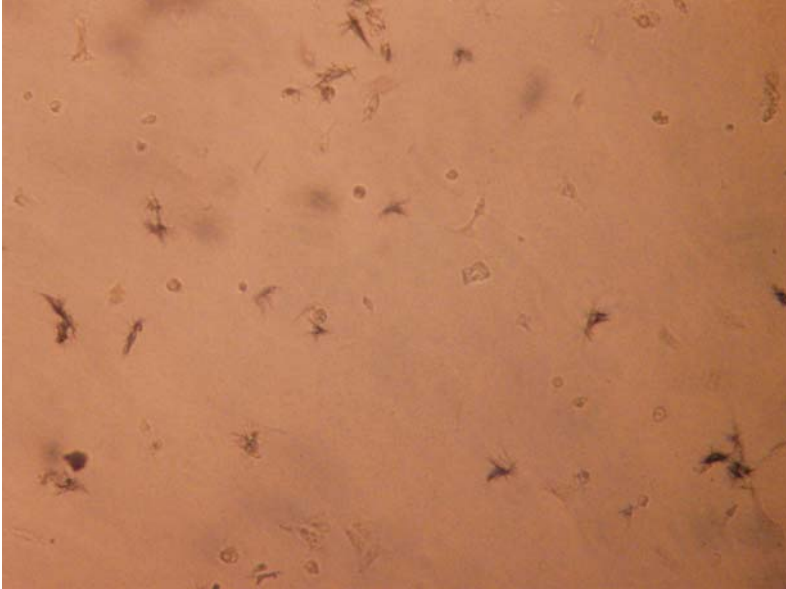


Şekil 4.47. Son konsantrasyon 200 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin mikroskopik görüntüsü (20x)
(Formazan kristalleri oluşmamıştır)



Şekil 4.48. Son konsantrasyon 300 µg/ml vepesid ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşiminin mikroskopik görüntüsü (20x)
(Formazan kristalleri oluşmamıştır)

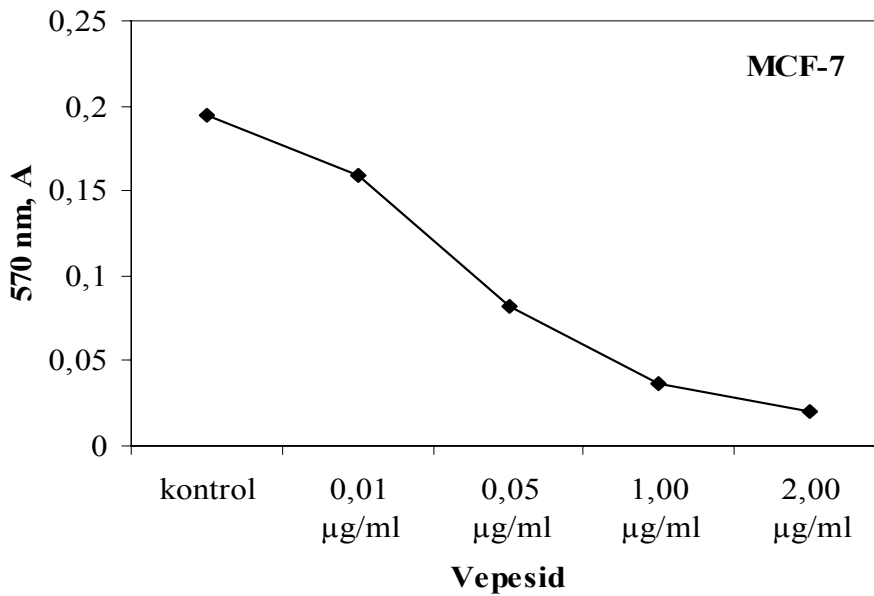
MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimleri sonucu oluşturdukları formazan kristalleri, materyal metot bölümünde belirtildiği gibi her bir kuyucuktaki hücreler üzerine belirlenen konsantrasyonda DMSO ilave edilmesi ile çözülmüştür (Şekil 4.49).



Şekil 4.49. MCF-7 hücreleri üzerine DMSO ilave edildikten 15 dakika sonra çözünen formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)

4.4. Vepesidin MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin EC_{50} 'ye Göre Hesaplanması

Mikroplakta her bir kuyucukta bulunan MCF-7 hücreleri üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristalleri çözülmüş ve çözülen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimine göre absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELİSA cihazında ölçülmüştür. Buna göre; vepesidin MCF- 7 hücrelerinde EC_{50} değeri 0.02 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Vepesidin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin gösterildiği grafik Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.50. Farklı konsantrasyonlardaki vepesidin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi

4.5. *Nerium oleander* Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisi ve Morfolojik İnceleme

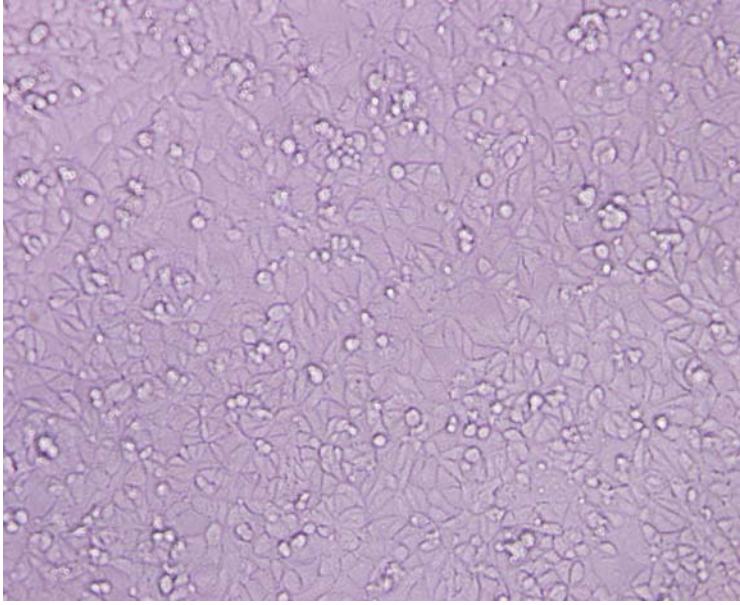
Nerium oleander bitkisinin çiçek ve yaprağından elde edilen ekstraktların MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla (son konsantrasyon 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde) ilacın 3 farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Yapılan deneyde 96 kuyulu mikroplakta ilacın her konsantrasyonu için 4 ayrı kuyucuk kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için 1 kuyucuk kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Her bir kuyucuğa 100 µl’de 10000 hücre ekilmiş ve plak inkübatöre konulmuştur. 48 saatlik inkübasyondan sonra plak mikroskop altında incelenerek hücrelerin durumu değerlendirilmiştir. Hücrelerin plak yüzeyini kapladıkları ve sağlıklı oldukları gözlendikten sonra ve *Nerium oleander*’in belirlenen konsantrasyonları hücreler üzerine ilave edilmiştir.

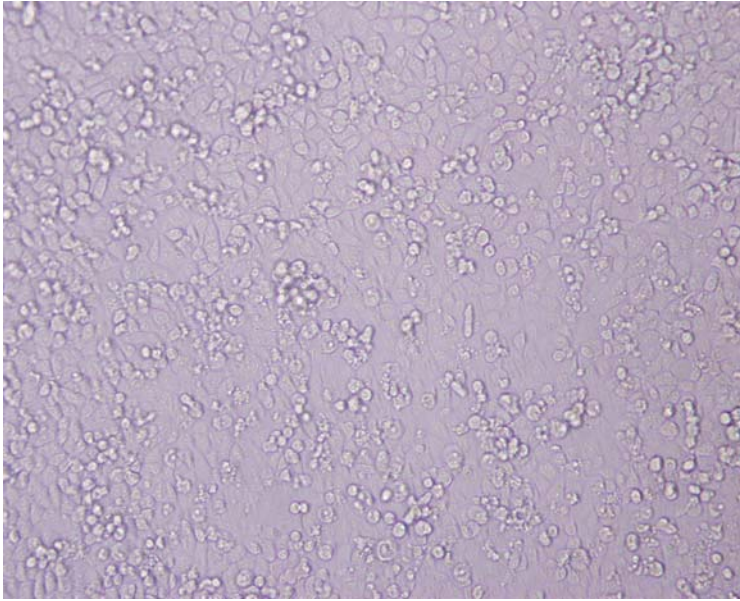
Nerium olenader’in çiçek ve yaprağından elde edilen etanollü ve sulu ekstraterinin hazırlanan farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerine ilave edilmesinden 24 saat sonra hücreler mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Ekstraktların değişik konsantrasyonlarının antikanserojen etkileri MCF-7 hücre kültüründe morfolojik olarak incelemiş ve sonuçlar Şekil 4.51- 4.74 ‘de verilmiştir.

4.5.1. *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi

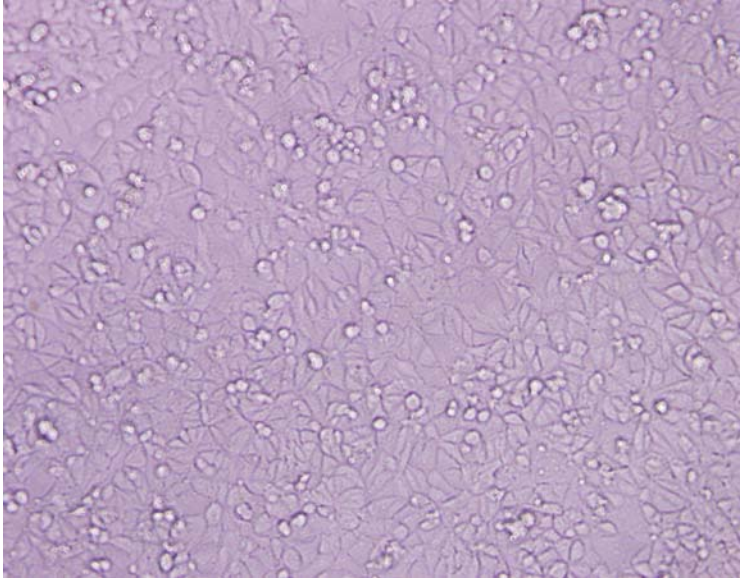
Sulu ekstraktın eklenmesinden 24 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirmeye göre; kontrol grubundaki hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı oldukları gözlenirken, son konsantrasyon 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde eklenen kuyucuklardaki hücrelerde konsantrasyon arttıkça parlaklıklarında kaybolma, hücre yuvarlaklaşması, granülasyon ve atipik hücreler tespit edilmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin canlılığında da belirli ölçüde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.51- 4.56).



