T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

ENDEMİK *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. & HELDR. BİTKİSİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI

Hazırlayan
Safa EMİNOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

II. Danışman

Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA

Yüksek Lisans Tezi

Mayıs 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

ENDEMİK *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. & HELDR. BİTKİSİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRMASI

Hazırlayan
Safa EMİNOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

II. Danışman

Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA

Yüksek Lisans Tezi

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-202312905 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Mayıs 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Safa EMİNOĞLU

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Endemik *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr. Bitkisinin Servikal Kanser Hücre Hattında Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Safa EMİNOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN

Ana Bilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

KABUL ve ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN danışmanlığında Safa EMİNOĞLU tarafından hazırlanan **"Endemik *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr. Bitkisinin Servikal Kanser Hücre Hattında Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

…. /…../ 2024

JÜRİ	**İmza**
Danışman : Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN	.....
Üye : Doç. Dr. Gökhan ÜNAL	.....
Üye : Dr. Öğr. Hatice BEKCİ	.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

…. /…../ 2024

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ders döneminde, tez konumun tayininde, yön verilmesinde, tüm süreçte başından bitine kadar hep yanımda olan, sabırla ve sevgiyle bilgi, beceri ve tecrübe kazandıran, geleceğe umut veren, başarısı ile her zaman örnek aldığım, çok sevdiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN'a,

Çalışmamda yer alan bitkisinin seçilmesi ve ekstrelerin hazırlaması dahil olmak üzere tezimin botanik kısmının tamamlamasında değerli katkılarını yadsıyamayacağım ikinci danışman hocam Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA'ya

Tez çalışmamda kullandığım bitkinin toplamasında yardım eden sayın Prof. Dr. Osman TUGAY'a,

Tez çalışmam boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, deneysel çalışmalarımda hep yardımcı olan Arş. Gör. Nuh Mehmet BOZKURT'a,

Tez çalışmamı TYL-202312905 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Laboratuvarda beraber çalıştığım ve tez yazım aşamasında birbirimize desteklerimizi sunduğumuz, her zaman yanımda olan arkadaşım Ecz. Rümeysa KORUBAŞI'ya

Yüksek Lisans dönemim süresince destekleyen ve mesleki tecrübelerinden yararlandığım çok sevdiğim değerli Ecz. Nurgil Derin'e,

Hayatım boyunca attığım her adımda beni destekleyen, yolumu aydınlatan, bana her defasında kucak açan, sevmeyi öğreten ve gücüme güç katan canım annem Merve Baybara'ya,

Yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösteren, hayatımın tüm iniş çıkışlarında yanımda duran, bana umut, sevgi, huzur, cesaret veren ve bana katlanan hayat arkadaşım eşim Hafız Eminoğlu'na,

Çocuklarım Hamza Eminoğlu ve Ömer Eminoğlu'na,

Bütün kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

Safa EMİNOĞLU

Kayseri, Mayıs 2024

ENDEMİK *CENTAUREA LYCAONİCA* BOİSS. & HELDR. BİTKİSİNİN SERVİKAL KANSER HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Safa EMİNOĞLU

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eczacılık Farmakoloji Ana Bilim Dalı,
Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2024

Danışmanlar: Doç. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN; Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA

ÖZET

Dünyada kadınlar arasında en sık görülen dördüncü kanser türü olan serviks kanseri yüksek morbidite ve mortalite düzeyi ile önemli bir halk sorunu olmaya devam etmektedir. Dünyada geniş bir dağılım gösteren Asteraceae familyası üyelerinden *Centaurea* cinsi Türkiye'de birçok endemik türle varlığını göstermektedir. Literatürde farklı *Centaurea* türlerine ait antimikrobiyal ve antioksidan gibi farklı aktivitelere ait etki mekanizmalarına ilişkin çalışmalar bulunmasına rağmen türlerin, kanser hücreleri üzerindeki etkileri konusunda çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde İç Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak yetişen *Centaurea lycaonica* türünün toprak üstü kısmından elde edilen metanol (CHM) ve diklorometan (CHD) ekstrelerinin, insan serviks karsinoma kökenli HeLa hücre hattı üzerine, potansiyel sitotoksik etkisi Sulforhodamin B (SRB) canlılılık testi ve xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz sistemi (GZHA) ile ve apoptotik etkisi, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin tayini ELISA kitleri kullanılarak araştırıldı. Sonuç olarak, CHD ve CHM'nin HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi SRB testi kullanarak IC_{50} değerleri sırayla 39,27 µg/ml, 516,50 µg/ml ve xCELLigence GZHA sistemi kullanarak CHD'nin IC_{50} değeri 60,89 µg/ml olarak hesaplandı. CHD için 30, 100 µg/ml ve CHM için 240 µg/ml konsantrasyonlarda, HeLa hücre hattında Kaspaz-3 ile Kaspaz-9 aktivitesinde ve Bax/Bcl-2 oranında artış izlendi. Hesaplanan IC_{50} değerleri, doksorubisin IC_{50} değeri ile karşılaştırıldığında kabul edilebilir sınırlarda olduğu ve belirtilen konsantrasyonların apoptotik hücre ölümünü belirgin olarak indüklediği ve CHD ve CHM sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edildi. Çalışmanın, *Centaurea* L. türlerinin araştırılması, etkili bileşenlerinin belirlenmesi, etki mekanizmalarının aydınlatılması gibi ileri düzeydeki çalışmaları teşvik edeceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz; *Centaurea lycaonica*; HeLa; Sitotoksisite, xCELLigence**.**

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF ENDEMIC *CENTAUREA LYCAONİCA* BOISS. & HELDR. ON CERVICAL CANCER CELL LINE.

Safa EMİNOĞLU

Erciyes University Institute of Health Sciences

Department of Pharmacology Pharmacology,

Master's Thesis, May 2024

Advisors: Assoc. Dr. Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN; Assoc. Dr. Leyla PASHAYEVA

ABSTRACT

Cervical cancer, the fourth most common cancer among women worldwide, continues to pose a significant public health challenge due to its notable rates of morbidity and mortality. *Centaurea* genus, part of Asteraceae family, exhibits a broad global distribution. Although there are studies on antimicrobial and antioxidant activities, there are few studies on the effects of the species on cancer cells. In this study, the cytotoxic effects was assessed using Sulforhodamin B (SRB) viability assay and xCELLigence Real-Time Cell analyzing (RTCA) system, and the apoptotic effects, measured by caspase-3, caspase-9, Bax and Bcl-2 protein activity detection ELISA kits of methanol (CHM) and dichloromethane (CHD) extracts obtained from the aerial part of Turkish endemic *Centaurea lycaonica* species were investigated on human cervical carcinoma-derived HeLa cell line. As a result, the IC_{50} value of CHD and CHM on HeLa cells was calculated repectively as 39.27 µg/mL, 516.50 µg/mL using SRB test. Using the xCELLigence RTCA system, the IC_{50} value of CHD was calculated as 60.89 µg/mL. An increase in caspase-3 and caspase-9 activity and Bax/Bcl-2 ratio was observed in HeLa cell line at concentrations of 30, 100 µg/mL for CHD and 240 µg/mL for CHM. The calculated IC_{50} values were found to be within acceptable limits when compared to Doxorubicin IC_{50} value, and the selected concentrations significantly induced apoptotic cell death and had cytotoxic effects. It is believed that this study will encourage further advanced research on *Centaurea* L. species, such as the exploration of its mechanism of action and the identification of the plant's effective compound.

Key words: Apoptosis; *Centaurea lycaonica*; Cytotoxicity; HeLa, xCELLigence**.**

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK……
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ii
KABUL ve ONAY SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vi
İÇİNDEKİLER vii
KISALTMALAR ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
TABLOLAR LİSTESİ xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. KANSER GENEL BİLGİ VE TARİHÇE 4
2.2. KANSER GELİŞİMİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER 5
2.2.1. Normal ve Kanser Hücre Döngüsünun Farkları 6
2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları 7
2.3. SERVİKAL KANSERİ 9
2.3.1. Servikal Kanser Yapısı 9
2.3.2. Servikal Kanserin Nedenleri 10
2.3.3. Servikal Kanserin Evreleri 10
2.3.4. Servikal Kanserin Tedavi Yöntemleri 11
2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE HELA HÜCRE HATTI 12
2.5. ANTİKANSER ETKİ GÖSTEREN BİTKİSEL KAYNAKLI ÜRÜNLER 13
2.6. ASTERACEA AİLESİ 14
2.6.1. *Centaurea* L. Cinsi 14
2.6.2. *Centaurea* Cinsine Ait Olan Türlerin Farmakolojik Etkileri 15
2.6.3. *Centaurea lycaonica* 16
3. GEREÇ ve YÖNTEM 17
3.1. KULLANILAN GEREÇLER VE CİHAZLAR 17
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER 18

3.3. BİTKİ EKSTRASYONU HAZIRLAMA 19
3.4. HELA HÜCRE HATTI HAZIRLAMA 19
3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ 20
3.5.1. Hücrelerin Pasaj İşlemi 20
3.5.2. Hücrelerin Ekimi 20
3.5.3. Hücre Dondurması 21
3.6. HELA HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ DENEYLERİ 21
3.6.1. SRB Canlılık Testi 21
3.6.2. xCELLigence RTCA SP Sistemi (GZHA) 22
3.6.3. Deney Gruplarının Belirlemesi 23
3.6.4. Protein İzolasyonu 24
3.6.5. BCA ile Protein Miktar Tayini 25
3.6.6. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 Proteinlerinin Tayin Kitleri 26
4. BULGULAR 28
4.1. SRB HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI 28
4.2. GZHA SİSTEMİ BULGULARI 30
4.3. BCA İLE PROTEİN MİKTAR TAYİN BULGULARI 33
4.4. KASPAZ-3 TAYİNİ BULGULARI 33
4.5. KASPAZ-9 TAYİNİ BULGULARI 34
4.6. BAX/BCL-2 TAYİNİ BULGULARI 35
5. TARTIŞMA 37
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 45
7. KAYNAKLAR 48
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR

BCA : Bikinkoninik asit

CHD : *Centaurea lycaonica* herba diklorometan ekstresi

CHM : *Centaurea lycaonica* herba metanol ekstresi

DMEM : Dulbecco's Modifiye Eagle Medyumu

DMSO : Dimetil Sülfoksit

Dox : Doksorubisin

FBS : Fetal sığır serumu

GZHA : Gerçek Zamanlı Hücre Analizör

HeLa : İnsan servikal adenokarsinom hücre

HPV : İnsan papilloma virüsü

IC_{50} : Hücrelerin yarısını öldüren madde miktarı

MTT : 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür

PBS : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

SRB : Sulforhodamin B testi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Servikal kanserin evreleri 11
Şekil 4.1. Dox'un HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri. 28
Şekil 4.2. CHD'nin HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri 40
Şekil 4.3. CHM'nin HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri 30
Şekil 4.4. xCELLigence GZHA sistemi ile Dox, CHD ve CHM'nin HeLa üzerindeki konsantrasyon ve zamana bağlı 48 sa. etkisi 31
Şekil 4.5. HeLa üzerinde Kaspaz-3 aktivitesi kat değişimi 33
Şekil 4.6. HeLa üzerinde Kaspaz-9 aktivitesi kat değişim 34
Şekil 4.7. HeLa üzerinde Bax/Bcl-2 oranı. 35

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiyede jinokolojik kanser vaka sayısı ve görülme sıklığı..... 9
Tablo 2.2. Servikal kanserde tercih edilen tedavi teknikleri. 12
Tablo 4.1. Dox, CHD ve CHM'nin SRB ve xCELLigence GZHA sistemi ile belirlenen 48 sa. IC_{50} değerleri.....32
Tablo 4.2. CHD ve CHM'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9 kat değişimi ile Bax/Bcl-2 oranın değilşimi.....36

1. GİRİŞ ve AMAÇ

2022 verilerine göre kanser, dünya üzerinde 20 milyon yeni vaka ve 9.74 milyon ölüm ile artış göstermektedir (GLOBOCAN, 2022). 36 farklı türü bulunan kanser hastalığının erkeklerde kolorektal, karaciğer, akciğer, prostat ve mide kanseri; kadınlarda ise meme, servikal, kolorektal, akciğer ve tiroid kanseri şeklinde gözlendiği tespit edilmiştir (Khan ve ark., 2019). Jinekolojik kanserler arasında önemli bir yere sahip olan serviks kanseri, dünyada kadınlarda en sık görülen 4. kanser türüdür (GLOBOCAN, 2022). Serviks kanseri; yüksek riskli insan papillomavirüsü (HPV), sigara kullanımı, yüksek kilo, genetik faktörler, ilk cinsel ilişki yaşı, geçirilen doğum sayısı, çok eşli bir yaşam tarzının benimsenmiş olması gibi birçok faktöre bağlı gelişmektedir. Pek çok gelişmiş ülkede, morbidite ve mortaliteyi azaltmak amacıyla servikal kanser için bazı tarama testleri, etkin tanı yöntemleri ve tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Bununla birlikte, serviks kanserinde etkin tedavi yöntemi geliştirilmesi için çalışmalar devam ettirilmektedir (Bedell ve ark., 2020; Sherer ve ark., 1953). Servikal kanserin ileri evrelerine ulaşıldığında, kemoterapi ile radyasyonla birlikte en etkili tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Ancak kemoterapi, akut toksisite belirtileri ve geç kronik toksisite belirtilerini içeren çok sayıda ciddi yan etkiyle ilişkilidir (Schirrmacher, 2018). Daha az yan etkiye sahip ilaç bulabilmek amacıyla yapılan birçok çalışma vardır (Ahmed ve Kamel, 2014; Alper ve Güneş, 2019; Artun ve ark., 2016; Bakr ve ark., 2016). Son zamanlarda, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların %60'ı doğal kaynaklardan elde edilmektedir. *Centaurea* cinsi, geniş dağılım gösteren bitki cinslerinden, Asteraceae familyasının bir üyesidir. *Centaurea*'nın bazı türleri halk arasında, sıtma, soğuk algınlığı, ishal, ülser, sindirim kanalları iltihaplanması ve daha birçok çeşitli hastalıkların tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır (Arif ve ark., 2004). Literatürde, farklı *Centaurea* türlerine ait ekstreler ve bileşiklerin etki

mekanizmalarına ilişkin birçok çalışma örnek bulunmasına rağmen, *Centaurea* türlerinin kanser hücreleri üzerindeki etkileri konusunda çok fazla çalışma yapılmamıştır. (Gou ve ark., 2023; Treasure, 2005). *Centaurea* türlerinin halk hekimliğinde kullanılmasını sağlayan bu etkileri, yapısındaki ana sekonder metabolitler olan flavonoitler, lignan bileşikleri ve seskiterpen laktonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Seskiterpen laktonlar tek başlarına potansiyel bir antikanser ajan adayı olabilirler ancak bazı çalışmalar, bir bitki ekstresinden elde edilen tek bir maddenin kendi başına kullanılması yerine, tüm bitki ekstresinin kullanımlarının daha etkili olabileceğini öne sürmektedir. Bu kompleks kullanım, sinerjik etkilerin ortaya çıkmasına ve hedeflenen kanser hücrelerine karşı daha güçlü bir etki sağlanmasına yardımcı olabilir. Bu nedenle, bazı araştırmalar bitki ekstrelerinin tüm bileşenlerini içeren formülasyonların tercih edilmesini savunmaktadır. (Erel ve ark., 2007; Solowey ve ark., 2014).