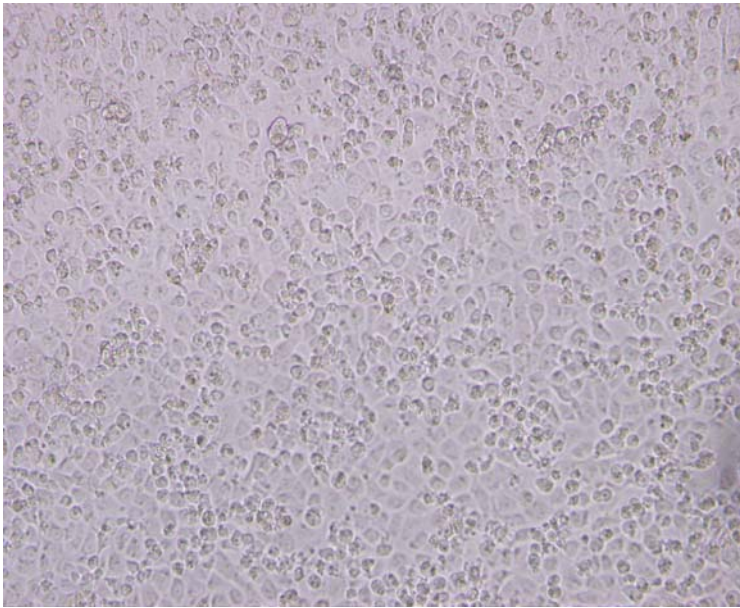
Şekil 4.51. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



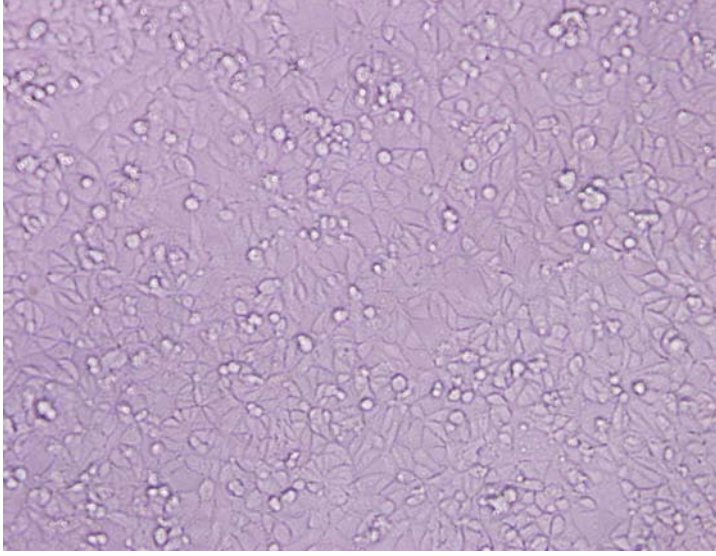
Şekil 4.52. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



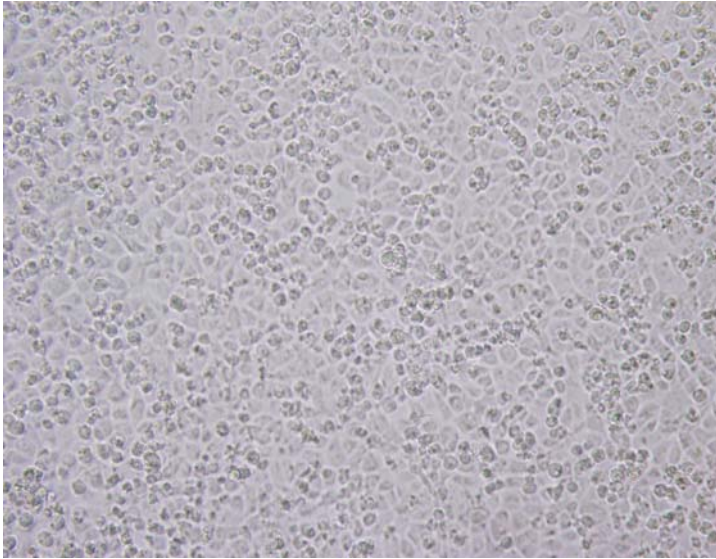
Şekil 4.53. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.54. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



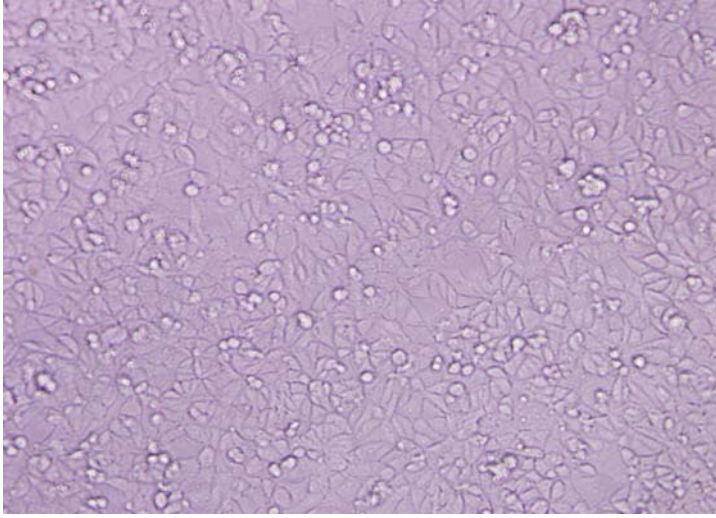
Şekil 4.55. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



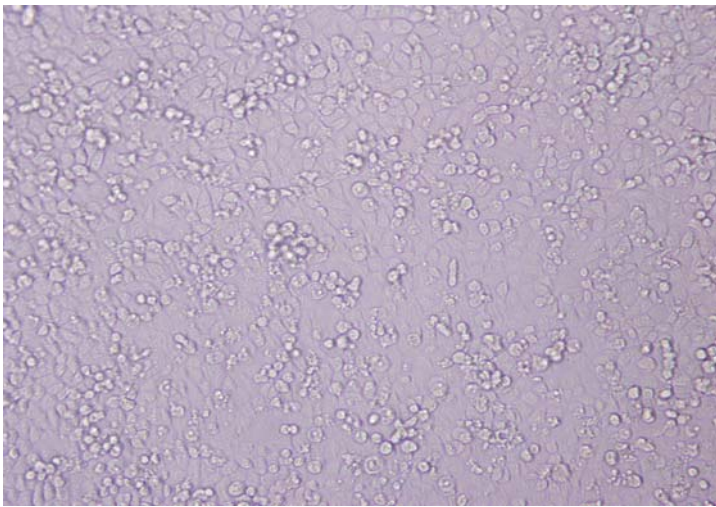
Şekil 4.56. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

4.5.2. *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi

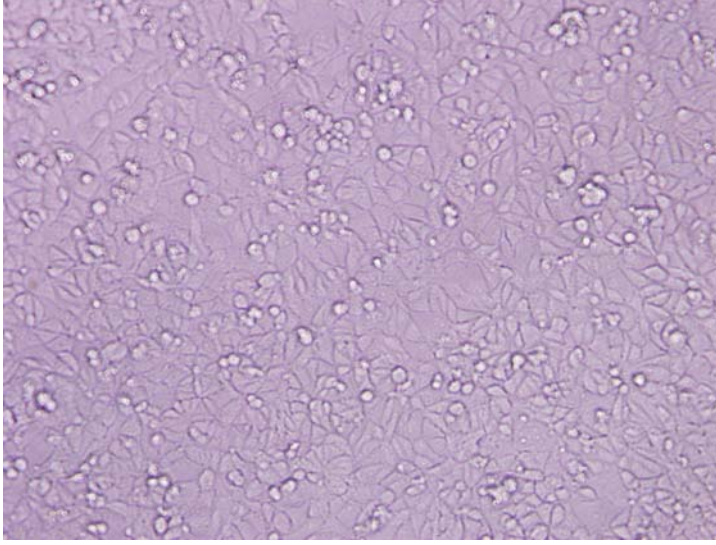
Etanollü ekstraktın eklenmesinden 24 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirmeye göre; kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı ve düzgün morfolojiye sahip oldukları gözlenirken, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu, artan konsantrasyona bağlı olarak ölü hücre sayısının canlı hücreye oranla daha fazla olduğu ve kültür ortamında bulunan canlı hücrelerin de çok sağlıklı olmadıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.57- 4.62).



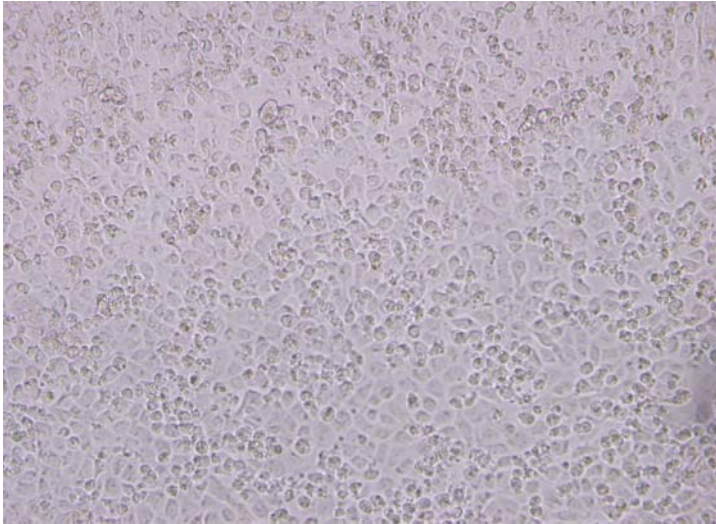
Şekil 4.57. Son konsantrasyon 12,5 $\mu\text{g/ml}$ *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



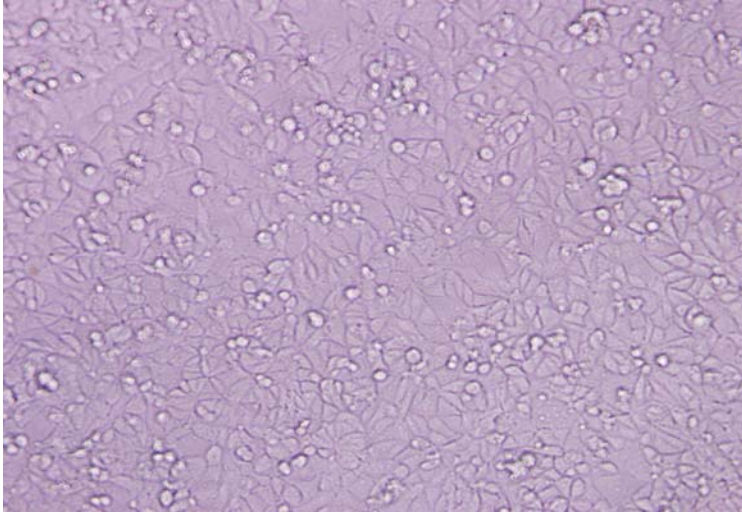
Şekil 4.58. Son konsantrasyon 12,5 $\mu\text{g/ml}$ *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



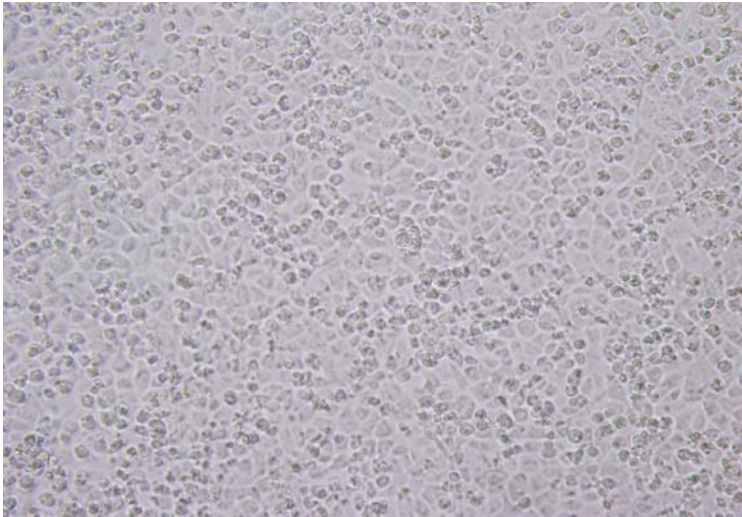
Şekil 4.59. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.60. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.61. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)

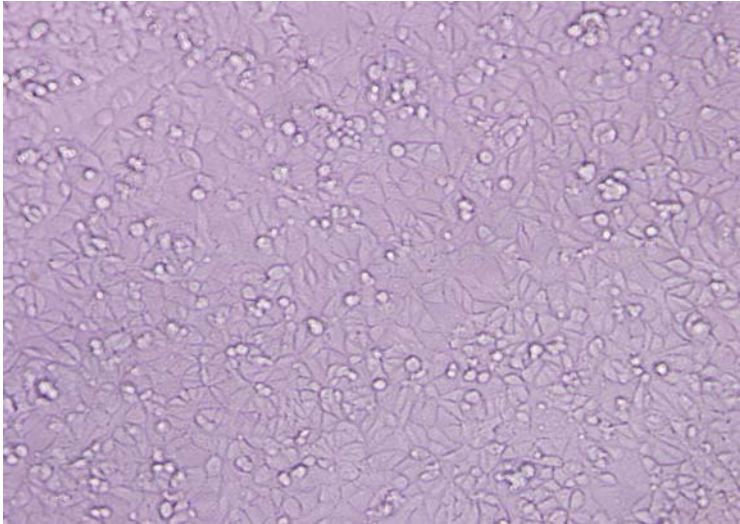


Şekil 4.62. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

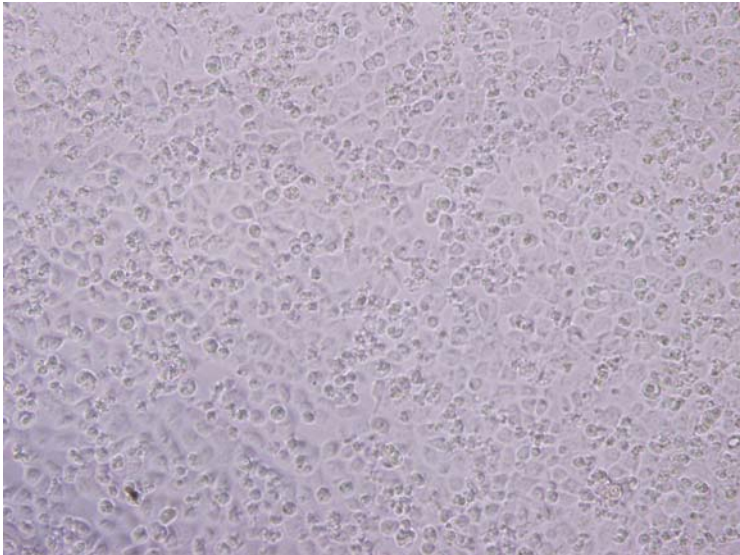
4.5.3. *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi

Sulu ekstraktın eklenmesinden 24 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirmeye göre; kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı ve düzgün morfolojiye sahip oldukları gözlenirken, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu, deforme olarak yuvarlak şekilli ve koyu renkli oldukları

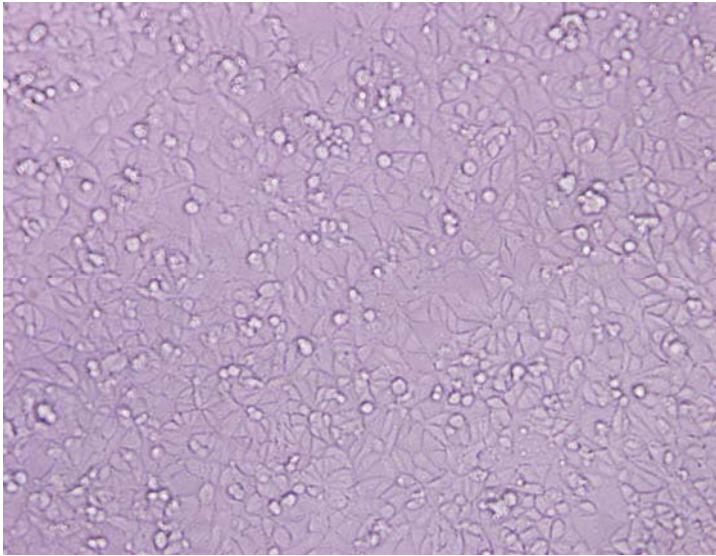
gözlenmiştir. Artan konsantrasyona bağlı olarak ölü hücre sayısının canlı hücreye oranla daha fazla olduğu ve kültür ortamında bulunan canlı hücrelerin de çok sağlıklı olmadıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.63- 4.68).



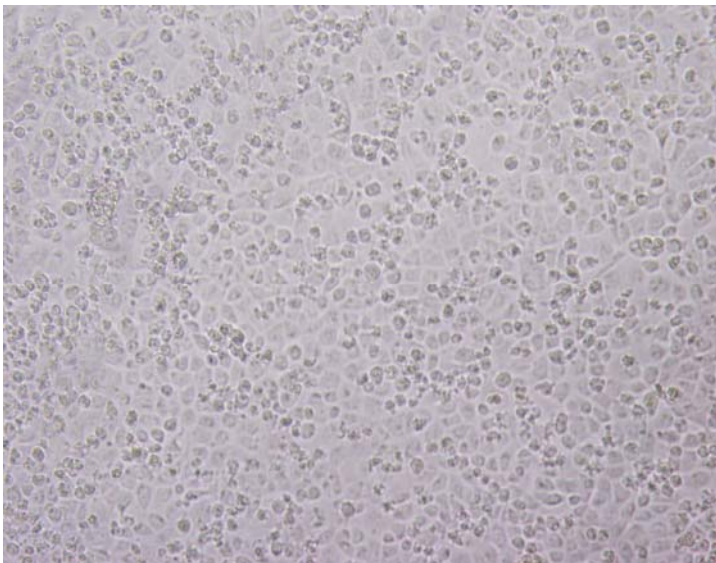
Şekil 4.63. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



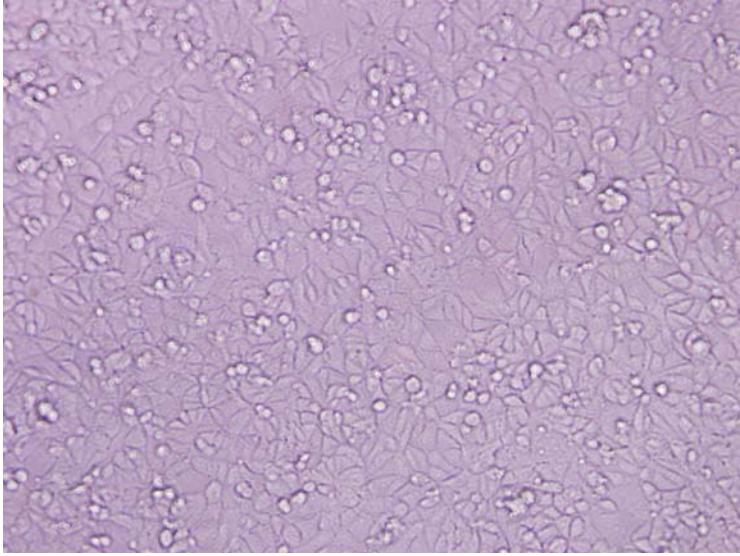
Şekil 4.64. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.65. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.66. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



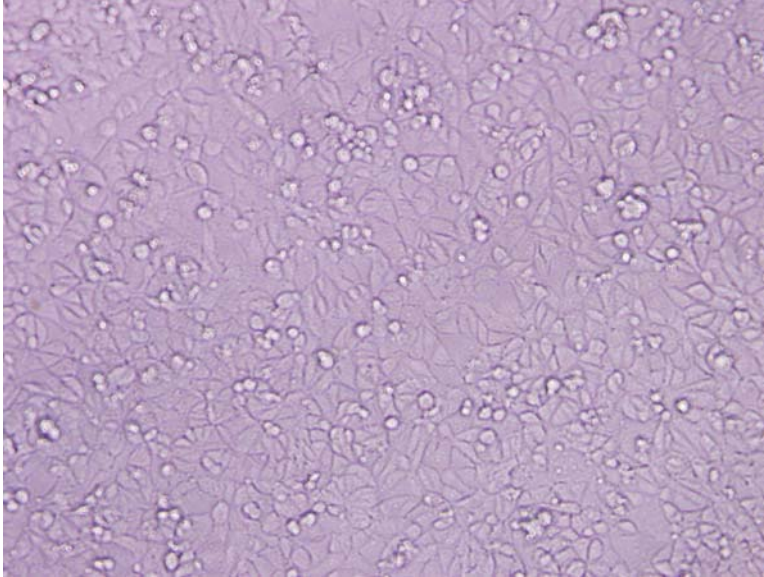
Şekil 4.67. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



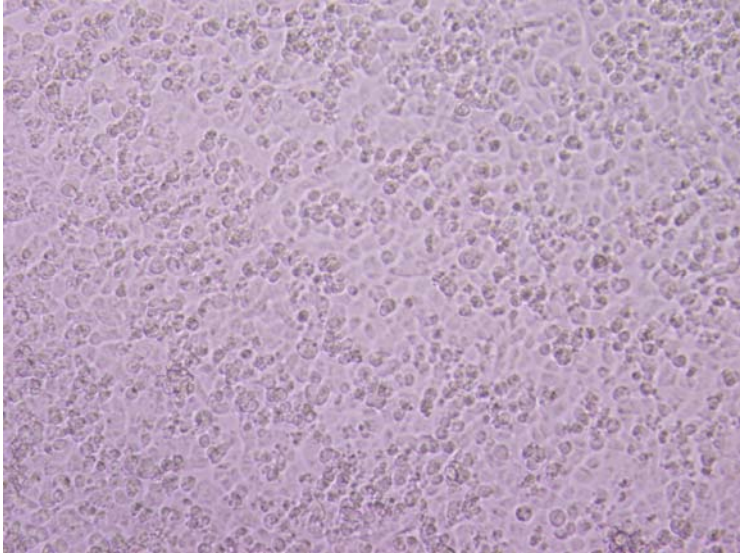
Şekil 4.68. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

4.5.4. *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi

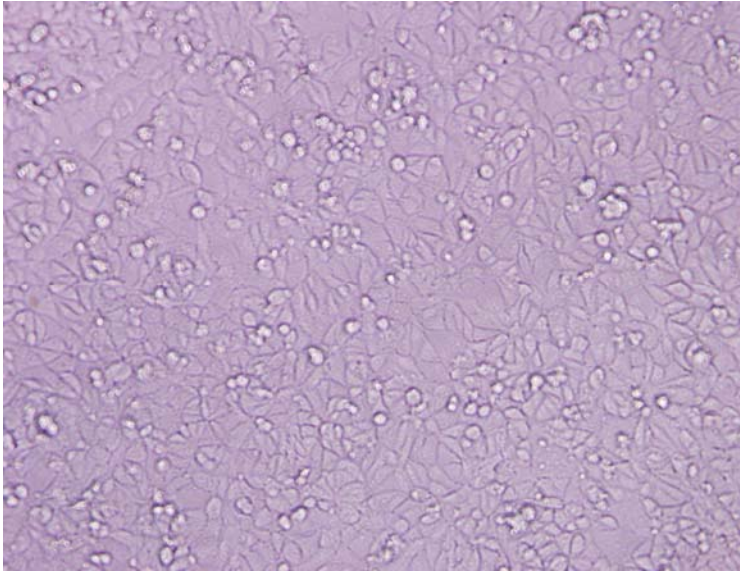
Etanollü ekstraktın eklenmesinden 24 saat sonra yapılan morfolojik değerlendirmeye göre; kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı ve düzgün morfolojiye sahip oldukları gözlenirken, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonların eklendiği kuyucuklardaki hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu, kültür ortamında hiç sağlıklı hücre bulunmadığı ve buna bağlı olarak da ölü hücre sayısının çok fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.69- 4.74).



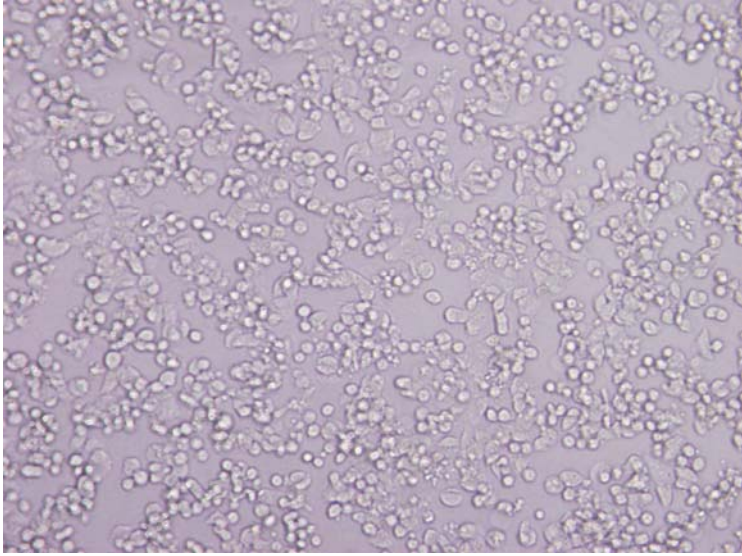
Şekil 4.69. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