Bu araştırmada, İç Anadolu Bölgesi'nde endemik olan *C. lycaonica* türünün toprak üstü kısımları toplandı ve kurutuldu, maserasyon yöntemiyle öncelikle CHD hazırlandı. Ardından, metanolle partisyon yöntemi kullanılarak CHM elde edildi. Bu ekstrelerin, insan servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, Sulforhodamin B (SRB) canlılık testi ve xCELLigence GZHA sistemi kullanılarak belirlendi. Ardından apoptotik hücre ölümü, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinleri aracılığıyla araştırıldı. Yukarıda belirtilen, literatür bilgileri göz önünde bulundurularak planladığımız tez çalışmasında, kanser hücre hattı olarak HeLa'nın seçilmesiyle aşağıdaki unsurların aydınlatılması hedeflenmiştir:

- *C. lycaonica* ekstrelerini HeLa hücrelerine uyguladıktan sonra kullanılacak SRB canlılık testi ve GZHA sistemi vasıtasıyla kanser hücre sayılarının azalması,
- CHD ve CHM ekstrelerinin HeLa hücre hattında zamana bağlı sitotoksik konsantrasyonlarının belirlenmesi,
- HeLa kanser hücrelerine ekstre uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonunun artması,
- HeLa kanser hücrelerine ekstre uygulamaları yapılan gruplarda kontrol grubuna kıyasla Bax/Bcl-2 oranın artması beklenmektedir.

Tez çalışmasının tamamlanmasıyla amaçlanan hedeflere ulaşılmaya çalışıldı. Böylelikle kansere karşı *C. lycaonica* kullanılmasının bitkisel ilaç geliştirme çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER GENEL BİLGİ VE TARİHÇE

Hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen karmaşık bir biyolojik hastalık olan kanser, her yıl milyonlarca kişiyi etkileyen önemli bir global sağlık sorunudur (Brennan ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2007). GLOBOCAN'a göre, 2022 yılında dünya çapında yaklaşık 19,9 milyon yeni vaka ve 9,7 milyon ölüm gerçekleşirken, Türkiye'de aynı yıl içinde 240.013 bin yeni vaka ve 129.672 kansere bağlı ölüm yaşandığını gözlemlendi (GLOBOCAN, 2022). İnsan vücudundaki 60'tan fazla organı etkileyen ve 200'den fazla türü bulunan kanser, değişken ve zorlu bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Cancer Research UK, 2023).

"Kanser" teriminin kökeni, genellikle "Tıbbın Babası" olarak anılan Yunan doktor Hipokrat'a (MÖ 460-370) kadar uzanır. Hipokrat, tümörleri tanımlamak için "carcinos" ve "carcinoma" terimlerini kullanmıştır. Yunanca "yengeç" kelimesinden türetilen bu terimler, kanser oluşumlarının dallarının yengeç benzeri görünümünden kaynaklanmaktadır. Romalı doktor Celsus (MÖ 25- MS 50) daha sonra bu Yunanca terimleri Latince yengeç anlamına gelen "Cancer" kelimesine tercüme etmiştir (Gallucci,1985). Türk tıp tarihinde ise kansere Arapça "yengeç" kelimesinden türetilen "seretan" adı verilmektedir (Ünver 1938). Günümüzde, yengeç analojisi kötü huylu tümörleri tanımlamada kullanırken, Yunan hekim Galen (MS 130-200)'in kullandığı "oncos" kelimesinden türetilen "onkolog" terimi artık kanser tedavisi ile ilgilenen uzmanları ifade etmektedir (Gallucci,1985).

İnsanların eski zamanlardan beri bu ciddi ve agresif hastalığa yakalandığı bilinmektedir. Hastalığın şiddetli yan etkileri ve kanser hücresinin morfolojik değişikleri birçok yönden eski hekimlerin belgelemelerinde ve yazmalarında yer almaktadır. Kanserin varlığına dair kanıtlar, fosilleşmiş kemik tümörlerinde, eski

Mısır'daki insan mumyalarında ve eski el yazmalarında bulunan en eski belirtilerden bazıları ile eski zamanlara dayanmaktadır. Bu arkeolojik buluntular arasında mumyalanmış kalıntılarda görülen, kemik kanserinin bir türü olan osteosarkomu andıran büyümeler de yer almaktadır. Ayrıca bu tarihi kayıtlarda baş ve boyun kanserinin karakteristik özelliği olan kemikli kafatası tahribatının belirtileri de tespit edilmiştir (Gallucci 1985). Kanserle ilgili bilinen en eski kayıt, Edwin Smith Papirüsü'nde bulunan, yaklaşık MÖ 3000 civarındaki eski Mısır'a dayanmaktadır. Bu belge, travma cerrahisi hakkındaki eski bir Mısır el kitabının bir parçasıdır. Kitapta 'Ateş delgisi' (fire drill) olarak adlandıran bir alet kullanılarak dağlama yoluyla tedavi edilen sekiz meme tümörü vakası ayrıntılarıyla anlatılmaktadır. Ayrıca metinde kanser hastalığı ile ilgili "tedavisi yok" ibaresi kullanılmıştır (Diamandopoulos, 1996).

Son yüzyılda kanserin kökenleri ve ilerleyişinin anlaşılmasında önemli bir değişim yaşanmıştır (Ok ve ark., 2017). Kanserin nedenlerini aydınlatmak için humoral teori, lenf teorisi, blastema teorisi, kronik tahriş teorisi, travma teorisinin yanı sıra bulaşıcı hastalıklar ve beslenme yetersizliklerini içeren teoriler gibi çeşitli teoriler öne sürülmüştür (Devita ve Rosenberg, 2012). Sonuçta kanserlerin çoğunlukla sağlıklı hücrelerdeki DNA mutasyonları nedeniyle ortaya çıktığı anlaşılmıştır (Ok ve ark., 2017). Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre, belirli risk faktörlerinin kişinin kansere yakalanma olasılığını artırabileceğine dair önemli bir sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Kanser risk faktörleri arasında kimyasal maddelere veya alkol ve tütün gibi diğer kanserojen maddelere maruz kalma yer almaktadır. Bunun dışında yaş ve aile geçmişi gibi genetik özellikler ve bulaşıcı ajanlar da kansere yol açmaktadır (Risk Factors for Cancer, 2015).

2.2. KANSER GELİŞİMİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER

Genel olarak iki temel özellik kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırır. İlk olarak, hücre bölünmesi ve hayatta kalmanın düzenlenmesinde anormallikler gözükmektedir. İnsan vücudundaki çoğu hücrelerin bölünme ve çoğalma amacıyla hücre döngüsüne girişi kontrollüdür. Dolasıyla belli bir düzende ve belirli zaman aralıklarında bölünür. Kanser hücrelerinde ise sıklıkla mitotik aktiviteyi düzenleyen proteinlerde değişiklikler gözlemlenmektedir. Normal hücreler, önemli genomik

hasar da dahil olmak üzere çeşitli koşullara yanıt olarak apoptoza maruz kalır. Kanser hücreleri, sıklıkla apoptozu kontrol eden genlerde değişiklikler barındırır ve bu onların normalde ölümcül olabilecek koşullar altında hayatta kalmalarını sağlar. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran ikinci özellik ise, metastaz yapabilme yetenekleridir (Kumar, 2015). Metastaz, kanser hücrelerinin komşu hücrelerden ayrılma, doku sınırlarına nüfuz etme, lenfatik ve kan damarlarına girerek bunların içinden geçme ve ardından yabancı doku ortamlarında çoğalma yeteneği kazanmasını ifade eder. Metastaz, kanserin agresif davranmaya başladığını ve ileri bir evreye ulaştığını gösterir (Gerstberger ve ark., 2023). Çok sayıda kanser metastaz aşamasına gelince, belirli bir düzen gösterir ve aynı yollar seçerek vücut içinde aynı yerlere sızar. Kemiğe yayılan tümörler arasında tiroitmikro, böbrek, prostat, akciğer ve meme kanserleri yer alır. Ayrıca, beyine metastaz yapan kanserler arasında melanom, akciğer kanseri, böbrek kanseri (renal hücreli karsinom) ve meme kanserleri gözlenmektedir (Ok ve ark., 2017).

2.2.1. Normal ve Kanser Hücre Döngüsünun Farkları

Hücre döngüsü, hücre büyümesi ve bölünmesi ile sonuçlanan bir dizi yapılandırılmış olaydan oluşur. Ökaryotik hücrelerde bu döngü iki ana aşamaya ayrılır: interfaz ve mitoz (M fazı). İnterfaz üç alt faza (G1, S ve G2) ayrılırken; M fazı, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak dört faza ayrılır. İnterfazın ilk ve en uzun aşaması büyüme aşamasıdır (G1). Hücre yaşamının büyük bir kısmı G1'de geçer. Bu aşamada S fazındaki DNA sentezine hazırlanmak amacıyla organellerin sayısı artar, RNA ve protein biyosentezi gerçekleştirilir. G1 fazında, mRNA, rRNA ve tRNA'nın sentezi hızlanarak yapısal proteinlerin ve enzim proteinlerinin oluşumu gerçekleşir. Sentez fazı olarak bilinen S fazı, hücre döngüsünün en kritik aşamasıdır. Ayrıca, birçok kemoterapötik ilaç hücrelerin S fazında etki eder. G2 fazı ise, DNA replikasyonunun tamamlanmasından mitozun başlangıcına kadar geçen süredir. G2 fazında mitoza hazırlanmak için mikrofilamentler, tübülin ve mitozun düzenlenmesinde önemli faktörler gibi mitozla doğrudan ilişkili RNA ve proteinlerin sentezi meydana gelir. M fazı, kromozomların iki yavru hücreye tam ve eşit şekilde bölünmesi sürecidir. Hücrenin DNA'sı ve proteinleri eşit olarak iki hücreye bölünerek hücre çoğalması işlemi tamamlanır. Hücre büyümesi ve çoğalması sürecinde, bir önceki döngünün

sonu genellikle bir sonraki döngünün başlangıcıdır. Ancak bazı hücreler bir sonraki döngüye girmez, geçici olarak hücre döngüsünden çıkıp G0 fazına girer. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, çok sayıda kontrol noktalarının ve sinyal yollarının kontrolünü kapsayan karmaşık bir dizi mekanizmayı gerektirir (Sun ve ark., 2021). Onarılamaz DNA hasarı yaşayan hücreler apoptoz için işaretlenir, böylece düzensiz hücre büyüme olasılığı kısıtlanır. Ancak çoğu kanser türü, hücrelerde G1 kontrol noktasını etkileyen bir veya daha fazla genetik değişiklik nedeniyle oluşmaktadır (Barnum ve ark., 2014). Normal hücrelerde hücre döngüsü proteinlerinin aktivitesi, hücre döngüsüne özgü transkripsiyon proteinleri, protein parçalanmasını, ayrıca çeşitli CDK-inhibitör proteinleri tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu mekanizmaların hepsi insan kanserlerinde sıklıkla düzensizleşir ve hücre döngüsü proteinlerinin anormal aktivasyonuna neden olur. Çoğu tümör tipinin gelişiminde nedenleyici bir rol oynayan, hücre-döngüsü makinesi içindeki genetik lezyonlar, aşırı aktivasyonuna neden olur (Malumbres ve Barbacid, 2009). Bu nedenlerle, hücre-döngüsü proteinlerine yönelik hedefleme, tümör büyümesini durdurmanın etkili bir yolu gibi görünmektedir.

2.2.2. Apoptoz Mekanizmaları

Kanserin ortaya çıkmasını önlemek için, vücutta apoptoz gibi koruyucu mekanizmalar bulunur. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü sürecini ifade eder. Özellikle uzun ömürlü memelilerde kritiktir çünkü erken gelişim aşamasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde kullanılır böylelikle vücut homeostazda kritik bir rol oynar (Hassan ve ark., 2014). Bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından hasar görmesi gibi bir savunma mekanizma olarak bilinen apoptoz, kanserin önlenmesinde de çok kritik ve önemli rol oynar. Çeşitli faktörler nedeniyle apoptoz meydana gelmeyebilir, bu da anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesine ve ardından tümör gelişimine yol açabilir (Norbury ve Hickson, 2001). Hem hücre içi hem de hücre dışından gelen sinyaller apoptotik yolun aktive eder. Apoptozdan sorumlu iki farklı yol bulunmaktadır: alınan sinyalin türüyle uyumlu olan intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörü) yollar. Hücre içi sinyaller arasında DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve sitokin yoksunluğu yer alırken, yaygın hücre dışı sinyaller genellikle hasarlı veya enfekte

hücrelere karşı bağışıklık sisteminin sitotoksik T hücreleri tarafından üretilen ölüm uyarıcı sinyalleri içerir (Zaman ve ark., 2014). Apoptoz sinyali verildiği anda, hücre içinde değişiklikler başlar. Bu değişiklikler, normal hücresel işlev için gereken sitoskelet ve nükleer proteinler gibi hücresel bileşenleri ayıran kaspazların aktive edilmesini içerir. Apoptozun son ortak basamağı olan infazcı kaspazların aktive edilmesiyle, hücre içinde apoptoza özgü değişiklikler meydana gelir. Kaspaz aktivitesi sonucunda, apoptotik hücreler küçülmeye başlar ve makrofaj yanıtını işaret eden plazma membranı değişiklikleri geçirir (Gökhan ve ark., 2020). Kaspazlar (sistein aspartil özgül proteazlar), hedef proteinleri kesen bir sistein proteinlerdir. Kaspaz proteaz aktivitesi, başarılı apoptoz için çok önemli çünkü çeşitli proteinleri keserler. Dört başlatıcı kaspaz (Kaspaz-2, -8, -9, 10) ve üç infazcı kaspaz (Kaspaz-3, -6, -7) bulunmaktadır. İnfazcı kaspazlar, sonunda hücrenin ölümüne yol açan hedef proteinleri keserler. Özellikle intrinsik yol, pro-apoptotik etki proteinlerini, pro-apoptotik BH3-only proteinlerini ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini içeren B-hücre lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi tarafından düzenlenir (Lopez e ark., 2015). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri olan Bcl-2 ilişkili X protein (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonist öldürücü (Bak) proteinlerinin inhibisyonu yoluyla apoptozu engeller (Zaman ve ark., 2014). BH3-only proteinler, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe ederler. Apoptozdan kaçan kanser hücrelerinin birçok yolu vardır: kaspaz fonksiyonu engellenebilir veya apoptoz tetikleyicisi devre dışı bırakılabilir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin yukarı regülasyonu ve Bax ve/veya Bak kaybı, kaçmanın baskın yöntemleridir. Bcl-2, bir onkogen olarak kabul edilmez, ancak onda meydana gelen mutasyonlar tümör oluşumunu artırır (Lopez e ark., 2015). Hücrede pro-apoptoz genlerinin sayısı anti-apoptoz genlerine oranla fazla ise apoptoz eğilimi yüksektir (Adams, 2001). Bcl-2 proteininin artması, tipine bakılmaksızın tüm kanserlerin yarısından fazlasında bulunmaktadır. Bu, bazı antikanser ilaçları da içeren herhangi bir içsel apoptotik uyarıcıya dirençli tümör hücrelerine yol açar (Pfeffer ve Singh, 2018).

2.3. SERVİKAL KANSERİ

2.3.1. Servikal Kanser Yapısı

Servikal kanseri, 2022 yılında dünya çapında kadınlarda meme, akciğer ve kalın bağırsak kanserlerinden sonra dördüncü sırada görülürken, Türkiye'de on ikinci sırada yer almaktadır. Tablo 2.1'de gösterildiği gibi, 2022 yılında ülkemizde servikal kanserinin görülme sıklığı yüz binde 4,8'dir. Bir yıl içerisinde 2.593 yeni vaka kayıtlara yer almaktadır (GLOBOCAN, 2022).

Tablo 2.1. Türkiyede jinokolojik kanser vaka sayısı ve görülme sıklığı (GLOBOCAN 2022)

Kanser Adı	Cinsiyet	Vaka Sayısı	Görülme Sıklığı
Tüm kanserler, melanom dışı cilt kanseri hariç.	Kadın	104557	187.5
meme	Kadın	25249	46.8
Vulva	Kadın	313	0.50
Vajina	Kadın	90	0.16
Serviks	Kadın	2593	4.8
Korpus uteri	Kadın	7847	14.3
yumurtalık	Kadın	3855	6.9

Servikal kanser, serviks, endometriyum ve yumurtalıktan kaynaklanan primer jinekolojik kanserler arasında en sık görülen malignite olarak öne çıkmakta ve önemli bir global sağlık sorunu oluşturmaktadır. Vajinanın üst kısmında yer alan serviks (rahim ağzı), rahime giriş görevi görmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde servikal kanserine bağlı ölüm oranları meme ve akciğer kanserleri ile aynıdır (loue ve ark., 2004). Servikal displazi çoğu kadında hiçbir belirtiye neden olmamakta teşhis edilmemiş veya tedavi edilmemiş servikal displazisi olan kadınlarda belirli bir süre boyunca anormal hücreler diğer dokulara geçme yeteneği geliştirebilir ve bu noktada kanser oluşabilir. İnvaziv servikal kanseri, düzensiz vajinal kanama, cinsel ilişki sonrası yaşanan kanama veya anormal kokulu vajinal akıntı gibi semptomlara

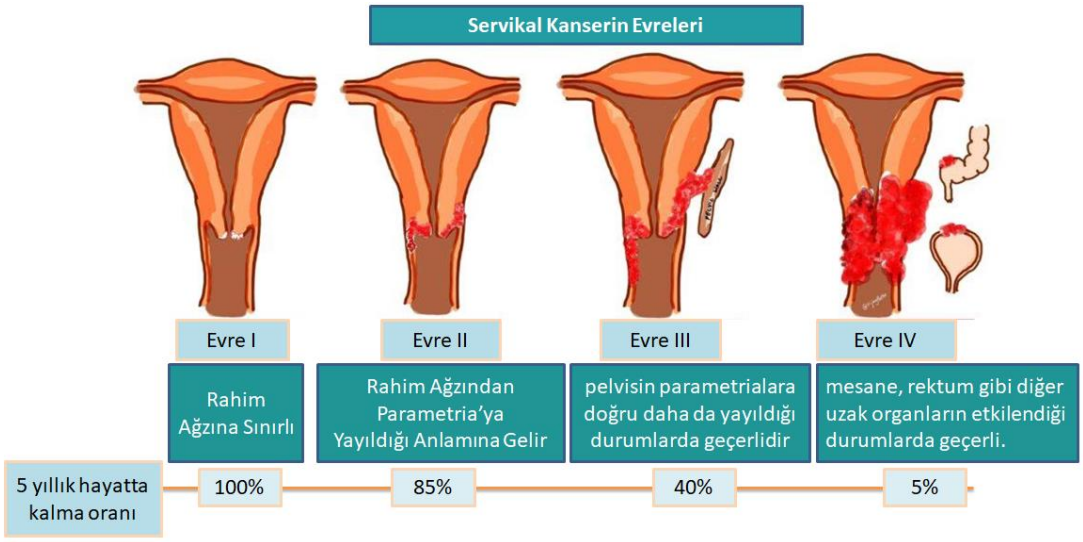
neden olur. Daha ileri seviye servikal kanser belirtileri arasında pelvik veya sırt ağrısı veya bacaklarda şişlik yer almaktadır (loue ve ark., 2004).

2.3.2. Servikal Kanserin Nedenleri

Servikal kanseri; sigara kullanımı, genetik faktörler, yüksek kilo, geçirilen doğum sayısı, ilk cinsel ilişki yaşı, çok eşli bir yaşam tarzının benimsenmiş olması başta olmak üzere yüksek riskli insan papillomavirüsü (HPV) gibi birçok faktöre bağlı gelişmektedir (Bedell ve ark., 2020). Çok sayıda yapılan bilinçlendirme kampanyalarına rağmen hala birçok kadın insan papillomavirüsü (HPV)'nün bulaşma şekli ve çeşitli kanserlerle bağlantısı hakkında yeterli bilgi sahibi değildir. HPV, genital cilt temasıyla ilişkili yaygın bir enfeksiyondur. Kalıcı HPV enfeksiyonları, HPV DNA'sının konakçı hücre genomuna entegrasyon yapması ile oluşur, bu da premalign ve daha sonra malign değişime yol açar (Small ve ark., 2017). Yüksek riskli HPV tipleri (16 ve 18), dünya çapında servikal kanserinin yaklaşık %70'inden sorumludur. Vakaların geri kalanı ise kombine hormonal doğum kontrolü kullanımı ve tütün kullanımı gibi diğer yüksek riskli tiplerle ilişkilidir. HIV'li hastaların servikal kansere yakalanma riski, sağlıklı insanlara göre altı kat yüksektir (Blitz ve ark., 2013).

2.3.3. Servikal Kanserin Evreleri

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi tanı konulduktan sonra hastalığın evresine bakılarak ne kadar ilerlediği kontrol edilir. Evre hem tedavi seçeneklerini hem de prognozu belirlemeye yardımcı olur. Servikal kanserdeki evreler, Şekil 2.1 belirlendiği gibi Evre I hastalık, rahim ağzının ötesine ilerlememiş kanseri ifade eder. Boyut olarak mikroskobik olan tümörler ile çok büyük olabilen ancak yine de serviksle sınırlı olan tümörler arasında ayrım yapılmasına yardımcı olan IA ve IB gibi alt evreler vardır. Evre II, servikal kanserin rahim ağzından üst vajinaya veya rahim ve rahim ağzını yanlarda destekleyen parametria adı verilen yumuşak dokulara yayıldığı anlamına gelir. Evre III, kanserin vajinanın alt kısmına veya pelvisin yan tarafındaki parametrialara doğru daha da yayıldığı durumlarda geçerlidir. Evre IV en ileri evredir ve mesane, rektum, karaciğer veya akciğer gibi diğer rahim ağzından uzak organların etkilendiği durumlarda uygulanmaktadır (Loue ve ark., 2004).



Şekil 2.1. Servikal kanserin evreleri

2.3.4. Servikal Kanserin Tedavi Yöntemleri

Servikal kanserin IA evresinde olan kadınların hayatta kalma olasılıkları, Şekil 2.1 ve Tablo 2.2 beliledikleri gibi serviksin tamamen veya kısmen cerrahi olarak çıkarılması durumunda, %100'e yakındır. Aynı zamanda kanserin erken evrelerinde (IB ve IIA), lenfadenektomi ile radikal histerektomi veya kemoterapi ile pelvik radyasyon içeren tedavi seçeneklerini kullanarak hayatta kalma şansı ortalama %85 civarındadır. Sonraki evrelerde (IIB-IV) vakanın hayatta kalma şansı %65 ten %40'a düşerken evre IV'te yalnızca %5 olacaktır (Şekil 2.1). Servikal kanserin diğer tüm evrelerinde en etkili tedavi kemoterapiyle birlikte radyasyondur. Ancak servikal kanserde en etkili tedavi, servikal displazisine ilerleme fırsatı bulamadan teşhis koymak ve tedavi etmek olacaktır (loue ve ark., 2004). HPV aşısı, servikal kanser ve displazi gelişimini önleme amacıyla son derece etkilidir. Tüm kadınlara şiddetle önerilen aşı, HPV enfeksiyonuna yakalanma riskini azaltmaktadır (Cancer Research UK, 2023).

Tablo 2.2. Servikal kanserde tercih edilen tedavi teknikleri.

Servikal Kanser Evresi	Tercih Edilen Tedavi
IA	Cerrahi Mudahele
IB	Lenfadenektomi İle Radikal Histerektomi
IIA	Kemoterapi İle Pelvik Radyasyon
IIB-İleri Evrelerde	Kemoterapiyle Birlikte Radyasyon.

2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE HELA HÜCRE HATTI

İnsanlığın en önemli başarılarından biri, hayvan ve bitkilerden elde edilen hücrelerin *in vitro* kültür çalışmaları için geliştirilmesidir. Bu yöntemlerin uygulanması, çeşitli insan dokularının hücrelerini seçici besi ortamlarında yetiştirmeyi mümkün kılmaktadır, tıpkı bakteriler veya diğer tek hücreli organizmalar gibi. Birçok insan hücre kültürü başlangıçta kanser tümörlerinden türetilmiştir (Lucey ve ark., 2009). Bu hücreler, kültür ortamında sonsuz bölünme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle "ölümsüz" (immortalite) olarak adlandırılırlar. Henrietta Lacks'in servikal hücrelerinin kültürü olan HeLa, en ünlü hücre hatlarından biridir. Bu hücreler, laboratuvar koşullarında basitleştirilmiş bir insan vücudunu başarıyla taklit eder ve kanser hücrelerinin ölümsüzlüğünün iyi bir örneğini gösterir (Gilgenkrantz, 2010). Ancak Henrietta Lacks'in adından sonra "HeLa" olarak adlandırılan bu hücre hattının benzersiz olması, normal dokulardan gelen hücrelere göre *in vitro* olarak iki kat daha hızlı çoğalmasıdır. HeLa hücre hattı, ölmeden önce 40 ila 50 kez bölünebilir. Normal insan hücrelerinin karyotipi 46 kromozom iken, HeLa hücreleri 76 ila 80 kromozoma sahiptir ve bu kromozomlar önemli ölçüde mutasyona uğramıştır (Heng, 2013). Bu normal karyotipten sapmanın ortaya çıkması, neredeyse tüm servikal kanser vakalarından sorumlu olan HPV-16, 18 ile ilişkilendirilmiştir. HPV, DNA'sını konak hücresine yerleştirir. Sonuç olarak, konak hücre, mutasyonları önleme ve tümörü baskılama rolü nedeniyle "genom koruyucu" olarak bilinen p53 proteinini bağlayıp etkisiz hale getiren bir protein sentezlemeye başlar. P53 proteininin etkisizleştirilmesi tümör oluşmasıyla sonuçlanabilir (Kochetkov ve ark., 2007). HeLa hücrelerinin ölümsüz özelliği, araştırmacıların daha önce imkansız

olarak gördükleri çalışmaları gerçekleştirmelerine olanak sağlamış ve keşfedildikten hemen sonra standart hücre hattı olarak kullanılmıştır. HeLa hücreleri, kanserin tedavisinde genetik mekanizmaların araştırılması, radyasyon ve kemoterapi çalışmalarındaki hücresel davranışların belirlenmesi gibi alanlarda sıkça kullanılmaktadır. Diğer dikkat çeken bir nokta ise hücrelerin çocuk felci aşısının geliştirilmesinde oynadığı roldür. HeLa hücreleri, virüsün laboratuvar ortamında üretilmesini sağlamıştır. Bu aşı insanlara uygulanmadan önce HeLa hücreleri üzerinde test edilebilmektedir (Michael, 2015).

2.5. ANTİKANSER ETKİ GÖSTEREN BİTKİSEL KAYNAKLI ÜRÜNLER

Kemoterapi kanser tedavisinde en etkili yöntemlerden biri olmasına rağmen, akut toksisite belirtileri ve geç kronik toksisite belirtilerini içeren çok sayıda ciddi yan etkiyle ilişkilidir. Yan etkilerin sıklığı yaşamı tehdit eden veya ciddi hasar bırakan boyutlara ulaşabilmektedir (Schirrmacher, 2018). WHO sınıflandırmasına göre, ciltte, saçta, kemik iliğinde, kanda, mide-bağırsak sisteminde ve böbreklerde anında etkiler gözlemlenebilir. Kalp, akciğerler ve beyin gibi temel organları etkileyerek 3. ve 4. derece nörotoksisite uyuklama, parestezi, felç, ataksi, spazm ve komaya neden olabilir. Ayrıca kemoterapinin önemli kronik etkileri arasında ilaç direnci, karsinojenite ve kısırlık yer almaktadır (Steward ve Wild, 2014).

Sentetik kemoterapiye bağlı ciddi yan etkiler, hastalığa bağlı ölüm oranlarını azaltmayı amaçlayan ve kanseri önleme ve tedavi etmeye yönelik yeni daha güvenli ilaçlara ihtiyacı doğurmuştur. Bitkisel ilaçlar, kanser tedavisi için güvenli, toksik olmayan, ekonomik ve kolaylıkla temin edilebilen bileşik kaynağı sunmaktadır (Liang ve ark., 2023). Antikanser etki gösteren çok fazla bitki örneği vardır. Örneklerden biri, Madagaskar deniz salyangozu (*Catharanthus roseus*) bitkisinden izole edilen vinblastin ve vinkristin gibi vinka alkaloidlerinin, lösemiler, lenfomalar, ilerlemiş testis kanseri, meme ve akciğer kanserlerinin yanı sıra Kaposi sarkomu da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Cragg ve Newman, 2004). Yanı sıra, *Taxus brevifolia* (Pasifik porsuğu) kabuğundan elde edilen paklitakselin (ticari adı: Taxol) keşfi doğal ilaç araştırmalarında önemli bir katkıda bulunmuştur. Homoharringtonin, Çin ağacı *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea*'dan elde edilen bir başka güçlü bileşik, Çin'de akut miyeloid

löseminin tedavisinde sıklıkla harringtonin ile kombinasyon halinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca Fiji şifalı bitkisi *Bleekeria vitensis* A.C. Sm.'den izole edilen bir eliptisin türevi elliptiniumun, meme kanseri tedavisi için Fransa'ya götürüldüğü bilinmektedir. Tüm bu örnekler, antikanser ilaçlarının araştırılmasında bitki kaynaklı bileşiklerin zengin potansiyelinin altını çizmektedir (Mukherjee ve ark., 2001).