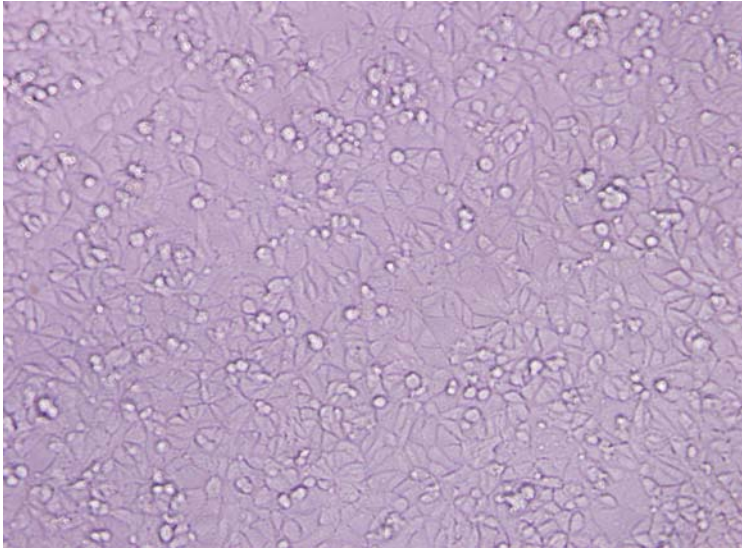
Şekil 4.70. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



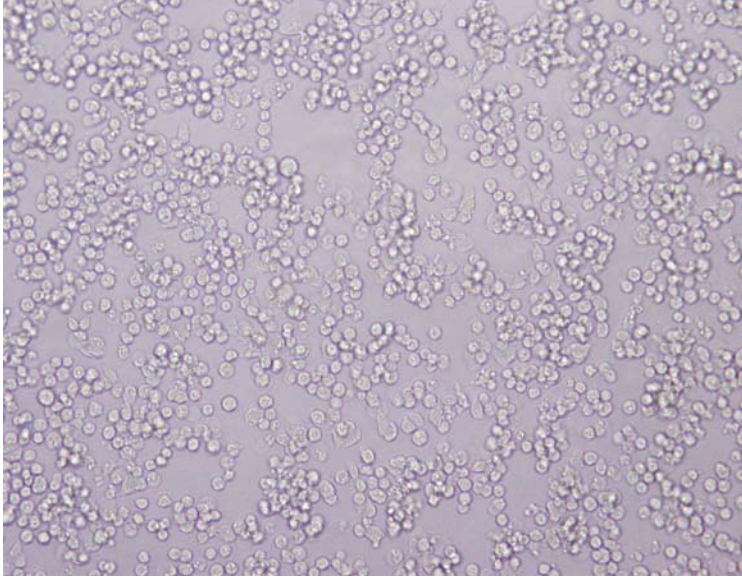
Şekil 4.71. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.72. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)



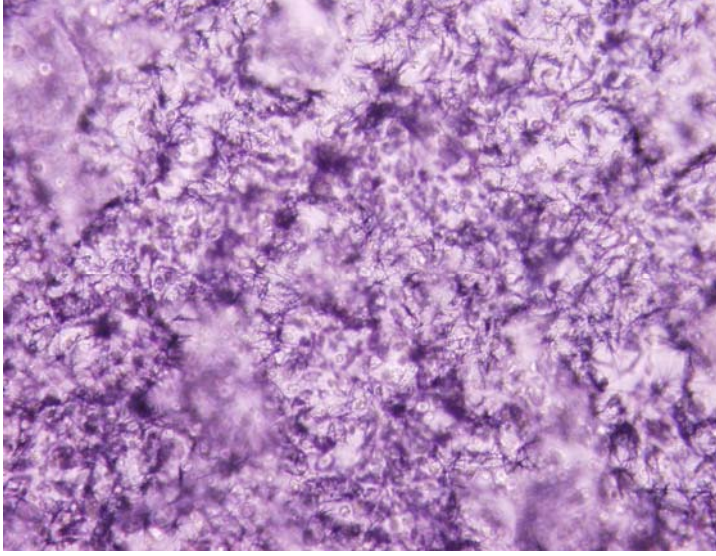
Şekil 4.73. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin kontrol grubu olan MCF-7 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



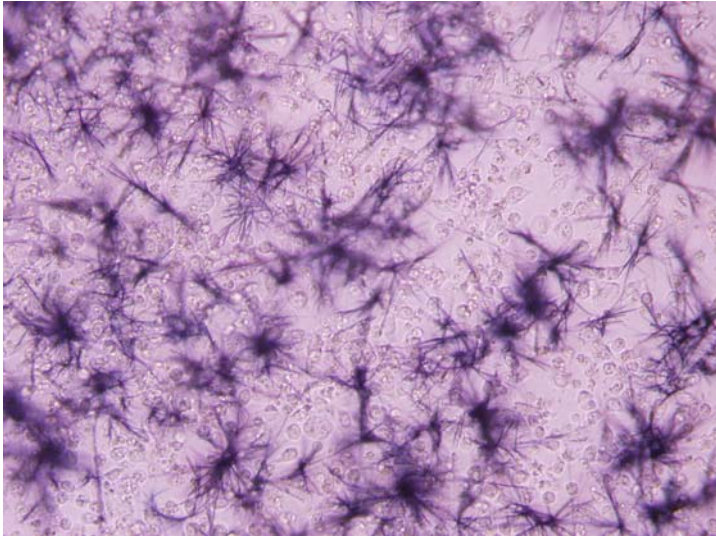
Şekil 4.74. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstresinin MCF-7 hücrelerine etkisinin 24 saat sonraki mikroskopik görüntüsü (20x)

4.6. *Nerium oleander* Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini ve Morfolojik İnceleme

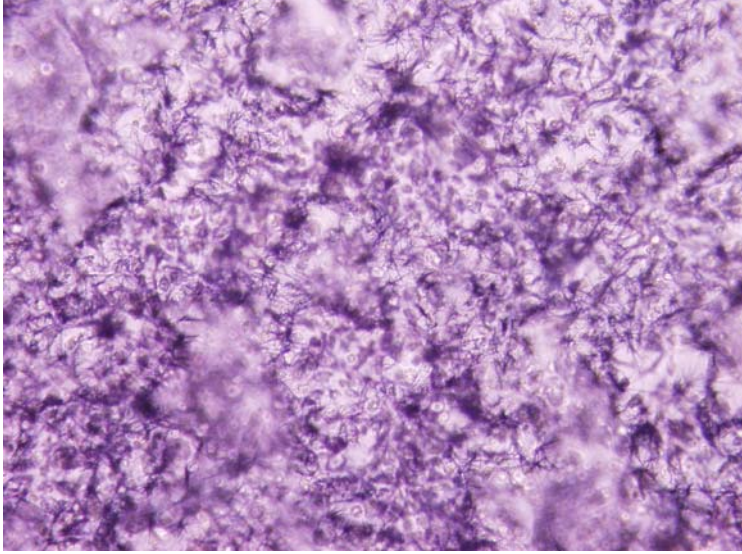
Nerium oleander bitkisinin yaprak ve çiçeğinden elde edilen sulu ve etanollü ekstraktları ile muamele edilen MCF-7 hücre kültürünün 24 saatlik inkübasyonundan sonra, materyal metot bölümünde belirtilen konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonu her bir kuyucuktaki hücreler üzerine ilave edilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonucu hücrelerin MTT ile etkileşimi sonucu hücrelerde meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu mikroskopik olarak incelenmiş ve aşağıdaki şekillerde verilmiştir (Şekil 4.75- 4.98).



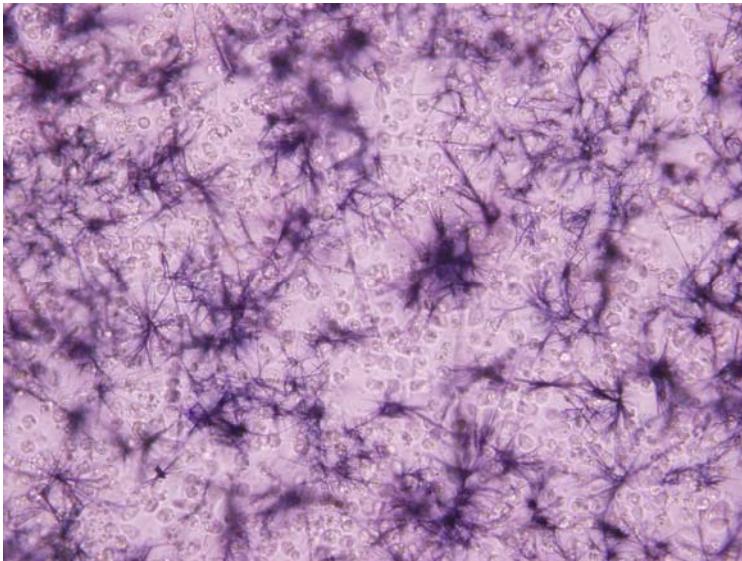
Şekil 4.75. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



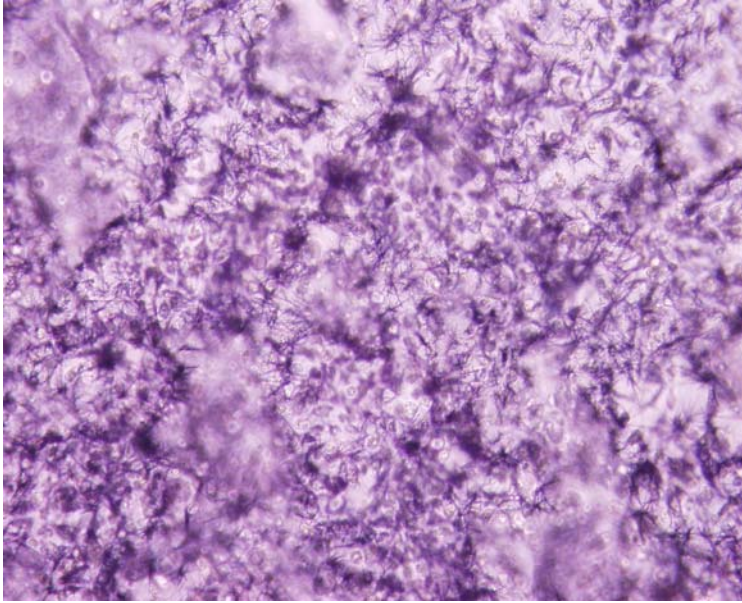
Şekil 4.76. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



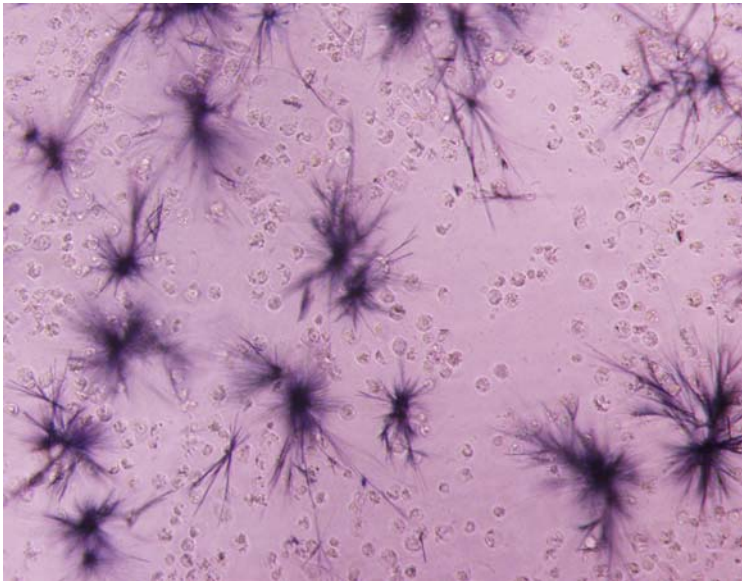
Şekil 4.77. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



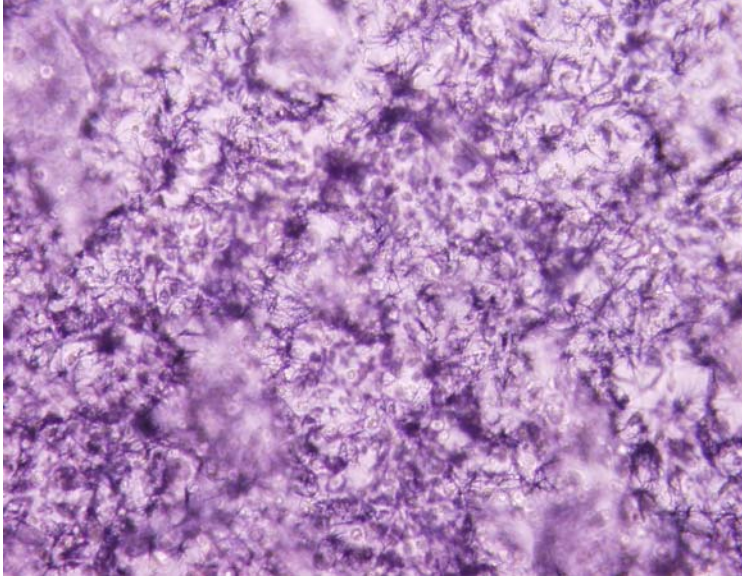
Şekil 4.78. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



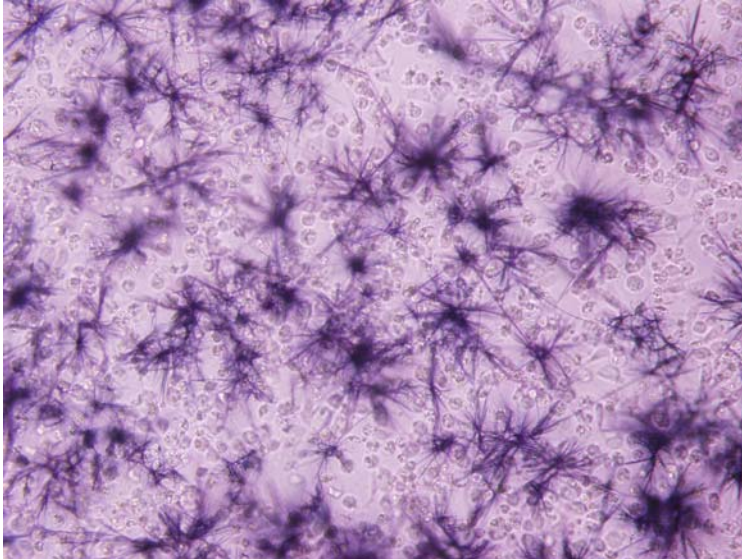
Şekil 4.79. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



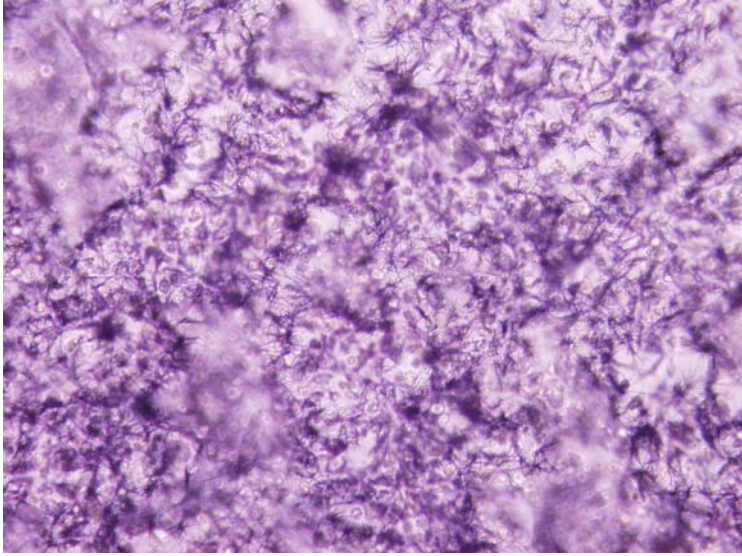
Şekil 4.80. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



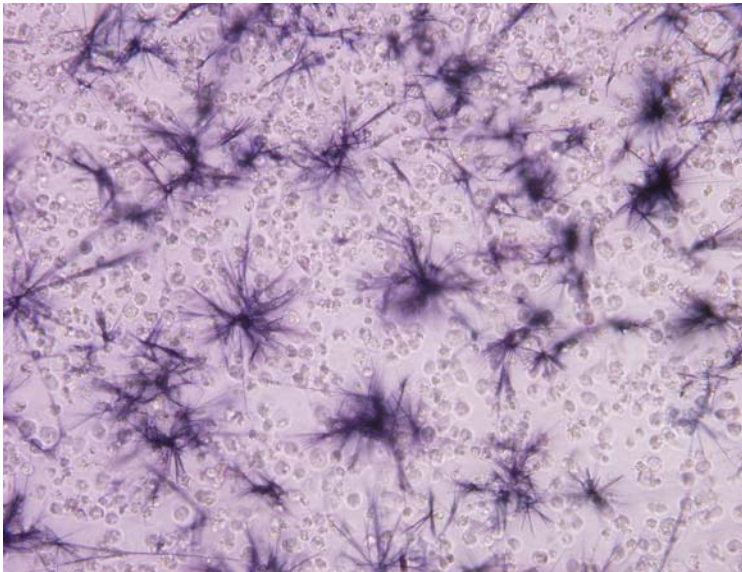
Şekil 4.81. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



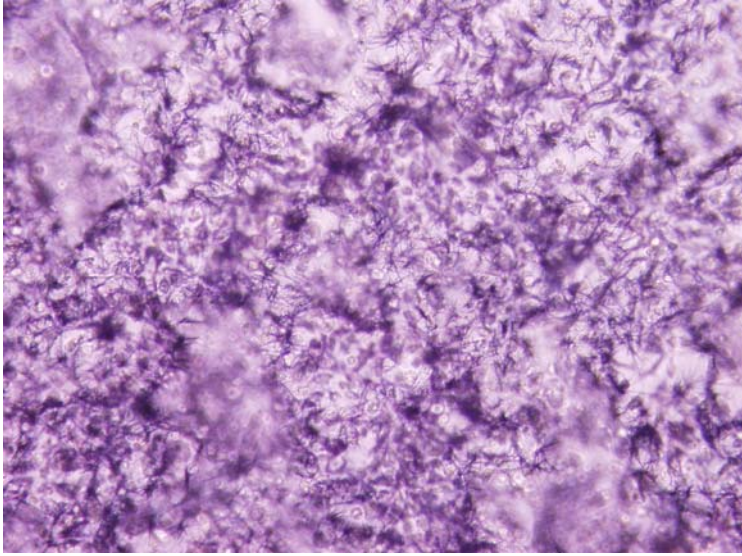
Şekil 4.82. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



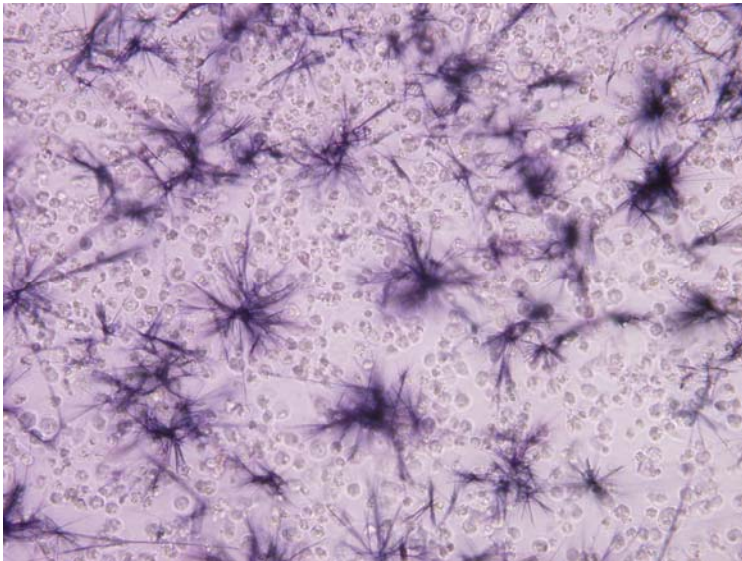
Şekil 4.83. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



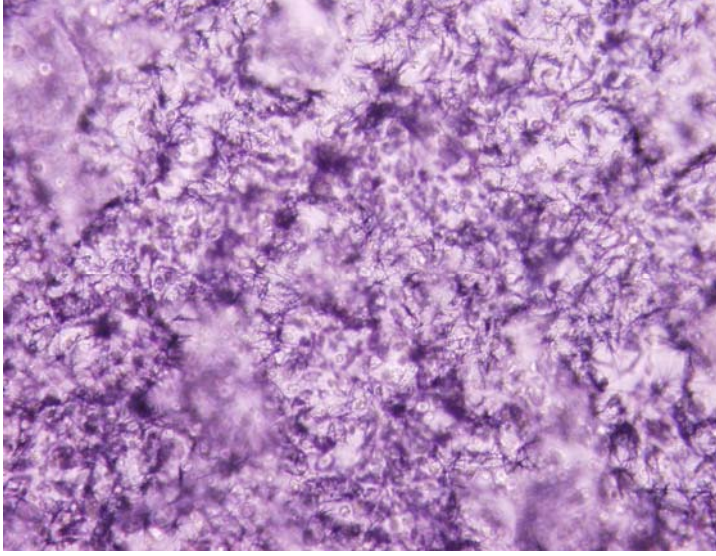
Şekil 4.84. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



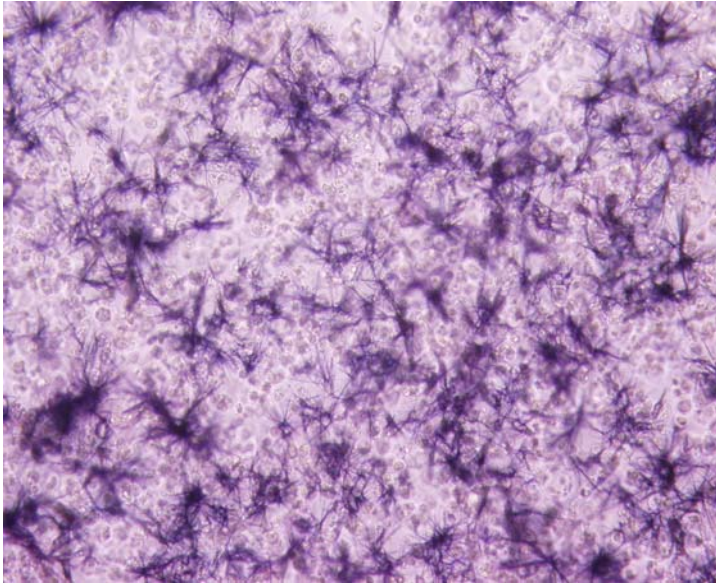
Şekil 4.85. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



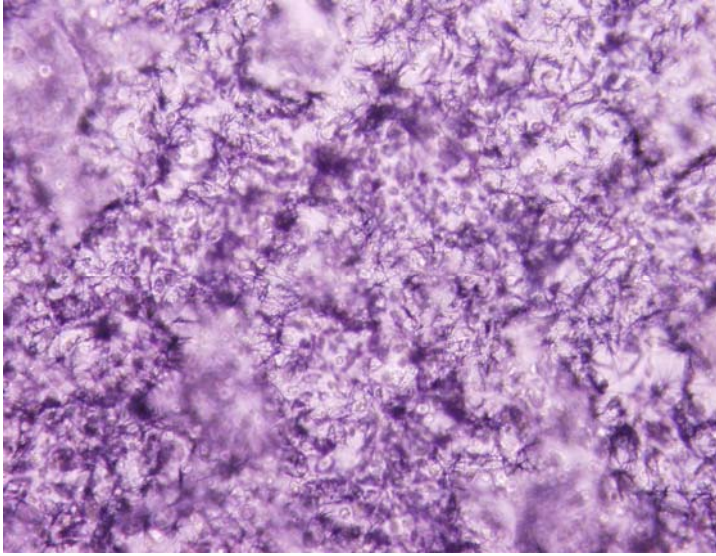
Şekil 4.86. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