2.6. ASTERACEA AİLESİ

Asteraceae, eski ama hala geçerli olan "Compositae" veya daha yaygın bilinen adıyla papatyagiller familyası, çiçekli bitkilerin büyük bitki familyalarından biri ve önemli bir familyasıdır. Dünya genelinde yaklaşık 33,867 tür ve 1886 cins içermektedir (WFO plantlist, 2023). Asteraceae familyasına ait bitkiler genellikle basit veya bileşik çiçek başlarına sahiptir. Başlık olarak bilinen bu yapılar, birçok minik çiçeği bir araya getirir ve genellikle merkezi bir disk ve etrafında yayılmış petal benzeri yapılar içerir (Heywood, 1971). Familya, pek çok çeşitli iklim ve habitatlarda bulunabilir ve birçok farklı türe ev sahipliği yapar (Davis ve ark., 1975). Asteraceae familyasına ait bitkiler, hem doğal hem de ticari olarak pek çok yönden önemlidir. Birçok türü gıda (özellikle kızartma yağlar, tatlandırıcı maddeler, enginar, kahve yerine kullanılan maddeler ve bitkisel çaylar), süs bitkisi ve tıbbi amaçlı (antimalaryal, sindirim sorunları, uykusuzluk, stres gibi) olarak kullanılırken, bazıları da zararlı yabani otlar için bir çözüm olabilir (Erdtman, 1966; Heywood, 1971; Honda ve ark., 1996; Rowley ve ark., 1981).

2.6.1. *Centaurea* L. Cinsi

Centaurea L. cinsi, Asteraceae ailesine ait çok yıllık veya yıllık, otsu bitkiler içeren büyük bir cinstir. *Centaurea* L. cinsi, dünya genelinde yaygın olarak bulunur. Ancak Türkiye'de bu cinsin birçok türü çeşitli iklim ve coğrafi bölgelerinde geniş bir yayılıma sahiptir ve bazı türleri doğal floranın önemli bir parçasıdır. Genellikle farklı habitatlarda, özellikle de otlaklarda, tarlalarda, orman kenarlarında ve yol kenarlarında yetişir (Davis ve ark., 1975). *Centaurea* türleri, gösterişli çiçek başlarına sahiptir. Çiçek başları, bir dizi minik çiçeğin bir araya gelmesiyle oluşur ve genellikle göz alıcı renklere sahiptir. Çiçek başlarının merkezinde, çoğu türde koyu

renkli bir disk bulunur. Bitkilerin yaprakları genellikle sıralı veya tüylüdür. *Centaurea* L. cinsine ait bazı türler geleneksel tıpta çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Halk arasında, göz problemlerini iyileştirmek ve sindirim sorunlarını hafifletmek için *C. cyanus* kullanmıştır. *C. solstitialis*'ın kökleri hazımsızlık, iştahsızlık ve mide problemlerini tedavi etmek için kullanılmıştır. *C. nigra* bitkisinin bazı bölgelerde idrar söktürücü özelliklere sahip olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, bazı halk ilaçlarında böbrek ve mesane sağlığını desteklemek için kullanılmıştır (Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001).

Bu cinsin birçok türü, peyzajda süs bitkisi olarak kullanılmak üzere yetiştirilir. Özellikle *C. cyanus* ve *C. montana* gibi türler, bahçelerde ve çiçek tarhlarında popülerdir. Bitki bilimciler ve bahçıvanlar arasında popüler olan *Centaurea* L. cinsi, botanik araştırmalarda da önemli bir konudur. Cinsin taksonomisi, morfolojisi ve ekolojisi üzerine yapılan çalışmalar, bitki bilimine ve doğal yaşamın anlaşılmasına katkı sağlar (Mutlu ve ark., 2023).

2.6.2. *Centaurea* Cinsine Ait Olan Türlerin Farmakolojik Etkileri

Centaurea cinsine ait bitkilerin farmakolojik özellikleri araştırılmış ve çeşitli potansiyel etkinliklere sahip oldukları görülmüştür. Ancak bu bitkilerin farmakolojik etkileri türden türe ve bitkinin hangi kısmının kullanıldığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bazı *Centaurea* türlerinin antioksidan bileşikler içerdiği bilinmektedir (Aboul-Soud ve ark., 2022; Bouzghaia ve ark., 2021; Çelikezen ve ark., 2019; Hadjira ve ark., 2021; Hechaichi ve ark., 2023; Salachna ve ark., 2021). Bitkilerin içerdiği bileşikler, vücuttaki serbest radikallerle savaşıp hücresel hasarı azaltır ve yaşlanmayı geciktirir. *Centaurea* türlerinin antienflamatuvar özelliklere sahip olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (Aissous ve ark., 2023; Alper ve Güneş, 2019; Demiroz ve ark., 2018; Erel ve ark., 2011; Gürbüz ve Yesilada, 2007; Hadjira ve ark., 2021; Karamenderes ve ark., 2007; Köse ve ark., 2016; Polat ve ark., 2022). Cinse ait bitkilerin ekstreleri, inflamasyonu azaltmaya ve inflamasyonla ilişkili semptomları hafifletmeye yardımcı olmaktadır. *Centaure* türlerinin eksreleri, bakteri ve mantarların büyümesini inhibe etmekte ve enfeksiyonlarla savaşmaya yardımcı olmaktadır. (Bruno ve ark., 2019; Bülent Köse ve ark., 2007; Ceylan ve ark., 2009; Ceyhan ve ark., 2019; Sargin ve ark., 2021; Ugur ve ark., 2010).

Çalışmaların çoğu laboratuvar ortamında yapılmış olup insanlar üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle de bitkilerin farmakolojik etkilerinin daha iyi anlaşılması ve klinik çalışmalarda test edilmesi gerekmektedir. Ancak bu çalışmalar *Centaurea* türlerinin çeşitli potansiyel sağlık yararlarına sahip olabileceğini göstermektedir.

2.6.3. *Centaurea lycaonica*

C. lycaonica, "zarif düğme" olarak bilinen, Asteraceae (Compositae) familyasına ait bir bitki türüdür ve Türkiye'ye endemiktir. Bitkinin yayılış alanı genellikle Anadolu'nun batı ve orta bölgeleri'ne özgüdür. 1845 yılında ilk kez Heldreich tarafından Konya Beyşehir civarından toplanmıştır. Bitkinin yayılış gösterdiği bölge detaylı bir şekilde belirtilmediği için bilim insanları uzun bir süre boyunca onu bulamamışlardır. Son zamanlarda, Doç. Dr. Ahmet DURAN tarafından Konya Seydişehir bölgesinden toplanmıştır. Toplanan bitkinin Dr. Tuna UYSAL tarafından teşhis edilmesiyle *C. lycaonica* türü olduğu tespit edilmiştir (Uysal ve Hamzaoğlu, 2008). *C. lycaonica*, genellikle çayırlarda, otlaklarda ve kuru yamaçlarda yetişen çok yıllık bir bitkidir. Bitkinin çiçekleri, çoğu *Centaurea* türünde olduğu gibi mavi-mor renkte ve başlıklar şeklinde küçük çiçeklerden oluşur. Yaprakları genellikle tüysüzdür ve kenarları dişlidir. *C. lycaonica* üzerinde yapılan araştırmalar sınırlıdır. Ancak bazı araştırmalar bitkinin biyolojisi, ekolojisi ve tıbbi potansiyeli üzerine yapılmıştır (Özel, 2008). Ayrıca, bitkinin antimikrobiyal, antioksidan ve enzim inhibisyonu etkileri araştırılmıştır (Fatullayev ve ark., 2023). Yıldıztugay (2011) tarafından *C. lycaonica*'nın biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri üzerine tuz stresinin etkileri araştırılmıştır (Yıldıztugay, 2011). Ancak, *C. lycaonica* ile ilgili daha fazla bilgiye ve araştırmaya ihtiyaç vardır. Bitkinin ekolojisi, biyolojisi ve potansiyel tıbbi kullanımları hakkında daha derinlemesine araştırmalar yapılmalıdır. *C. lycaonica*, Dünya Koruma Birliği (IUCN)'nin Tehlike Altında (EN) kategorisinde yer almaktadır (Ekim ve ark. 2000).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hadiye Kılıçer İnsan Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışmalar Laboratuvarı'nda mevcut olan ilgili cihazlar ve sağlanan malzemelerle gerçekleştirildi.

3.1. KULLANILAN GEREÇLER VE CİHAZLAR

Deneylerde aşağıda listelenen gereçler ve cihazlar kullanıldı.

- Ayarlanabilir hacimli pipet seti (Eppendorf)
- Buzdolabı +8 °C, -20°C (Siemens)
- Çalkalayıcı (Biosan PST-60 HL plus)
- Dondurucu -80 °C (Operon)
- Enjektör (10, 50 cc) (Hayat)
- Hassas terazi (Adventurer Ohaus)
- Hücre sayım cihazı (Innovatis Cedex Xs)
- Hücre sayım kartuşu (Cedex Smart Slide package, 05650801001)
- Ters mikroskobu (Nikon Eclipse TS100)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Mtops MS300)
- İnkübatör (CO_2'li) (İncu safe MCO-18AIC)
- Kuyucuklu plakalar 6'lık ve 96'lık (Santa Cruz).
- Kültür kapları 25 cm^2 ve 75 cm^2 (Greiner)
- Kriyojenik tüpler (Biosigma)
- Laminar kabin (S Faster Elite class II A1/A2)
- Membran filtre (0,20 μm) (Minisart 16534)
- Mikropipet ve multipipet (Isolab)
- Mikro ependorf tüpü (0,2; 0,5; 1; 1,5; 2 ml) (Isolab)
- Multi fonksiyonel mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT)

- Pudrasız Eldiven (Dolphin)
- Saf su cihazı (Millipore Elix 3)
- Santrifüj (Universal 320 R)
- Santrifüj tüpü (15, 50 ml) (Santa Cruz)
- Serolojik Pipet (5 ml, 25ml) (Santa Cruz)
- Sonikatör (bandelin sonopuls hd 2070)
- Spin (MSC 6000 Biosan)
- Steril pipet uçları (10,100, 1000 µl) (Expell)
- xCELLigence® RTCA SP cihazı (ACEA, Roche)
- Vorteks (Heidolph)

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

Deneylerde aşağıda listelenen kimyasal maddeler kullanıldı ve bunlar gerekli ortam sıcaklıklarında saklanıldı.

- Asetik asit (Sigma 64-19-7)
- Bax Protein Deney Kiti (Sun Red Biotechonology 202307)
- BCA (Bikinkoninik asit) Protein Deney Kiti (Cell Signaling 7780)
- Bcl-2 Protein Deney Kiti (USCN L230904376)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sartorius 230901812)
- DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Sigma D8418- 250 ml)
- Doksorubisin 50mg (Saba Adrimisin 50 mg enjeksiyonluk flakon)
- Etanol % 90 (Tekkim 64-17-5-2,5 l)
- Fetal sığır serumu /Fetal Bovine Serum %10 (FBS) fbs(Biochrom S0115)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7,4 (PBS) (AppliChem A9177-100 tablet)
- H_2O_2 (Hidrojen peroksit) (Merck)
- Kaspaz-3 Protein Deney Kiti (Sun Red Biotechonology 20230721)
- Kaspaz-9 Protein Deney Kiti (Sun Red Biotechonology 202307)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn CP 18-2207)
- Proteaz inhibitör kokteyli (A.G. Scientific B1352)
- Sülforodamin B sodyum tuzu (Santa Cruz sc-253615A-5 g)
- TCA (Trikloroasetik asit) (Sigma T6399-100 g)
- Tripan mavi solüsyonu %0,4 (Sigma T8154)

- Tripsin-EDTA % 0,25 (Sartorius 223601012)
- Tris Hidroklorür pH 10,5 (Amresco 0234-1 kg)

3.3. BİTKİ EKSTRASYONU HAZIRLAMA

Çalışmada kullanılan *C. lycaonica* bitki ekstreleri, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi ABD, Doç. Dr. Leyla PASHAYEVA' danışmasıyla hazırlandı. Bu çalışmada, *C. lycaonica* endemik bilinen türünün toprak üstü (herba) kısımları Temmuz ayı 2022 yılında Konya civarından toplanarak gölgeli ve havalandırılmış ortamda kurutuldu.

Tez çalışması kapsamında, ekstrenin hazırlanması için en uygun yöntemin seçiminde literatür tarandı. Bitkisel materyalden apolar bileşikleri daha yoğun şekilde elde etmek amacıyla 24 sa. süreyle maserasyon yöntemiyle önce diklorometan ekstresi hazırlandı. Daha sonra diklorometan ekstresinden metanolle partisyon yöntemiyle metanol ekstresi elde edildi. Ekstre elde edildikten sonra süzgeç kâğıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntü çözücüsü rotavaporda 38°C'de düşük basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Elde edilen ekstre liyofilize edilerek çalışma anına kadar -20°C'de korunarak saklandı.

Deneylerde kullanılan CHD ve CHM'nin farklı konsantrasyonların hazırlanmasında FBS (Biochrom S0115) içermeyen besiyeri kullanıldı.

3.4. HELA HÜCRE HATTI HAZIRLAMA

İstatistiklere göre, hücre döngüsü süresi hücre hatları arasında farklılık göstermektedir. HeLa hücrelerine gelince toplam döngü süresi yaklaşık yirmi iki sa. sürer. G1 fazının 10 sa., S fazının 8 sa., G2 fazının 3 sa. ve M fazının 1 sa. sürmesi beklenmektedir (Deplanch ve ark., 2015). HeLa hücre hattı Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ABD'den temin edildi. Saklanan stok hücrelerinin bulunduğu kriyotüpler (Biosigma) -80 °C 'den (Operon) çıkarılıp direk 37 °C' lik su banyosunda çözüldü. Çözünen hücreler 1000 rpm, 25 °C'de 5 dk. santrifüj (Universal 320 R) edildi ve üzerindeki süpernatant atıldı. Kalan hücreler laminar kabinde besiyeri ile pipetaj yapıldı. Ardından 25 cm^2 lik flasklara (Greiner) ekildi ve

ters mikroskop (Nikon Eclipse TS100) altında incelendi. 37 °C' de %5 CO_2'li inkübatörde (İncu safe MCO-18AIC) kültüre edildi.

3.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültüründe, HeLa hücrelerinin çoğalmasında kullanılacak besiyeri için; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sartorius 230901812) %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin (Capricorn CP 18-2207) içerecek şekilde hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

HeLa hücreleri, düzenli olarak pasajları yapılarak, standart hücre kültüründe %5 CO_2 ve %95 nemli hava içeren atmosferde 37 °C'de inkübe edildi.

3.5.1. Hücrelerin Pasaj İşlemi

HeLa hücreleri, ekildiği flasklar içerisinde yeterli yoğunluğa geldiğinde bulundukları yüzeyden kaldırılmaları amacı hücreler ile tripsin-EDTA (Sartorius 223601012) solüsyonu ile 4-5 dk muamele edildi. İnkübatörden çıkarılan hücreler ters mikroskop altında incelendi. Tripsinizasyonu durdurmak için yeterli miktarda besiyeri eklendi. Daha sonra hücreler 1000 rpm 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve deney için gerekli hücre sayıları tripan mavisi yöntemi ile hesaplandı. Çalışmada kullanılacak hücreler ise 75 cm^2'lik flasklara ekildi.

3.5.2. Hücrelerin Ekimi

Hücre canlılığının tespiti için yapılacak SRB ve GZHA deneylerde hücre ekiminde kullanılacak sırasıyla 96 kuyucuklu ve e-plaka (Santa Cruz) kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde dağıtımı yapıldı. Ayrıca apoptozun belirlenmesinde kullanılan Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 protein tayini deneyler için 6 kuyucuklu plakalarına 1×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde dağıtıldı. Deneyler için literatür bilgisinden faydalanılarak en uygun hücre sayısı belirlendi ve deneye aynı sayılar kullanarak devam edildi. Hücrelerin ekim işlemlerinin ardından 37 °C'de, %5 CO_2 ve % 95 nemli hava içeren inkübatör pH 7,2'de, 24 sa. bekletilerek inkübasyon gerçekleştirildi.

3.5.3. Hücre Dondurması

Çoğalan hücreleri saklamak amacıyla hücre dondurma işleminde DMSO (Dimetil Sülfoksit) (Sigma D8418) kullanıldı.

3.6. HELA HÜCRE HATTI ÜZERİNDEKİ DENEYLERİ

3.6.1. SRB Canlılık Testi

SRB testi, büyük ölçekli ilaç tarama uygulamaları için ilaca bağlı sitotoksisiteyi ve hücre proliferasyonunu ölçmek amacıyla temmuz ayı, 1990'da Skehan ve ark. tarafından geliştirildi (Skehan ve ark., 1990). Sülforhodamin B proteini; hafif asidik koşullar altında proteinlere stokiyometrik olarak bağlanabilme ve daha sonra bazik koşullar kullanılarak ekstrakte edilebilme ve ölçüm için çözündürülebilme yeteneğine sahip bir boyadır. Dolayısıyla bağlı boya miktarı hücre kütlesini temsil edebilir ve ona istinaden hücre proliferasyonunu ölçülebilir (Vichai ve Kirtikara, 2006).

Potansiyel antikanser aktiviteye sahip bitki ekstrelerinin, HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini ölçmek amacıyla SRB canlılılık testi kullanıldı.

- HeLa hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu besiyerinde dağıtılmış şekilde 96 kuyulu plakalarda 24 sa. inkübe edildi
- 24 sa. sonra örnekler, FBS'siz besiyeri kullanarak bitki ekstreleri uygulanarak 48 sa. hücrelerle muamele edildi.
- Üzerine +4°C'de bekletilen %40'lık TCA (Trikloroasetik asit) (Sigma T6399-100 g) çözeltisi uygulandı ve 1 sa. inkübe edildi.
- Kuyular boşaltıldı ve deiyonize su kullanarak beş defa yıkandı ve kuyuların kuruması için bekletildi.
- Kuyulara SRB solüsyonu (%1 asetik asit çözelti içerisinde %0,4 SRB) eklendi ve mikroplaka 30 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- Kuyular boşatıldı ve %1 h/h asetik asit çözeltisi ile beş defa hızlı bir şekilde yıkandı.
- Kuyular kurulduktan sonra 10 mM Tris Hidroklorür pH 10,5 (Amresco 0234-1 kg) eklendi.

- Protein bağlı boyayı çözmek ve gerçek renk görebilmek için 5 dk. çalkalayıcıda (Biosan PST-60 HL plus) bırakıldı.
- Mikroplaka okuyucuda (Biotek Synergy HT) 492 nM'de kuyuların absorbansı ölçüldü.
- Ekstrelerin uygulandığı kuyuların absorbans değerleri, kontrol grubunun absorbansına bölünerek % canlılık hesaplandı.

% Canlılık= Ekstre uygulanan grubun absorbansı / Kontrol grubun absorbansı ×100

- GraphPad Prism 8.3.0 yazılımı ile IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.6.2. xCELLigence RTCA SP Sistemi (GZHA)

xCELLigence GZHA sistemi, herhangi bir kimyasal, boya veya etiketleme kullanmaya gerek kalmadan hücre çoğalmasının ve canlılığının gerçek zamanlı izlenmesini sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Elektronik okuma tekniği kullanarak çalışan xCELLigence cihazları, hücre özel alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan mikroplakalardaki mikroelektronik sensör dizileriyle etkileşime girdikçe yapışık hücre çoğalmasını ve canlılığını ölçme imkanı sağlar. Hücreler ve elektronik biyosensörler arasındaki etkileşimden üretilen empedans tepkisi, hücre canlılığını gösterir ve doğrudan kuyuya ekilen hücre sayısıyla ilişkilidir. Bu empedans teknolojisi, mevcut canlılık ölçme sistemlerinin çeşitli sınırlamalarını giderir. İlk olarak, hücrelerin çoğalma ve sitotoksisite analizleri sırasında fizyolojik olarak daha normal bir durumu korumasına olanak tanıyan, invaziv olmayan bir ölçüm yöntemi sunar. Ayrıca, hücre çoğalmasının, canlılığının ve sitotoksisitenin gerçek zamanlı izlenmesini sağlar (Lamarche ve ark., 2020).

Potansiyel antikanser aktiviteye sahip bitki ekstrelerinin, HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini ölçmek amacıyla xCELLigence GZHA (ACEA Biosciences) kullanıldı.

- HeLa hücreleri FBS'li besiyerinde çoğaltıldı. Kültür kabındaki hücreler sayılarak özel alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan 96 kuyulu plakaya (e-plaka) (Roche 05 232 368 001) her bir kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde besiyerinde ekildi ve plaka cihaza yerleştirildi.
- xCELLigence GZHA sistemine ait yazılım programı çalıştırıldı.

- Farklı konsantrasyonda hazırlanan deney grupları 24 sa. sonra FBS'siz besiyeri kullanarak hücrelere uygulandı.
- Uygulama tarafından 15'er dakikalık arayla 90 sa. boyunca izlendi.
- Bitki ekstrelerinin konsantrasyonlarının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve IC_{50} değeri xCELLigence GZHA sistemine ait yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

3.6.3. Deney Gruplarının Belirlemesi

Bu çalışmada, *C. lycaonica* bitkisinin hücre canlılığına etkisi, ilk önce konsantrasyonları genel tarama şeklinde SRB yöntemi ile ardından belirlenen ve aşağıda belirtilmiş konsantrasyonlarla SRB ve xCELLigence GZHA ile değerlendirildi. Daha sonra GraphPad Prism 8.3.0 ve xCELLigence GZHA sistemi yazılımlarıyla canlılığa ilişkin grafikler elde edildi ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

Deney grupları:

1. Negatif kontrol grubu: Ekstre uygulanmayan sadece besiyeri içeren grup
2. CHD ekstresi uygulanan grup
3. CHM ekstresi uygulanan grup
4. Pozitif kontrol grubu: Dox uygulanan grup

Deney gruplarındaki konsantrasyonlar:

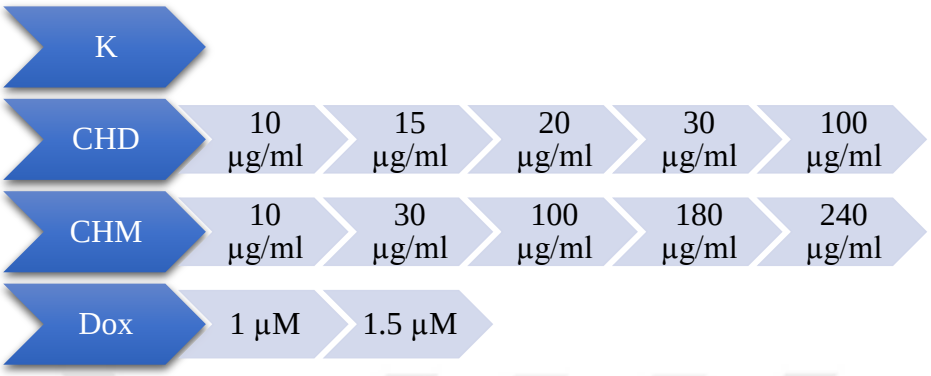
SRB deneyi için:

HeLa hücreleri, aşağıdaki ekstre ve dox deney gruplarındaki belirlenen konsantrasyonlar ile 48 sa. inkübe edildi.

K					
CHD	10 µg/ml	15 µg/ml	20 µg/ml	30 µg/ml	100 µg/ml
CHM	10 µg/ml	30 µg/ml	100 µg/ml	180 µg/ml	240 µg/ml
Dox	0.3 µM	0.5 µM	0.75 µM	1 µM	1.5 µM

GZHA deneyi için:

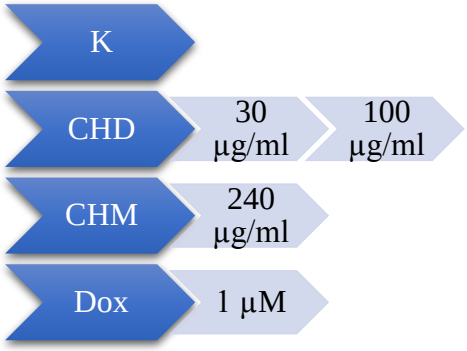
HeLa hücreleri, aşağıdaki ekstre ve dox deney gruplarındaki belirlenen konsantrasyonlar ile 48 sa. inkübe edildi.



Protein tayin deneyleri için:

Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 ELISA kitlerinde çalışılacak konsantrasyonlar, SRB test ve xCELLigence GZHA sistemin sonuçları değerlendirilerek HeLa hücre hattı için en uygun saat ve konsantarasyonlar aşağıdaki gibi belirlendi.

HeLa hücreleri, aşağıdaki ekstre ve dox deney gruplarındaki belirlenen konsantrasyonlar ile 48 sa. inkübe edildi.



3.6.4. Protein İzolasyonu

- Hücrelerden proteini ayırmak, deneyin devamındaki adımları tamamlamak için hücreler, her bir kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi.
- 24 sa. inkübe edildikten sonra deney grupları hazırlanarak hücrelere 48 sa. muamele edildi.
- Ardından hücrelerden protein izolasyonu işlemine geçildi.

- Plaka yüzeyinde bulunan hücreler PBS ile yıkanarak tabanda hücre kalmayana kadar kazıma işlemi yapıldı.
- Kazınan hücreler tüplere alındı ve 10 dk 4 ˚C 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatantlar atıldı ve pelletin üzerine cold PBS ve proteaz inhibitör kokteyli (A.G. Scientific B1352) eklendi.
- Tüpler 10'ar dk ara ile vortekslendi, daha sonra 5'er kez ultrasonikatör (bandelin sonopuls hd 2070) ile sonike edildi.

Protein izolasyon işlemi boyunca proteinlerin denatüre olmasını engellemek amacıyla her aşamada buz kullanılarak tüpler soğutuldu.

3.6.5. BCA ile Protein Miktar Tayini

Protein miktarının belirlenmesi için kolorimetrik bir teknik olan BCA testi, ilk olarak 1985 yılında Paul K. Smith tarafından geliştirilmiştir (Smith ve ark., 1985). Bu teknik, bazik bir ortamda Cu^{2+}–protein kompleksinin oluşumunu ve ardından Cu^{2+}'nın Cu^{+}'ya indirgenmesini içeren BCA'nın bağlanma özelliklerine dayanır ve 562 nm'de güçlü absorbansa sahip mor bir son ürün elde edilir (Smith ve ark., 1985). Bu reaksiyonda üretilen renk stabildir ve geniş bir aralıkta protein konsantrasyonunun artmasıyla orantılı olarak artar. Bir çözeltideki protein konsantrasyonu, absorpsiyon spektrumlarının ölçülmesi ve bunların bilinen konsantrasyonlardaki protein çözeltilerininkilerle karşılaştırılması yoluyla ölçülebilir. BCA testinin bir avantajı alkali koşullar altında stabilitesidir ve reaktifin bakır çözeltisine dahil edilmesiyle tek adımlı bir prosedüre izin verir (Smith ve ark., 1985).

Hücrelerden izole edilen protein konsantrasyonu ölçümünde BCA protein analiz kiti (Cell Signaling 7780) kullanıldı. BCA protein analiz kiti protokole uygun olarak mikroplaka okuyucu cihazı kullanarak yapıldı.

<u>Kit içerisindeki hazırlanacak solüsyonlar:</u>

- Uyumluluk reaktifi solüsyonu hazırlamak için; uyumluluk reaktifi tüpüne 100 µl tampon solüsyonundan ilave edildi. Ardından 15-20 kez pipetleme yapılarak karıştırıldı.

- BCA çalışma reaktifi hazırlamak için, 1 birim BCA Reaktifi-A ile 50 birim BCA Reaktifi-B karıştırıldı. Bu karışımın sonucunda elma yeşili bir renk gözlendi.

- Standart BCA solüsyonları hazırlamak için, Stok BCA (2 mg/ml) çözeltisinden protokol gösterildiği ve toplam 5 farklı konsantrasyon (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 mg/ml) olacak şekilde dilüsyon serisi hazırlandı.

Protokole göre prosedür:

- Her kuyucuğa iki tekrarlı olmak üzere standart BCA ve örnekler eklendi.
- Sadece örneklerin üzerine Uyumluluk Reaktifi Solüsyonu eklendi.
- Plakanın üzeri kapatıldıktan sonra, çalkalayıcıda 1 dk. orta hızda bekletildi ve 15 dk. İnkübasyona bırakıldı.
- İnkübatörden çıkarıp Çalışma Reaktifi bütün kuyulara ekledikten sonra tekrar 2 dk. çalkalayıcıya bırakıldı ve 30dk. inkübe edildi.
- 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- 562 nm'de mikroplaka okuyucu kullanılarak absorbansı ölçülerek protein miktarı belirlendi. Her bir örnekten eşit miktarda protein alınabilmesi için, gerekli hesaplamalar yapıldı.

3.6.6. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 Proteinlerinin Tayin Kitleri

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), biyolojik numunelerdeki antijenlerin varlığını belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Diğer immünolojik analizlere benzer şekilde ELISA, yüksek düzeyde spesifik antikor-antijen etkileşimleri yoluyla bir hedef antijeni tespit etmek için antikorlara dayanır. Bir ELISA testi sırasında, antijen katı bir yüzeye doğrudan ya da daha önce yüzey üzerinde immobilize edilmiş bir yakalama antikorunun kullanılması yoluyla tutturulur. Daha sonra antijen, bir enzim veya bir florofor gibi tespit için uygun bir molekülle konjuge edilen bir tespit antikoruyla kompleksler oluşturur (Perlmann H. ve Perlmann P., 1994).

Bu çalışmada, Kaspaz-3 (SRB 20230721), Kaspaz-9 (SRB 202307), Bax (SRB 202307) ve Bcl-2 (USCN L230904376) ELISA test kitleri kullanıldı ve aşağıdaki protokole göre çalışıldı.