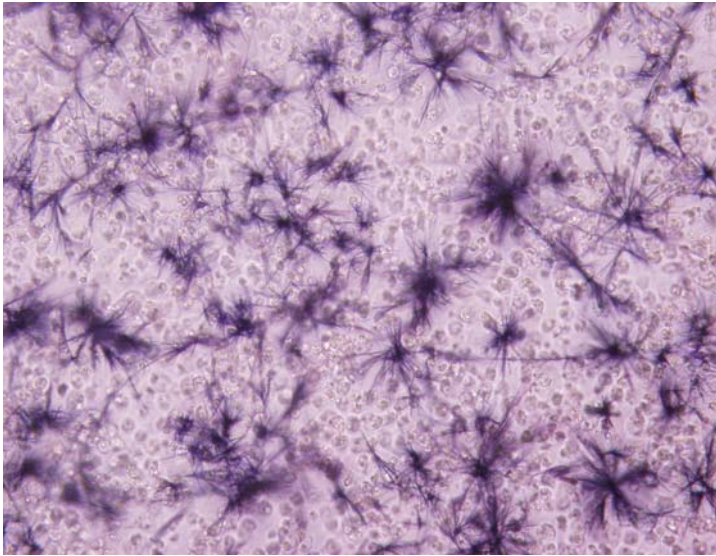
Şekil 4.87. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



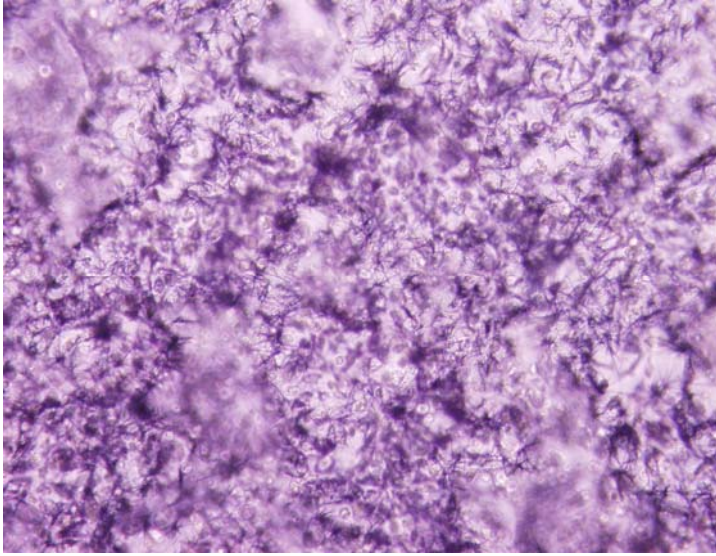
Şekil 4.88. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



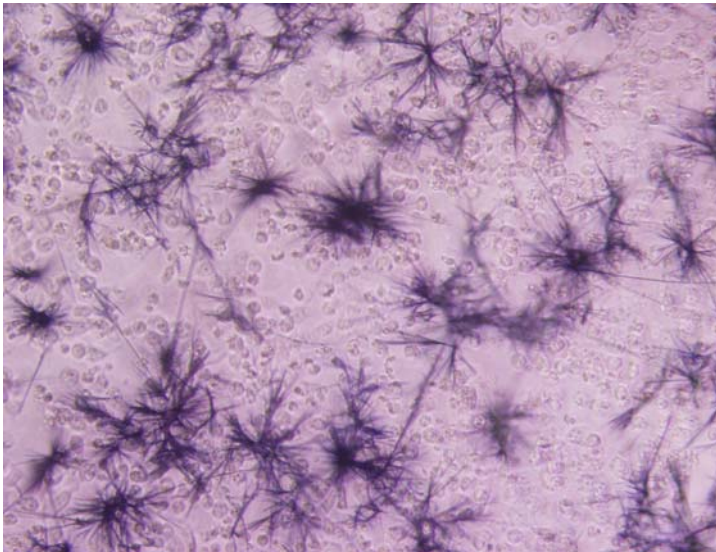
Şekil 4.89. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



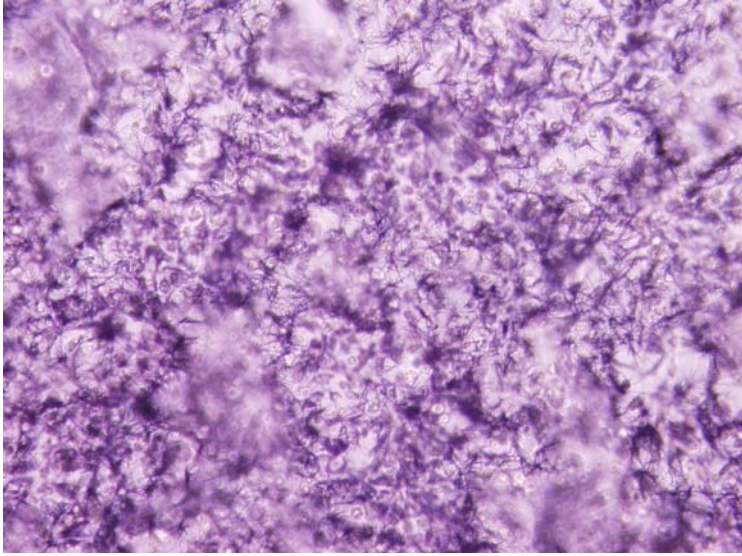
Şekil 4.90. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



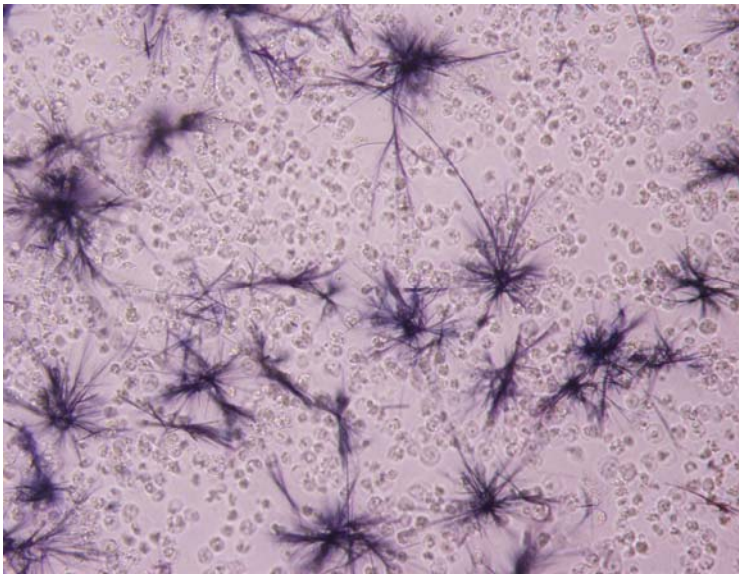
Şekil 4.91. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



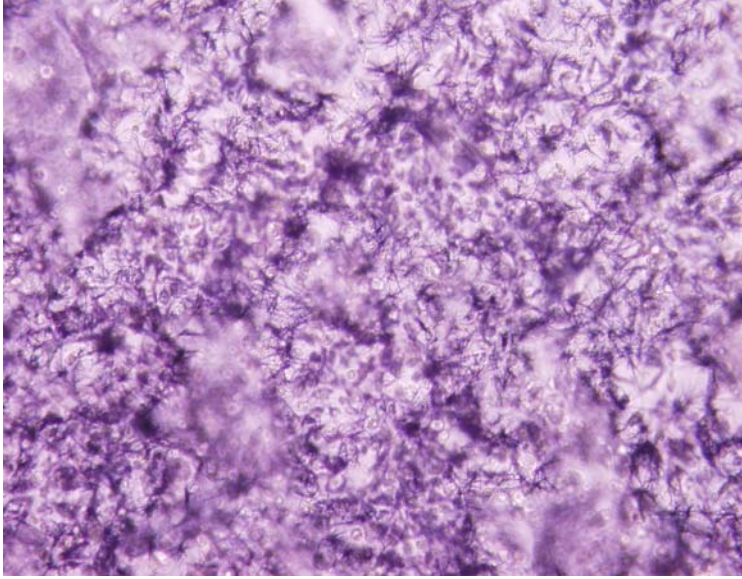
Şekil 4.92. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprak sulu ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



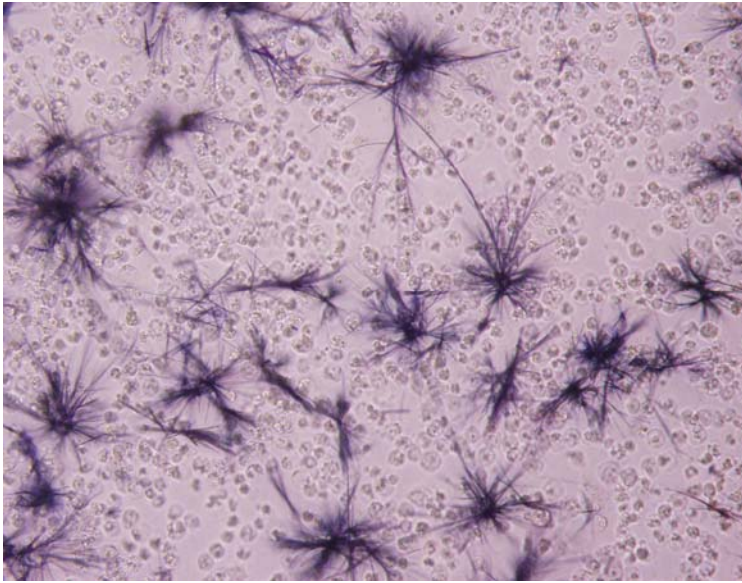
Şekil 4.93. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



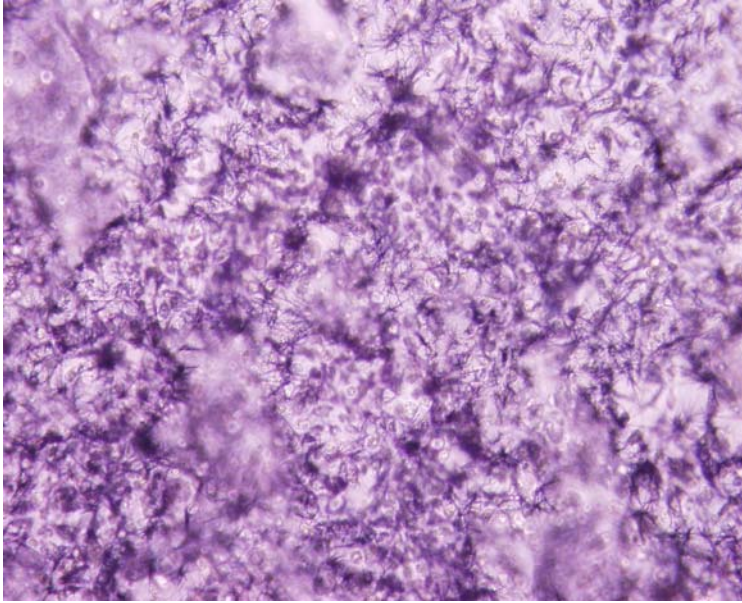
Şekil 4.94. Son konsantrasyon 12,5 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



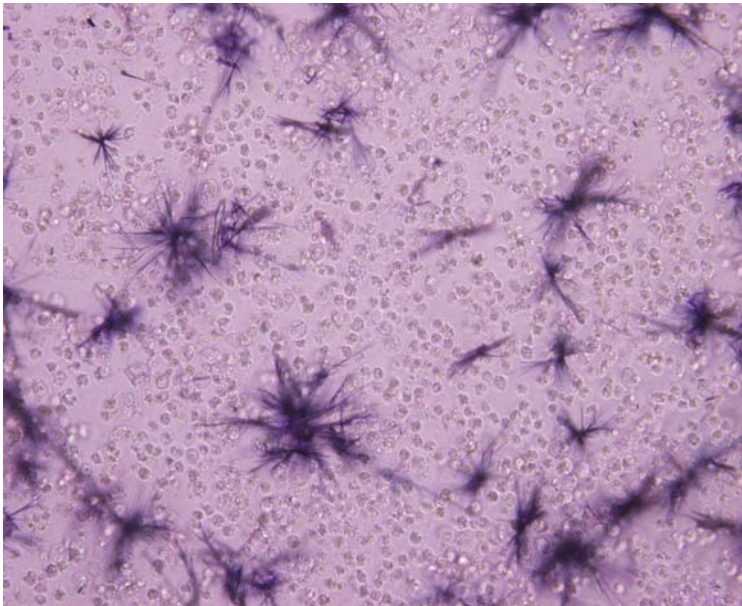
Şekil 4.95. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



Şekil 4.96. Son konsantrasyon 25 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