Kit içerisindeki hazırlanacak solüsyonlar:

-Standart solüsyonları hazırlamak için, stok çözeltisinden protokolde gösterildiği gibi dilüsyon serisi hazırlandı.

-Yıkama solüsyonu hazırlamak için, kit içerisindeki washing concentre, distile su ile 30:1 karışımı hazırlandı.

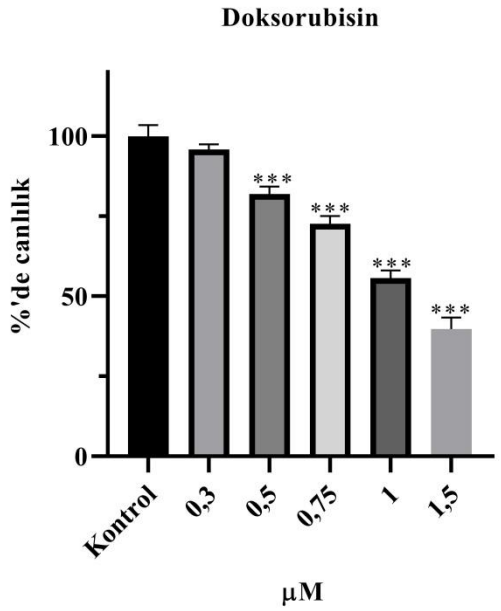
Protokole göre prosedür:

- Standart ve örnekler kit plağına uygulandı ve her birinin üzerine teste ait antibodyler eklendi. Plakanın üzeri ışık geçirmez bant ile kapatılıp 60 dk. inkübatöre yerleştirildi.
- Plaka inkübatörden çıkarılıp 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Üzerlerine 50 µl kromogen A sonrasında 50 µl kromogen B solüsyonları eklendi
- Plakanın üzeri kapatıldıktan sonra, çalkalayıcıda 1 dk. orta hızda bekletildi ve 10 dk. inkübatöre yerleştirildi.
- İnkübatördan çıkarıp 50 µl stop solüsyonu bütün kuyulara eklendi ve 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- 450 nm'de mikroplaka okuyucu kullanılarak absorbansı ölçüldü ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. SRB HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

HeLa hücrelerinde, kontrol grubuna karşı Dox, CHD ve CHM'nin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki 48 sa.'lik etkilerini değerlendirmek amacıyla SRB deneyi yapıldı (Şekil 4.1; 4.2; 4.3).

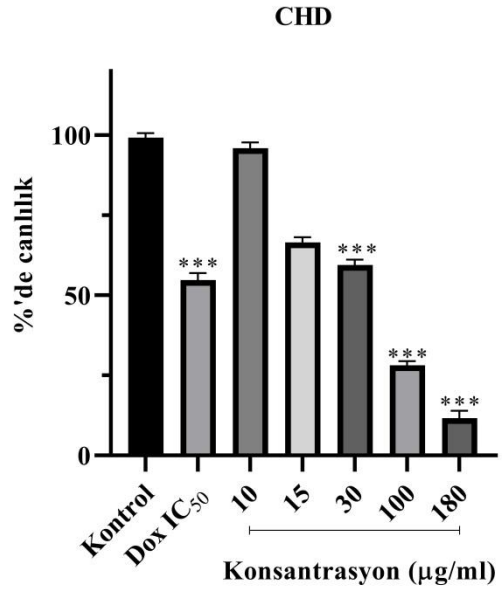


Şekil 4.1. Dox'un HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri.

GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

Dox'un HeLa hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.1'de verildi. Dox; 0,3; 0,5; 0,75; 1 ve 1,5 µM konsantrasyonlarda 48 sa. süre ile uygulandı. Canlılığı 0,5 ($p<0,001$), 0,75 ($p<0,001$), 1 ($p<0,001$) ve 1,5 µM ($p<0,001$) konsantrasyonlarda %80'in altına düşürdüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında, konsantrasyon

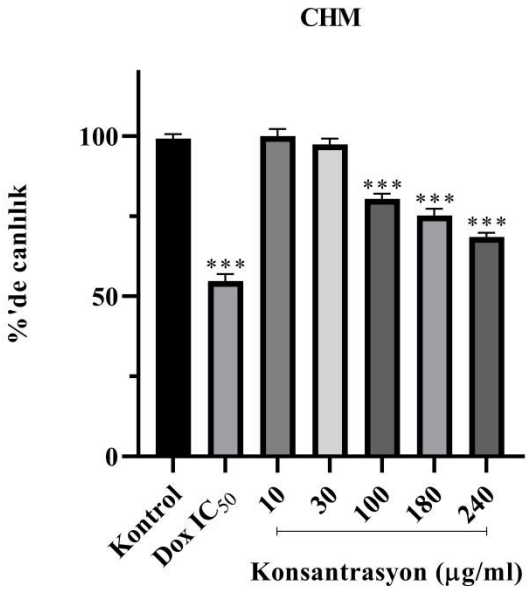
artışına bağlı olarak canlılıkta azalma izlendi. Canlılıktaki azalma 0,3 µM konsantrasyon için kontrole göre anlamlı bulunmadı. IC_{50} değeri 1,01 µM olarak hesaplandı.



Şekil 4.2. CHD'nin HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri.

GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CHD: *C. lycaonica* herba diklorometan ekstresi, Dox IC_{50}: Hücrelerin yarısını öldüren doksorubisin miktarı (1,01 µM) .

CHD'nin HeLa hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.2'te verildi. CHD, HeLa hücrelerine 10; 15; 30; 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarda 48 sa. süre ile belirlediğimiz Dox IC_{50} değeri ile birlikte uygulandı. Canlılığı 30 ($p<0,001$); 100 ($p<0,001$) ve 180 µg/ml ($p<0,001$) konsantrasyonlarda %70'in altına düşürdüğü ve bu konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü. Bu konsantrasyon aralığında, konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılıkta azalma izlendi. 10 µg/ml konsantrasyonu için kontrole göre hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmadı ve 15 µg/ml konsantrasyonda %80'in altına düşürdüğü görüldü. SRB deney sonuçlarına göre CHD'nin 48 sa. IC_{50} değeri 39,27 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).



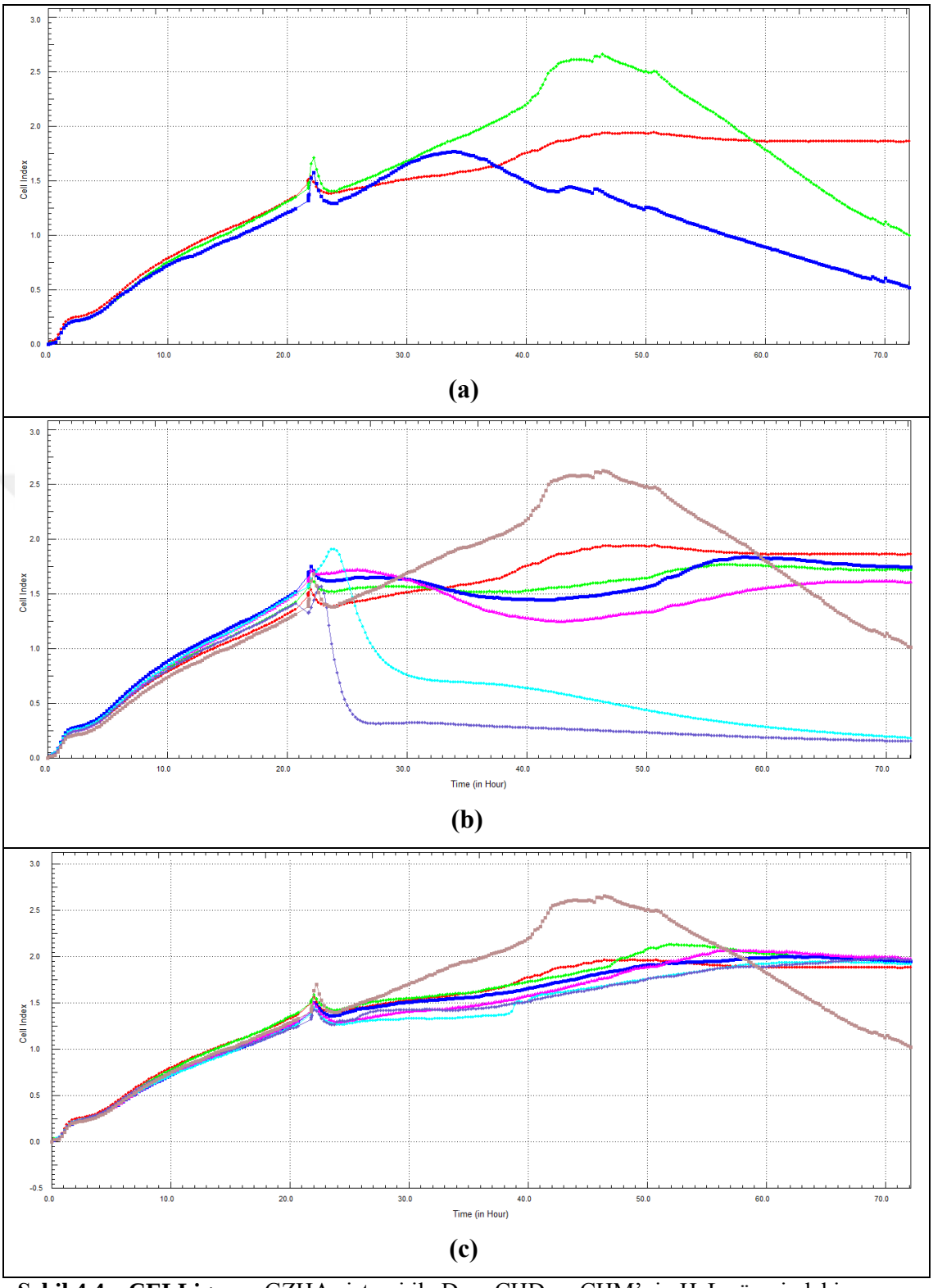
Şekil 4.3. CHM'nin HeLa hücre canlılığı üzerine etkileri.

GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CHM: *C. lycaonica* herba metanol ekstresi, Dox IC_{50}: Hücrelerin yarısını öldüren doksorubisin miktarı (1,01 µM) .

CHM'nin HeLa hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.3'te verildi. CHM, 10; 30; 100; 180 ve 240 µg/ml olmak üzere beş farklı konsantrasyonda 48 sa. süre ile belirlediğimiz Dox IC_{50} değeri ile birlikte uygulandı. Canlılığı 100 ($p<0,001$) ve 180 µg/ml ($p<0,001$) konsantrasyonlarda %80'in altına düşürdüğü ve 240 µg/ml ($p<0,001$) konsantrasyonda hücre canlılığını %68,53'e düşürdüğü görüldü. Bu konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışına bağlı olarak canlılıkta azalma izlendi. Canlılık, 10 ve 30 µg/ml konsantrasyonları için kontrole göre anlamlı azalmadı. IC_{50} değeri 516,50 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).

4.2. GZHA SİSTEMİ BULGULARI

Yapılan SRB analizi sonuçlarının teyiti hücre canlılığındaki değişikliklerin gerçek zamanlı olarak değerlendirilmesi amacıyla Dox, CHD ve CHM ile xCELLigence GZHA deneyi yapıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. xCELLigence GZHA sistemi ile Dox, CHD ve CHM'nin HeLa üzerindeki konsantrasyon ve zamana bağlı 48 sa. etkisi.

(a) Dox: Kırmızı: Kontrol, Yeşil: 1,00 µM, Lacivert: 1,50 µM. (b) CHD: Kırmızı: Kontrol, Yeşil: 10 µg/ml, Lacivert: 15 µg/ml, Pembe: 30 µg/ml, Turkuvaz: 100 µg/ml, Mor: 180 µg/ml, Kahverengi: Dox 1,00 µM. (c) CHM: Kırmızı: Kontrol, Yeşil: 10 µg/ml, Lacivert: 30 µg/ml, Pembe: 100 µg/ml, Turkuvaz: 180µg/ml, Mor: 240 µg/ml, Kahverengi: **CHD: *C. lycaonica* herba diklorometan ekstresi, CHM: *C. lycaonica* herba metanol ekstresi**, Dox: Doksorubisin.

Dox'un HeLa hücrelerinin canlılığına 48 sa. olan etkisi xCELLigence GZHA sistem kullanmasıyla Şekil 4.4(a)'da verildi. Dox'un 48 sa. Uygulamada SRB sonucuna göre belirlenen IC_{50} değerine yakın olan 1,00 ve 1,50 µM konsantrasyonlarda, sitotoksik etkiye sahip olduğu ve konsantrasyon artışına bağlı canlılıkta azalma görüldü. Bu sonuç, SRB deneyi ile uyumlu bulundu.

CHD'nin HeLa hücrelerinin canlılığına 48 sa. olan etkisi xCELLigence GZHA sistem kullanmasıyla Şekil 4.4(b)'ta verildi. CHD'in 48 sa. uygulaması ve Dox IC_{50} (SRB sonuçlarına göre belirlendi) ile karşılaştırıldığında, 10 ve 15 µg/ml'de hücre canlılığını azalttığı 30, 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarında ise sitotoksik etki gösterdiği gözlendi. Hücre canlılığındaki azalış konsantrasyon artışıyla doğru orantılı bulundu. CHD'nin 48 sa. IC_{50} değeri 60,89 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1)

CHM'nin HeLa hücrelerinin canlılığına 48 sa. olan etkisi xCELLigence GZHA sistem kullanmasıyla Şekil 4.4(c)'de verildi. CHM'in 48 sa. uygulamada ve Dox IC_{50} (SRB sonuçlarına göre belirlendi) ile karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki azalış konsantrasyon artışıyla doğru orantılıdır. Bu sonuç SRB deneyi ile de doğrulandı.

SRB ve xCELLigence GZHA yazılımı ile hesaplanan CHD ve CHM uygulamalarının 48 sa. IC_{50} değerleri, Tablo 4.1'de gösterildi. SRB analizi ile elde edilen veriler, xCELLigence GZHA sistemi ile yapılan analiz sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Tablo 4.1. Dox, CHD ve CHM'nin SRB ve xCELLigence GZHA sistemi ile belirlenen 48 sa. IC_{50} değerleri

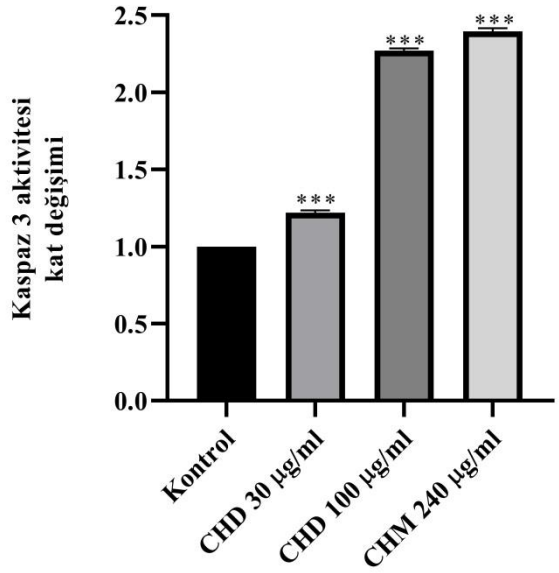
Örnek adı	GZHA IC_{50} değeri	SRB IC_{50} değeri
CHD	60,89 µg/ml	39,27 µg/ml
CHM	-	516,50 µg/ml

4.3. BCA İLE PROTEİN MİKTAR TAYİN BULGULARI

BCA protein ölçüm kiti kullanılarak, her bir örneğin protein miktarı bikinkoninik asit yöntemine göre ölçüldü ve sonraki aşamada kullanılan ELISA kitlerinde, her bir kuyuya yüklenen protein konsantrasyonu 25 µg/µl olarak hesaplandı.

4.4. KASPAZ-3 TAYİNİ BULGULARI

HeLa hücre hattı üzerinde kullanılan *C. lycaonica* ekstrelerinin apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Kaspaz-3 (SRB, 20230721) ELISA test kiti kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



Şekil 4.5. HeLa üzerinde Kaspaz-3 aktivitesi kat değişimi.

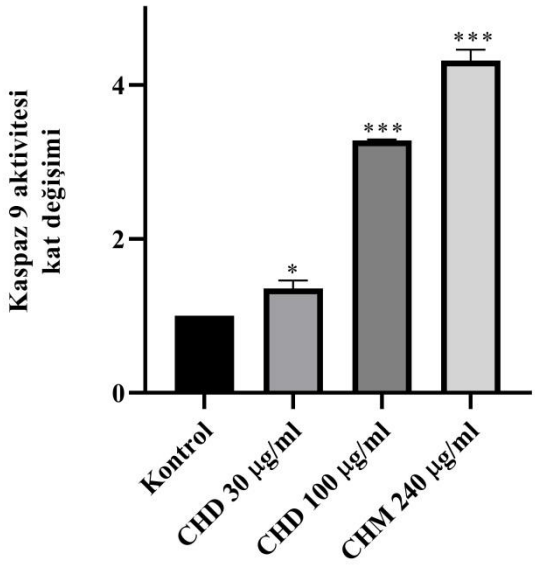
GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CHD: *C. lycaonica* herba diklorometan ekstresi, CHM: *C. lycaonica* herba metanol ekstresi.

CHD ve CHM'nin HeLa üzerindeki kontrole kıyasla Kaspaz-3 aktivite değişimi Şekil 4.5 ve Tablo 4.2'de verildi. CHD 30 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Kaspaz-3 değerinin kontrole kıyasla sırasıyla 1,22 ve 2,27 kat arttığı gözlendi. CHM 240 µg/ml konsantrasyonunda ise değerin 2,40 kat arttığı bulundu (Tablo 4.2). Her iki ekstrenin de kendi içinde kontrole göre Kaspaz-3 değerini çok yüksek istatistiksel anlamlı olarak artırdığı ve konsantrasyon değişimine orantılı bir şekilde

yükseliş meydana getirdiği görüldü. Ekstreler arasında CHM'deki artışın daha fazla olduğu tespit edildi.

4.5. KASPAZ-9 TAYİNİ BULGULARI

HeLa hücre hattı üzerinde kullanılan *C. lycaonica* ekstrelerinin apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Kaspaz-9 (SRB, 202307) ELISA test kiti kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



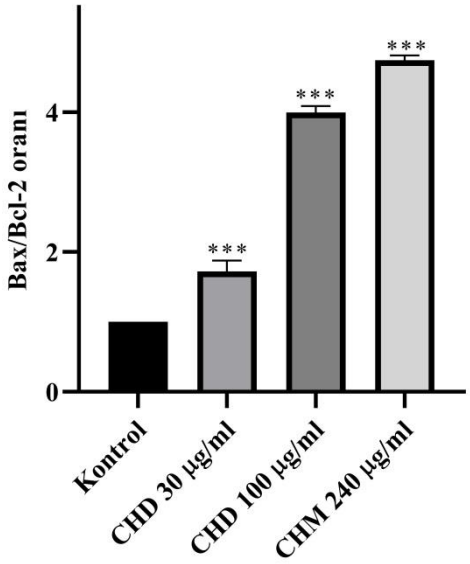
Şekil 4.6. HeLa üzerinde Kaspaz-9 aktivitesi kat değişimi.

GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CHD: *C. lycaonica* herba diklorometan ekstresi, CHM: *C. lycaonica* herba metanol ekstresi.

CHD ve CHM'nin ait kontrole kıyasla Kaspaz-9 aktivite değişimi Şekil 4.6 ve Tablo 4.2'de verildi. CHD 30 ve 100 µg/ml dozlarının Kaspaz-9 aktivitesini sırası ile 1,36 ve 3,28 kat artırdığı bulundu. CHM 240 µg/ml konsantrasyonundaki Kaspaz-9 değişimi ise 4,28 şeklinde bulundu. CHD'nin artışı kendi içinde anlamlı olmakla birlikte konsantrasyona bağımlı bir şekilde yükseliş gösterdi (Tablo 4.2). Ekstreler arasında CHM'deki artışın daha fazla olduğu tespit edildi.

4.6. BAX/BCL-2 TAYİNİ BULGULARI

HeLa hücre hattı üzerinde kullanılan *C. lycaonica* ekstrelerinin apoptotik etki mekanizmasının araştırılması amacıyla Bax (SRB, 202307) ve Bcl-2 (USCN, L230904376) ELISA test kitleri kullanılarak deneyler yapıldı ve incelendi.



Şekil 4.7. HeLa üzerinde Bax/Bcl-2 oranı.

GraphPad Prism 8.3.0 programında One-way ANOVA ve *post-hoc* Dunnett testi ile analiz edildi. Gruplar kontrole göre kat değişim olarak verildi. p değeri <0,05. Anlamlılık aralığı; ***<0,001 (n=3). Sonuçlar, ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu. CHD: *C. lycaonica* herba diklorometan ekstresi, CHM: *C. lycaonica* herba metanol ekstresi.

Yapılan deneyler sonucunda elde edilen Bax ve Bcl-2 aktiviteleri birbirine oranlandı ve kontrole kıyasla değişimleri Şekil 4.7 ve Tablo 4.2'de verildi. Verilere göre tüm sonuçlarda çok yüksek istatistiksel anlamlı olarak artış gözlendi. CHD'de konsantrasyon arttıkça Bax/Bcl-2 oranın yükseldiği görüldü. CHD 30 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında oran kontrole kıyasla sırasıyla 1,72 ve 3,46 kat arttı. CHM 240 µg/ml konsantrasyonu ise 4,74 kat artış görüldü (Tablo 4.2). İki ekstre arasında CHM ekstresindeki artış daha yüksek bulundu.

Tablo 4.2. CHD ve CHM'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9 kat değişimi ile Bax/Bcl-2 oranın değilşimi.

Örnek adı	Kaspaz-3 kat değişimi	Kaspaz-9 kat değişimi	Bax/Bcl-2 oran değişimi
CHD 30 µg/ml	+1,22	+1,36	+1,22
CHD 100 µg/ml	+2,27	+3,28	+3,46
CHM 240 µg/ml	+2,40	+4,32	+4,74

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de İç Anadolu Bölgesi'nde endemik olarak yetişen *Centaurea lycaonica* türünün toprak üstü kısmından elde edilen metanol ve diklorometan ekstrelerinin, insan serviks karsinoma kökenli HeLa hücre hattı üzerine, potansiyel sitotoksik etkisi SRB canlılılık testi ve xCELLigence GZHA ile ve apoptotik etkisi, Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin tayini ile ELISA kitleri kullanılarak araştırıldı.

Centaurea, Asteraceae familyasına ait geniş bir bitki cinsidir. Bu cins geleneksel olarak tıbbi amaçlar için kullanılmış (Honda ve ark., 1996; Sezik ve ark., 2001). cinsin Antienflamatuvar (Garbacki ve ark., 1999; Negrete ve ark., 1984; Orallo ve ark., 1998), antipiretik (Akbar ve ark., 1995), antimalaryal (Sathiyamoorthy ve ark., 1999), antiviral (Kaıj-A-Kamb ve ark., 1991), immunolojik (Garbacki ve ark., 1999) ve vazodilatatör etki (Orallo ve ark., 1998) gibi pek çok farklı özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, *Centaurea* cinsinin farklı türlerinin kanserle mücadelede önemli bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir (Artun ve ark., 2016; Artun ve Karagöz, 2021; Bakr ve ark., 2016; Ceyhan ve ark., 2019; Grafakou ve ark., 2022; Ozcan ve ark., 2016; Petropoulos ve ark., 2020; Sen ve ark., 2015; Yıldırım ve ark., 2022). Aynı zamanda, *Centaurea* cinsi ekstre ve bileşenlerinin HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla çok sayıda çalışma bulunmaktadır. (Ahmed ve kamel, 2014; Alper ve ark., 2019; Beltagy, 2015; Bulut ve ark., 2021; Csapi ve ark., 2010; Csupor ve ark., 2009; Demirtas ve ark., 2013; Erenler ve ark., 2016; Erol ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012; Grafakou ve ark., 2022; Guvensen ve ark., 2019; Kayacan ve ark., 2018; Kebbi ve ark., 2021; Köksal, 2014; Uzun ve ark., 2017; Yaglioglu ve ark., 2014). Bununla birlikte, *C. lycaonica* türüne ait ekstre ve bileşenlerinin HeLa hücreleri

üzerindeki sitotoksik ve potansiyel antikanser etki mekanizmalarını değerlendirmek amacıyla literatürde henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmanın temeli de buradaki açığa dayanmaktadır.

Centaurea türlerinin, HeLa hücre hattındaki sitotoksisitenin tespiti ve değerlendirilmesi için yapılan araştırmalarda MTT, WST-1, SRB ve xCELLigence GZHA gibi toplamda beş farklı analiz yöntemi kullanıldığı literatürde yer almaktadır. Yapılan 22 araştırma çalışmasından 13'ünde MTT metodu (Ahmed ve Kamel, 2014; Alper ve Güneş, 2019; Artun ve ark., 2016; Bakr ve ark., 2016; Csapi ve ark., 2010; Csupor ve ark., 2009; Erol ve ark., 2011; Forgo ve ark., 2012; Grafakou ve ark., 2022; Guvensen ve ark., 2019; Sen ve ark., 2015; Uzun ve ark., 2017; Yıldırım ve ark., 2022), 2'sinde xCELLigence GZHA (Bulut ve ark., 2021; Kayacan ve ark., 2018); 1'inde MTT metodu ile birlikte xCELLigence GZHA (Artun ve Karagöz, 2021); 3'ünde BrdU hücre proliferasyonu deneyi (Demirtas ve Sahin, 2013; Erenler ve ark., 2016; Yaglioglu ve ark., 2014); 2'si SRB hücre canlılığı testi (Beltagy, 2015; Kebbi ve ark., 2021), 1'inde WST-1 testi (Köksal, 2014) kullanılmıştır. Çalışmaların 14'ünde *Centaurea* türlerinin antiproliferatif aktivitesinden sorumlu olan bitki kısmının, toprak üstü kısmı olduğu görüldü (Ahmed ve Kamel, 2014; Artun ve ark., 2016; Artun ve Karagöz, 2021; Bakr ve ark., 2016; Beltagy ve ark., 2015; Csupor ve ark., 2009; Erenler ve ark., 2016; Forgo ve ark., 2012; Guvensen ve ark., 2019; Kayacan ve ark., 2018; Kebbi ve ark., 2021; Köksal, 2014; Sen ve ark., 2015; Yıldırım ve ark., 2022). 14 araştırma çalışmasından 10'unda bitki ekstresi hazırlamak için çözücü olarak metanolün tercih edildiği (Artun ve ark., 2016; Artun ve Karagöz, 2021; Bakr ve ark., 2016; Csapi ve ark., 2010; Erenler ve ark., 2016; Forgo ve ark., 2012; Kayacan ve ark., 2018; Köksal, 2014; Sen ve ark., 2015; Yıldırım ve ark., 2022;) gözlemlendi. Literatürde, *Centaurea* türüne ait HeLa hücre hattı üzerinde diklorometan ekstresinin araştırıldığı bir çalışma bulunmaktadır (Şanal, 2016). Yapılan çalışmada *C. virgata* bitkisinin gövde kısmı 4 farklı ekstrelerin HeLa hücre hattı üzerinde dört farklı konsantrasyonda (5, 25, 50, 100 µg/ml) antikanser aktiviteleri incelendi. Çalışmanın sonucunda HeLa için en etkili ekstrenin diklorametan ekstresi olduğu gözlendi (Şanal, 2016). Literatürde, *Centaurea* türüne ait farklı hücre hatlarında sitotoksisitesinin araştırıldığı az çalışma olduğu bilinmektedir (Yirtici ve ark., 2017).

C. fenzlii bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan diklorometan ekstresinin MCF-7 meme kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri MTT testi kullanarak 48 sa. IC_{50} değeri 122,521 µg/ml olarak bulunmuştur (Yirtici ve ark., 2017).

Literatürde *Centaurea* türüne ait sitotoksik etkiden sorumlu metanol ekstresi olduğu göz önüne alınarak, tarafımızca yapılan çalışmada *C. lycaonica*'dan hazırlanan metanol ekstresi seçildi. Literatürde, *Centaurea* türüne ait HeLa hücre hattı üzerinde antikanser etkiden sorumlu diklorometan ekstresinin araştırıldığı çalışma göz önüne alınarak tarafımızca yapılan çalışmada diklorometan ekstresi seçildi ve metanol ekstresinden daha etkili olduğu ve sitotoksisitesinin apopototik yolaklar üzerindeki etkisine bağlı olduğu ortaya koyuldu.

SRB, hücrelerin canlılığını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, hücrelerin çeşitli koşullara nasıl yanıt verdiğini değerlendirmek için oldukça hassas bir şekilde tasarlanmıştır (Orellana ve Kasinski, 2016). SRB deneyinin çalışmada tercih edilme nedeni; basit, hassas, ucuz ve formazana dayalı deneylere göre daha iyi bir sinyal-gürültü oranı vermesidir (Keepers ve ark., 1991). *Centaurea* bitkisinin HeLa kanser hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için SRB yöntemi kullanılan literatürde yer alan iki araştırma vardır (Beltagy, 2015; Kebbi ve ark., 2021). *C. scoparea* Sieb türünün toprak üstü kısımlarına ait ham etanol (%95) ekstrelerinin HeLa hücre hattındaki sitotoksitesi SRB testi ile belirlenmiştir. IC_{50} değerinin 24 sa. maruziyet için 27,5 ± 2,77 µg/ml olduğu tespit edilmiştir (Beltagy, 2015). Bu tez çalışmasında, HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisini SRB testi kullanarak CHD'nin IC_{50} değeri 39,27 µg/ml ve CHM'nin IC_{50} değeri 516,50 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1).