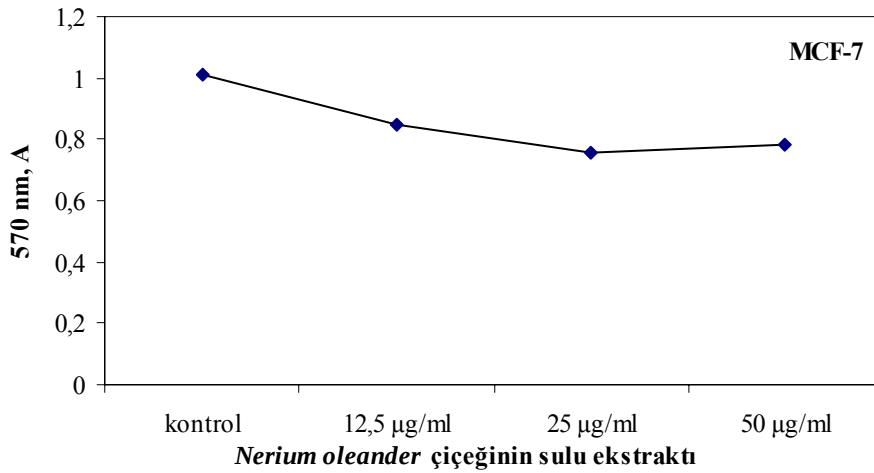
Şekil 4.97. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktının kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)



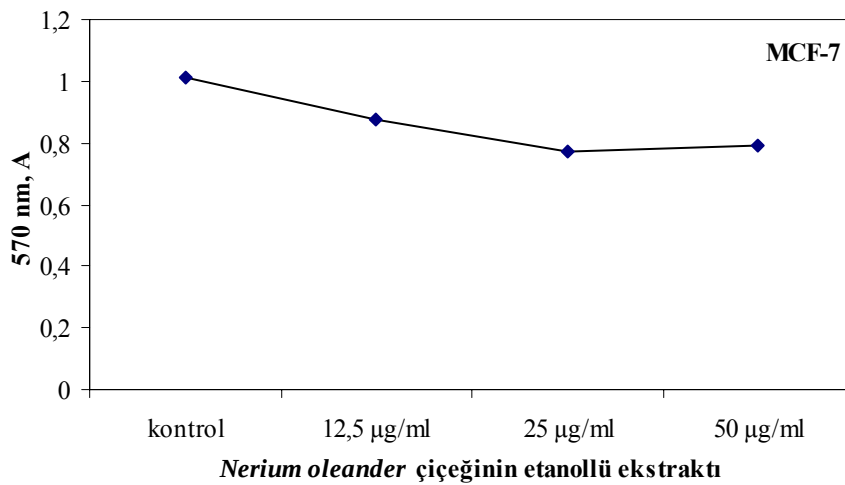
Şekil 4.98. Son konsantrasyon 50 µg/ml *Nerium oleander* yaprak etanollü ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin MTT ile etkileşimi sonucu oluşan formazan kristallerinin mikroskopik görüntüsü (20x)

4.7. *Nerium oleander* Ekstraktlarının MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Antikanserojen Etkisi

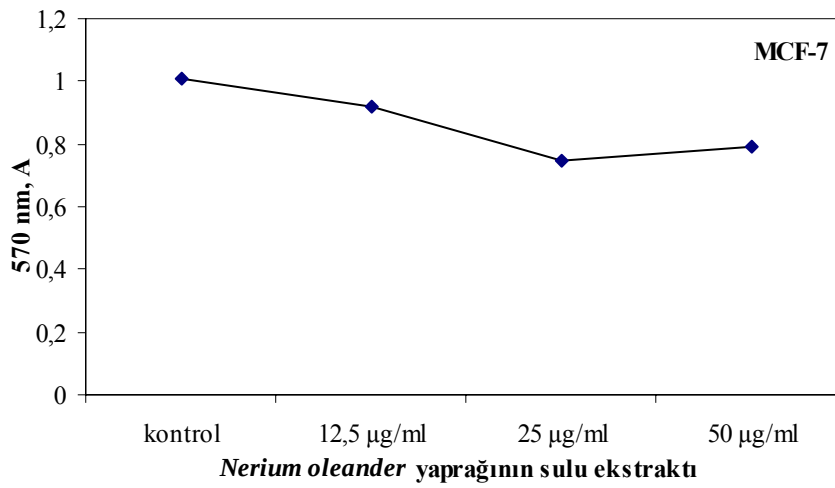
Mikroplakta her bir kuyucukta bulunan MCF-7 hücreleri üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristalleri çözülmüş ve çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimine göre absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda ELİSA cihazında ölçülmüştür. Alınan sonuçlardan her konsantrasyonun ortalaması alınmış ve *Nerium oleander* bitkisel ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkileri Şekil 4.99- 4.102’de verilmiştir.



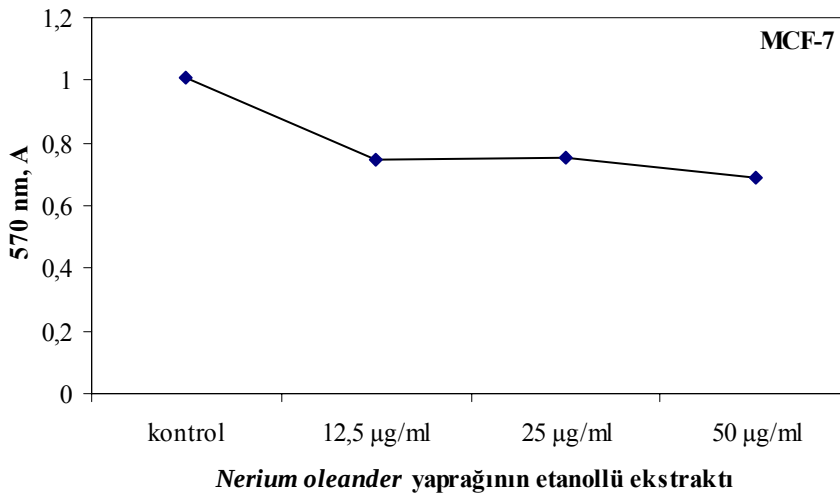
Şekil 4.99. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* çiçeğinin sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi



Şekil 4.100. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* çiçeğinin etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi



Şekil 4.101. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* yaprağının sulu ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi



Şekil 4.102. Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki *Nerium oleander* yaprağının etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan deneylerde vepesid ve *Nerium oleander*'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki antikanserojen etkisi mikropalaklarda incelenmiştir. Deneylerde vepesidin 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 1,00 µg/ml, 2,00 µg/ml, 4,00 µg/ml, 6,00 µg/ml, 10,00 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml olmak üzere 12 farklı konsantrasyonu ile *Nerium oleander* bitki ekstraktlarının 12,5 µg/ml, 25 µg/ml ve 50 µg/ml'lik 3 farklı konsantrasyonu kullanılmıştır.

Vepesidin farklı konsantrasyonlarının, hücreler üzerine ilave edilmesinden 24 saat sonra, Şekil 4.20-4.28 incelendiğinde vepesidin yüksek konsantrasyonlarında (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml) hücrelerin tamamen parçalandığı ve sayılmasının mümkün olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin renginde koyulaşma, parlaklıklarının kaybolması, hücre yuvarlaklaşması, granülasyon gibi çeşitli şekillerde gözlenen sitopatik değişiklikler de vepesidin 1-10µg/ml olduğu konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. (Şekil4.9-4.18). Vepesidin 0,01-0,05 µg/ml konsantrasyonlarında ise bu değişiklikler çok az gözlenmiştir (Şekil4.5-4.8).

Hücrelerin canlılığını tespit etmek amacıyla MTT yöntemi uygulandıktan sonra hücrelerde meydana gelen değişiklikler ve formazan kristal oluşumu morfolojik olarak incelenmiştir. Vepesidin 0,01-0,05µg/ml düşük konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre hücre canlılığında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil4.29-4.32). Vepesidin konsantrasyonu, 1,00 µg/ml' den 10 µg/ml ye kadar arttırıldığında artan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma görülmüştür (Şekil 4.33-4.42). En yüksek vepesid konsantrasyonlarında ise canlı hücre tespit edilmemiştir (Şekil 4.43-4.48). Aynı zamanda Şekil 4.50'de görüldüğü gibi, absorbands değerlerindeki azalmayla vepesidin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde vepesidin farklı kanser hücreleri üzerine antikanserojen etkisinin araştırıldığı görülmektedir [6,21,22,24-30]. Benzer şekilde vepesid ile yapılan çalışmamızda da ilacın farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerinde anti kanserojen etkisinin olduğunu göstermiştir ve bulgularımız literatürle uyumludur.

Çalışmamızda *Nerium oleander* bitkisinin çiçek ve yaprağından elde edilen etanollü ve sulu ekstraktlarının MCF-7 hücre kültürü üzerinde de belirgin bir sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür.

Nerium oleander bitkisinin çiçek ve yaprağından elde edilen sulu ve etanollü ekstraktların, artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre üzerine ilaveleri sonucu, hücrelerin parlaklıklarının kaybolması, hücrelerde deformasyon, yuvarlaklaşma ve granülasyon gibi çeşitli şekillerde gözlenen sitopatik değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.51-4.74). Bulgularımıza göre; yaprak ekstraktının sitotoksik etkisinin çiçek ekstraktının sitotoksik etkisinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Nerium oleander'in lösemi kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *Nerium oleander*'den elde edilen yaprak, kök ve gövde ekstraktlarının farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Her üç ekstraktın da belirgin antilösemik etkileri olduğu tespit edilmiş ve özellikle yaprak ve kök ekstraktlarının gövde ekstraktlarından daha toksik olduğu bulunmuştur [9]. Bu çalışmanın sonuçları da bizim bulgularımızla benzerdir.

Şekil 4.75-4.98' deki mikroskopik görüntüler ve Şekil 4.99-4.102' de verilen grafikler incelendiğinde, *Nerium oleander* bitkisinin hem yaprak hem de çiçeğinin sulu ve etanollü ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerine ilave edilmesinden sonra, artan konsantrasyonlarına bağlı olarak, MCF-7 hücrelerinin canlılığında azalmalar gözlenmiştir. Şekil 4.99-4.102' deki grafiklerdeki, kontrol grubuna göre absorban değerlerinin azalması da bunun bir göstergesidir. İncelemeler sonunda *Nerium oleander* bitkisinin yaprağının etanollü ekstraktının MCF-7 hücreleri üzerinde antikanserojen etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kanser tedavisinin güçlüğü ve tedavisinde karşılaşılan problemlerden dolayı yeni ilaçlar bulma ve araştırma çabaları gelişen teknolojiye paralel olarak hız kazanmıştır. Literatürde, *Nerium oleander* bitkisi ve vepesid ile MCF-7 hücreleri üzerinde pek fazla çalışmaya rastlanılmamıştır. *Nerium oleander* ekstraktlarının ve vepesidin, çalışmamızda kullanılan MCF-7 hücre kültürü üzerindeki sitotoksik etkileri yapılan deneyler sonucu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızın bulguları son derece önemlidir.

Nerium oleander ekstraktlarının meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanserojenik etkisi ile vepesidin aynı hücreler üzerindeki etkisi kıyaslandığında; morfolojik olarak benzer bulgular elde edilmiştir.

Bizim çalışmamız *Nerium oleander* ekstraktlarının MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini göstermek açısından özgün bir çalışmadır. Bu nedenle ülkemizde yetişmekte olan *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen ekstraktların ileride meme kanserine karşı antikanserojen ilaç yapımında kullanılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz. Ancak daha ayrıntılı *in vitro* biyokimyasal ve moleküler çalışmalar yapıldıktan sonra klinik uygulamalar için umut doğabilir. Bu konu ile ilgili araştırmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Kanser nedir?
www.cancervic.org.au/cancer1/multilingualInformation/pdfs/turkish/CancerWhatIs.pdf
- [2] Sağlıklı Bilgiler-30: Meme Kanseri, www.mesahastanesi.com.tr
- [3] SEZGİN, V.C., Meme Kanseri Hücre Hattı MCF-7 Üzerinde Arsenic Trioksitin Sitotoksitesi ve Diğer Kemoterapötik Ajanlarla Etkileşimi, Ege Üniversitesi, Onkoloji Uzmanlık Tezi, SF. 4,5, 2001
- [4] ÖKTEM, G., MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Doksorubisin ve Dositakselin Sitotoksitesi ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Ekspresyonu Üzerine Etkileri, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, SF. 1-5, 2002
- [5] MORK, C.N., FALLER, D.V., SPANJAARD, R.A., Loss of putative tumor suppressor EI24/PIG8 confers resistance to etoposide, FEBS Letters, 581:5440-5444, 2007
- [6] VETOSHKINA, T.V., DUBSKAYA, T.Y., FOMINA, T.I., ERMOLAEVA, L.A., GOLDBERG, V.E., Toxic effect of vepesid on morphology and function of the rat liver, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 143: 21-23, 2007
- [7] BOROVSKEYA, T.G., GOLDBERG, V.E., SHCHEMEROVA, Y.A., PEROVA, A.V., TIMINA, E.A. AND PAKHOMOVA, A.V., Evaluation of the progeny of rats treated with topoisomerase II inhibitor vepesid, Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 141(5): 515-518, 2006
- [8] KORKMAZ, S., Paklitaksel, Kersetin ve Berberinin, A549, HeLa, HT-29, MCF-7 ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, SF. 1,2, 2002

- [9] TURAN, N., *Nerium oleander* Bitkisinin, Kök, Yaprak ve Gövde Ekstrelerinin Lösemi Hücrelerine Sitotoksik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, SF. 6-9, 2003
- [10] LEE, K., Anticancer drug design based on plant-derived natural products, *Journal of Biomedical Science*, 6: 236-250, 1999
- [11] EL-SHAZLY, M.M., EL-ZAYAT, E.M., HERMERSDÖRFER, H., Insecticidal activity, mammalian cytotoxicity and mutagenicity of an ethanolic extract from *Nerium oleander* (Apocynaceae), *Ann. Appl. Biol.* 136: 153-157, 2000
- [12] ZHAO, Q., LI, B., WEBER, N., LOU, Y., PROKSCH, P., Estrogen-like effects of ethanol extracts from several Chinese legumens on MCF-7 cell, 221: 828-833, 2005
- [13] HOSTANSKA, K., NISSLEIN, T., FREUDENSTEIN, J., REICHLING, J., AND SALLER, R., *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor- positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis, 84: 151-160, 2004
- [14] EINBOND, L.S., SHIMIZU, M., XIAO, D., NUNTANAKORN, P., LIM, J.T.E., SUZUI, M., SETER, C., PERTEL, T., KENNELLY, J.E., KORONENBERG, F., AND WEINSTEIN, I.B., Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells, 83: 221-231, 2004
- [15] SHARMA, G., TYAGI, K.A., SINGH R.P., CHAN, D.C.F., AGARWALL, RAJESH, Synergistic anticancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast cancer cells, 85: 1-12, 2004
- [16] PECORINO, L., *Molecular biology of cancer*, Oxford University Press, 2005
- [17] WEINBERG, R.A., *The biology of cancer*, Garland Science, 2007
- [18] DEMİRELLİ, F.H, Kanserin moleküler genetik temelleri, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, no: 37: 9-15, 2003
- [19] LOWITZ, B.B, CASCIATO, D.A, *Medical oncology & principles of cancer biology*, Kanser biyolojisi ve onkogenler, Lippincott Williams & Wilkins pres, 2004

- [20] ÖZTÜRK, F., Apoptoz, İnönü Üniversitesi Tıp fakültesi Dergisi, 143-148, 2002
- [21] ÖKTEM, S., ÖZHAN, M.H., ÖZOL, D., Apoptozun önemi, Toraks Dergisi, 91-95, 2001
- [22] GÜMÜŞDERELİOĞLU, M., ASLANKARAOĞLU, E., Programlanmış hücre ölümü, apoptoz, Bilim ve Teknik, 66-67, 2004
- [23] ÜNAL.H, Meme kanserinin tanı ve tedavisinin tarihsel gelişimi, İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi, no: 54: 9-13, 2006
- [24] JAMAL, A., American Cancer Society Inc., Surveillance Research., CA Cancer J Clin, 56: 108-130, 2006
- [25] DONEGAN, V.L., WINCHESTER, D.J., WINCHESTER, D.P., HUDIS, C.A., NORTON L., History of breast cancer in breast cancer, Editors D.C. Decker Inc. Ontario, p.1-14, 2006
- [26] BEENKEN, S.W., WANGER, F.B., BLAND, K.I., History of the therapy of breast cancer in the breast, KI bland and EM Copeland III. Saunders-Elseiver, St. Louis, p.3-18, 2004
- [27] GÜRAN, Ş., Kanserden korunma, Gülhane Tıp Dergisi, 2005, 47: 324-326
- [28] FIEGL, M., BUCHNER, T., HIDDEMANN, W., BRAESS, J., A phase I-II study of oral etoposide and idarubicin in elderly patients with high risk acute myeloid leukemias unable to undergo intensive chemotherapy, Ann Hematol, 84: 227-231, 2005
- [29] SCHROEDER, P.E., HOFLAND, K.F., JENSEN, P.B., SEHESTED, M., LANGER, S.W., HASINOFF, B.B., Pharmacokinetics of etoposide in cancer patients treated with high dose etoposide and with dexrazoxane (ICRF-187) as a rescue agent, Cancer Chmother Pharmacol, 53: 91-93, 2004
- [30] ALLAHVERDİYEV, A., DURAN, N., UYANIK, Ö., Investigation of the antiviral effect of vepesid on HSV type 2, Turk J Med Sci, 32: 7-12, 2002
- [31] CORY, A.H. AND CORY, J.G., Comparison of the properties of human breast cancer cells: MCF-7 and MCF-7 cells selected for resistance to etoposide, Advan. Enzyme Regul., 41: 177-188, 2001

- [32] OSAKI A., OHI Y., HIRAI T., TOGE T., A combination therapy with mitomycin-C, etoposide, doxifluridine and medroxyprogesterone acetate as second-line therapy for advanced breast cancer, *European Journal of Cancer*, 34: 16,1998
- [33] MARTIN M., CASADO A., LLUCH, A., ADROVER, E., RUBIO, E., CONDE J., Preliminary result of a phase II trial of chronic oral etoposide in breast cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 19: 47-52, 1993
- [34] FIELDS, K.K., PERKINS, J.F., HIEMENZ, J.W., ZORSKY, P.E., JANSSEN, W.E., KRONISH, L.E., MACHAK, M.C., ELFENBEIN, G.J., Intensive dose ifosfamide carboplatin and etoposide followed by autologous stem cell rescue, *Surgical Oncology*, 2: 87-95, 1993
- [35] COCCONI, G., TONATO, M., COSTANZO, F., BISAGNI, G., BELSANTI, V., BUZZI, F., CECI, G., Platinum and etoposide in chemotherapy refractory metastatic breast cancer, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 22: 761-764, 1986
- [36] PAPROTA, K., FURMANIK, F., KARZCMAREK- BOROWSKA, B., Surgery following neoadjuvant chemotherapy (cisplatin vepesid) in locally advanced nonsmall cell lung cancer, *European Jurnal of Cancer*, 32: 10, 1996
- [37] KLAMT, F., PASSOS, D.T., CASTRO, M.A., GELAIN, D.P., GRIVICICH, I., MOREIRA, J.C., Inhibition of MDRI expression by retinol treatment increases sensitivity to etoposide (VP-16) in human neoplastic cell line, *Toxicology in vitro*, 22: 873-877, 2008
- [38] UYANIK, Ö., Herpes Enfeksiyonlarında Kullanılan Anti Herpetic İlaçlarla Bitkisel Ekstraktların Antiviral Etkilerinin Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, SF. 10-12, 2000
- [39] <http://www.ilacrehberi.com/cgi-bin>, ilaç prospektüsü bilgileri
- [40] BAYTOP, T., BAYTOP, A., MAT, A., SUN, S., Türkiye'de zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3560, ISBN: 975-404-111-3, 1989
- [41] BAYTOP, T, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, 1994
- [42] BAYTOP, T., Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, 1999

- [43] BAYTOP, A., Farmasotik Botanik Ders Kitabı, Eczacılık Fakültesi yayın no: 58, İstanbul, 1996
- [44] TANKER, N., KOYUNCU, M., COŞKUN, M., Farmasötik Botanik, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, no: 93, Ankara, 2007
- [45] FUKUE, C. AND ARAO, T., Drug and Poisons in Humans, II, stage: II.6.7: Oleander toxins, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2005
- [46] WIART, C., Ethnopharmacologic of Medicinal Plants: stage 3: Plant for Chemotherapy of Neoplastic Diseases, Humana Press Inc., Totowa, Nj, 2007
- [47] American Cancer Society's Guide to Complementary and Alternative Cancer Methods, 2001, ISBN 0-944235-29-8
- [48] PATHAK, S., MULTANI, A.S., NARAYAN, S., KUMAR, V., NEWMAN, R.A., Anvirzel, an extract of Nerium oleander, induces cell death in human but non murine cancer cell, Anti Cancer Drugs, 11: 455-463, 2000
- [49] NEWMAN, R.A., CISNERO, A., FELIX., VIJESWARAPU, M., LIN, Y., YANNG, P., AZADI, P., Composition and Preliminary Pharmacology Studies with Anvirzel, Journal of Herbal Pharmacotherapy, 1(3) , 2001
- [50] HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., HYDE, K.D., CORKE, H., SUN, M., Endophytic fungus from Nerium oleander L (Apocynaceae): Main constituent and antioxidant activity, World J microbial Biotechnol, 23: 1253-1263, 2007
- [51] BARBOSA, R.R., FONTENELE-NETO, J.D., SOTO-BLANCO, B., Toxicity in goats caused, Research in Veterinary Science, impress, 2007
- [52] SREENIVASAN, Y., RAFHAVENDRA, P.B., MANNA, S.K., Oleandrin-Mediated expression of fas potentiates apoptosis in tumor cells, Journal of Clinical Immunology, 26 (4): 308-310, 2006
- [53] PIETSCH, J., OERTEL, R., TRAUTMAN, S., SCHULZ, K., KOPP, B., DRESSLER, J., A non fatal oleander poisoning, Int J Legal Med, 119: 236-240, 2005
- [54] AFAG, F., SALEEM, M., AZIZ, M.H., MUKHTAR, H., Inhibition of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by olenadrin, Toxicology and applied Pharmacology, 195: 361-369, 2004

- [55] ERDEMOĞLU, N., KÜPELİ, E., YEŞİLADA, E., Antiinflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 89: 123-129, 2003
- [56] SREENIVASAN, Y., SARKAR, A., MANNA, S.K., Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kB and activator protein 1 and potentiates apoptosis induced by ceramide, *Biochemical Pharmacology*, 66: 2223-2239, 2003
- [57] SMITH, J.A., MADDEN, T., VIJJSWARAPU, M., NEWMAN, R.A., Inhibition of export of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin, *Biochemical Pharmacology*, 62: 469-472, 2001
- [58] MEKHAIL, T., KELLACKEY, C., HUTSON, T., OLENCKI, T., BUDD, T., PEEREBOOM, D., DREICER, R., ELSON, P., GANAPATHI, R., BUKOWSKI, R., Phase 1 study of anvirzel in patients with advanced solid tumors. *American society of clinical oncology*, 2001.
- [59] WANG, X, PLOMLEY, J.B., NEWMAN, R.A., CISNEROS, A., LC/MS/MS analysis of an oleander extract for cancer treatment, *Anal. Chem.*, 72: 3547-3552, 2000
- [60] MC CONKEY, DJ., LIN, Y., NUTT LK., OZEL, H.Z., NEWMAN R.A., Cardiac glycosides stimulate Ca^{+2} increases and apoptosis in androgen independent, Metastatic human prostate adenocarcinoma cells, *Cancer Research*, 60 (14): 3807-3812, 2000
- [61] MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol Method* 65:55-63), 1983

ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe Deniz Karaca 1980 yılında Sakarya’da doğdu. 1991 yılında Sakarya Atatürk İlköğretim Okulunu, 1998 yılında Ankara Çankaya Atatürk Anadolu Lisesini ve 2006 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü bitirdi. Aynı yıl Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.