Forgo ve ark. (2012) *C. jacea* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarına ait metanol ekstresinden partisyon yöntemiyle kloroform ekstresi elde etmiş ve ekstreden izole edilen 14 bileşiğin MTT metoduyla HeLa hücre hattına olan antitümör etkisi incelenmiştir. İzole edilen bileşikler arasında en yüksek aktiviteye sahip bileşiğin 0,08 µM IC_{50} değerleri ile bir flavonoid olan centaureidin olduğu saptanmıştır. *C. omphalotricha* bitkisinin toprak üstü kısımlarının kloroform ekstresinden izole edilen üç farklı seskiterpen laktonun HeLa hücre hattındaki sitotoksik etkisi SRB testi ile belirlenmiştir. 24 sa. maruziyette aktivitesi en yüksek olan bileşiğin 18 µM

IC_{50} değeri ile centaurolid-B bileşiği olduğu tespit edilmiştir (Kebbi ve ark., 2021). Bu çalışma, *Centaurea* cinsine ait aktif bileşenlerin HeLa hücre hattında sitotoksik etkiye sahip olabileceğini gözler önüne sermektedir. *C. lycaonica* türünün içerdiği bileşikler belirlendiğinde, sitotoksisiteye neden olabilecek maddelerin tespiti, bu etkinin anlaşmasında ve literatürde yer alan aynı cinsten izole edilen bileşiklerle değerlendirilmesinde önemli bir rol oynayacaktır.

Son yıllarda gerçek zamanlı olarak hücre canlılığındaki değişikliklerinin izlenmesinde xCELLigence GZHA sistemi sık kullanılan yöntemlerden biridir (Yılmaz ve Özdemir, 2024; Elgun ve Merdan, 2023; Akkülah ve ark., 2023). xCELLigence GZHA sistemi, elektrot tabanlı sensörler sayesinde, hücrelerin adezyonu, proliferasyonu ve invazyonu gibi dinamik süreçlerin sürekli olarak izlenmesini sağlar. Bu sistem, özellikle bitki ekstrelerinin veya bileşenlerinin hücreler üzerindeki etkilerini hızlı ve doğru bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe etme, apoptozu indükleyebilme ve hücre invazyonunu azaltma gibi çeşitli etkilerini ortaya koyabilme imkanı sağlamaktadır (Kho ve ark., 2015). *Centaurea* türlerinin HeLa hücre üzerinde biyolojik etkilerini değerlendirmek için xCELLigence GZHA sistemi kullanıldığı sadece üç araştırma vardır (Artun ve Karagöz, 2021; Bulut ve ark., 2021; Kayacan ve ark., 2018). Çalışmalardan biri, *C. nerimaniae* türünün toprak üstü kısmı %95'lik metanol ekstresinin HeLa hücre hattındaki sitotoksik etkisini xCELLigence GZHA sistemi kullanarak saptamıştır. Çalışmadaki ekstrenin IC_{50} değeri 48 sa. maruziyet için 1,42 mg/ml olarak bulunmuştur (Kayacan ve ark., 2018). Tarafımızca yapılan çalışma ile Kayacan ve ark., (2018) *C. nerimaniae* türü ile yapılan çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde bitki kısmı ve aynı metotlar kullanılmış olup *C. lycoanica* türünün 60,89 µg/ml ile çok daha düşük IC_{50} değerine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.1). Ancak bitki türü ve ekstre eldesinde kullanılan çözücüye bağlı farklılık olabileceği düşünülmekte olup doğrudan kıyaslama yapılamamaktadır.

Literatürde yer alan bir diğer çalışma, *C. hermannii*'nin toprak üstü kısmı %95'lik metanol ekstresinin HeLa hücre hattındaki potansiyel sitotoksik etkisi xCELLigence GZHA kullanılarak incelenmiş ve 48 sa. için IC_{50} değeri 18,3 µg/ml olarak bulunmuştur (Artun ve Karagöz, 2021). Tarafımızca yapılan çalışmada, *C. hermanni* türü ile yapılan çalışma sonuçlarına bakıldığında, aynı metot kullanılarak *C.*

lycoanica türünün 48 sa. için IC_{50} değeri hesaplanmadı (Tablo 4.1). Sonuçlardaki farklılığın nedeni ekstre elde ediliş yöntemine ve hücre pasajına bağlı olarak farklı olabildiği sonucuna varıldı.

C. derderiifolia bitkisinin yaprak ve tohumlarının metanol, kloroform, metanol-kloroform ekstrelerinin potansiyel sitotoksik etkileri, xCELLigence GZHA sistemi kullanarak araştırılmış ve IC_{50}<50 µg/ml ile en yüksek etkinin yaprak kısmının kloroform ekstresinde olduğu sonucu ortaya çıkarılmıştır (Bulut ve ark., 2021). Tarafımızca yapılan çalışmada, xCELLigence GZHA sistemi kullanarak HeLa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etki, CHD'nin IC_{50} değeri 60,89 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1) ve CHM'nin IC_{50} değeri belirlediğimiz konsantrasyonlardan daha yüksek olduğu için hesaplanmadı. *C. derderiifolia*'da toprak üstü kısmın tarafımızca olan çalışmada olduğu gibi araştırıldığı ve potansiyel sitotoksik etki gösterecek bileşenlere sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak, bitki ekstresindeki çözücü farklılığına bağlı olarak doğrudan kıyaslama yapılamamaktadır.

Apoptoz, normal hücre döngüsünün ayrılmaz bir parçası olarak hücrelerin programlanmış ölümüdür. Sağlıklı hücrelerde, apoptoz süreci, hücrelerin yaşamlarının sona ermesi gerektiğinde, örneğin hasarlı, yaşlanmış veya enfekte olmuş olduklarında, doğal olarak başlatılır. Bu, hücrelerin kontrolsüz büyümesini önler ve organizmanın homeostazını korur. Ancak, kanser hücreleri genellikle apoptoz mekanizmalarını devre dışı bırakarak aşırı büyümeye ve yayılmaya yol açmaktadır. Kanser hücrelerinde apoptozun inhibe edilmesi veya azaltılması, tümör büyümesinin ve metastazın artmasına katkıda bulunabilir. Bu, kanserin agresifliğini ve direncini artırabilir, tedaviye karşı daha az duyarlı hale getirebilir. Dolayısıyla, kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmalarının anlaşılması ve hedeflenmesi, kanser tedavisinde önemli bir alanı oluşturur (Kari ve ark., 2022). Apoptotik aktiviteyi ölçmenin birkaç farklı yöntemi vardır. Ancak, son yıllarda, hücre hatlarında apoptotik aktiviteyi ölçmenin en yaygın ve güvenilir yöntemlerinden biri olarak kabul edilen bir teknik öne çıkmıştır: Kaspaz aktivitesi ölçümü. Kaspazlar, apoptozun başlatılması, ilerlemesi ve tamamlanması için temel moleküler işlemcilerdir. Bu enzimler, hücre içindeki belirli substratları parçalayarak apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla, kaspaz aktivitesi, hücredeki apoptotik sürecin doğrudan bir göstergesi olarak kabul edilir (Kari ve ark., 2022).

Kaspazların aktive edilmesiyle, hücre içinde apoptoza özgü değişiklikler meydana gelir. Kaspaz aktivitesi sonucunda, apoptotik hücreler küçülmeye başlar ve makrofaj yanıtını işaret eden plazma membranı değişiklikleri geçirir (Gökhan ve ark., 2020). Kaspazlar (sistein aspartil özgül proteazlar), hedef proteinleri kesen bir sistein proteinlerdir. Kaspaz proteaz aktivitesi, başarılı apoptoz için çok önemli olup çeşitli proteinleri keserler. Dört başlatıcı kaspaz (Kaspaz-2, -8, -9, 10) ve üç infazcı kaspaz (Kaspaz-3, -6, -7) bulunmaktadır. İnfazcı kaspazlar, sonunda hücrenin ölümüne yol açan hedef proteinleri keserler (Sahoo ve ark., 2023). Tarafımızca yapılan çalışmada, intrinsik yoldaki başlatıcı kaspaz olan Kaspaz-9 ve hücresel substratların kesiminden sorumlu kaspazlardan Kaspaz-3'ün protein tayini yapılarak CHD ve CHM'nin apoptoza etkisi değerlendirildi (Şekil 4.5; 4.6). İkisinin seviyelerinde kontrol grupunda kıyasladığımızda artış izlendi.

Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri olan Bcl-2 ilişkili X protein (Bax) ve Bcl-2 homolog antagonist öldürücü (Bak) proteinlerinin inhibisyonu yoluyla apoptozu engeller (Zaman ve ark., 2014). Bcl-2 proteininin aşırı ifadesi, tipine bakılmaksızın tüm kanserlerin yarısından fazlasında bulunmaktadır. Bu, bazı antikanser ilaçları da içeren herhangi bir içsel apoptotik uyarıcıya dirençli tümör hücrelerine yol açar (Pfeffer ve Singh, 2018). Genel olarak, bir antikanser ajanı kanser hücrelerinde apoptozu indüklemeyi başardığında, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin seviyelerinde azalma ve pro-apoptotik proteini (Bax) seviyelerinde artış gözlemlenmektedir (Skommer ve ark., 2010).). Tarafımızca yapılan çalışmada, Bax ve Bcl-2 proteinlerinin tayini ile ELISA kitleri kullanılarak CHD ve CHM'nin apoptoza etkisi değerlendirildi. Bax protien seviyelerinde artış gösterirken Bcl-2 protienlerin seviyelerde azalış izlendiğinden dolayı Bax/Bcl-2 oranında artış bulunmaktadır (Şekil 4.7)

Kaspaz aktivitesini ölçmenin yöntemlerden en yaygın olanı ELISA yöntemi kullanarak kaspaz enzimlerinin aktivitesini belirlemektir. Bu yöntem, hücre ölçümleri için yüksek hassasiyet, doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlar. Ayrıca, canlı hücrelerde gerçek zamanlı izleme imkanı sunar (Kari ve ark., 2022). Bundan dolayı, çalışmamızda ELISA ölçüm yöntemlerine dayalı ticari kitler tercih edildi.

C. nerimaniae 'nin toprak üstü kısımlarından metanol ekstrenin (1,42 mg/ml) HeLa hücre üzerindeki apoptotik etkisi immünhistokimya boyama yöntemi kullanılarak Kaspaz-3 aktivasyonu incelenmiş ve Kaspaz-3 aktivasyonu anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edilmiştir (Kayacan ve ark., 2018).

Bir diğer çalışmada; *C. hermannii* toprak üstü kısımlarının %95'lik metanol ekstresinin apoptotik aktivitesinin değerlendirilmesi için, HeLa hücreleri için toksik olan (100 µg/ml) konsantrasyon ve HeLa hücreleri için 48 sa. IC_{50} değeri (15,74 µg/ml) olarak iki farklı konsantrasyon uygulanmıştır. Ekstrenin Kaspaz-3, 7 ve 9'un aktivasyonuna etkisi spektroflorometrik Kaspaz aktivitesi yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, intrinsik yoldaki başlatıcı kaspaz olan Kaspaz-9'un ve hücresel substratların kesiminden sorumlu kaspazlardan Kaspaz-3 ve 7'nin de artması *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptozu intrinsik yolla indüklendiğini ortaya koymaktadır ve elde edilen sonuçlar apoptotik hücre ölümünün varlığını göstermiştir (Artun ve Karagöz, 2021). Tarafımızca yapılan çalışmada, kullanılan bitki kısmı Artun ve Karagöz (2021) tarafından yapılan çalışmadaki ile aynı olup bitki türü ve ekstre eldesinde kullanılan çözücüler farklıdır. Bununla birlikte kaspaz-3 ve 9 aktivitesindeki artış benzer görülmektedir. Bu da *Centaurea* cinsi toprak üstü kısmının, apopotoz ile ilişkili mekanizmaları etkileyerek sitotoksik etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde, HeLa üzerinde herhangi bir *Centaurea* türünün diklorometan ekstresinin apoptotik etkileri araştırıldığı çalışma bulunmamaktadır, ancak farklı hücre hatlarında (Yirtici ve ark., 2017) araştırma bulunmaktadır. *C. fenzlii* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan diklorometan ekstresi IC_{50} değerinin (122.521 µg/ml) MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine apoptotik ve nekrotik etkileri ikili boyama ile floresan mikroskobunda değerlendirilmiştir. Diklorometan ekstresinin 48 sa. uygulama sonunda; MCF-7 meme kanseri hücrelerinin genelde erken apoptoza gittikleri gözlemlenmiştir (Yirtici ve ark., 2017). Tarafımızca yapılan çalışmada Yirtici ve ark., (2017)'nın ortaya koyduğu apoptotik etki gösterilerek *C. lycaonica*'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan diklorometan ekstresinin 48 sa. IC_{50} değerinin (39,27 µg/ml) daha düşük bulunması bitki türündeki ve hücre hattındaki farklılığa bağlı olabileceği sonucuna varıldı.

Kaspaz-3 ile Kaspaz-9 aktivitesinde ve Bax/Bcl-2 oranındaki artış apoptotik bir belirteç olarak kabul edildiğinden dolayı (Klimentova ve ark., 2021), yapılan bu çalışmada, CHD ve CHM'nin potansiyel sitotoksik etkisi araştırıldıktan ve ortaya koyduktan sonra SRB (Şekil 4.2; 4.3) ve xCELLigence GZHA (Şekil 4.4) sonuçlarına göre CHD için IC_{50} değerine yakın olan ve hücre canlılığını değerlendirmede kullanılan konsantrasyon olan 30 μg/ml ve canlılık deneylerinde kullanılan IC_{50} değerinden bir üst konsantrasyon olan 100 μg/ml; CHM için ise canlılığı %70'in (Şekil 4.3) altına düşüren sitotoksik olan en yüksek konsantarasyon 240 μg/ml deney grubu olarak belirlenerek HeLa hücre hattında Kaspaz-3 ile Kaspaz-9 aktivitesi ve Bax/Bcl-2 oranı incelendi. CHD ve CHM'nin, HeLa hücre hatında Kaspaz-3 ile Kaspaz-9 aktivitesinde ve Bax/Bcl-2 oranında artışa yol açarak apoptoza neden olduğu ve serviks kanserinde potansiyel antikanser etkiye sahip olarak araştırmaların ilerletilebileceği sonucuna varıldı.

Doksorubisin, antineoplastik bir ajan olarak sınıflandırılan güçlü bir ilaçtır. Kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engelleyerek çalışır. Bu, kanserli dokunun kontrolsüz büyümesini durdurarak veya yavaşlatarak tedavi edici bir etki sağlar. Doksorubisinin kanser araştırmalarındaki kullanımı, birçok farklı türde kanserle savaşta önemli bir araç olmuştur. Özellikle meme kanseri, lösemi, lenfoma ve yumuşak doku sarkomu gibi kanser türlerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu ilaç, hem tek başına hem de diğer kanser ilaçlarıyla birlikte kullanılarak tedavi rejimlerinin bir parçası olarak kullanılmaktadır (Rivankar, 2014). Aynı zamanda, düşük dozlarda etkinliği onaylanmış olması nedeniyle araştırmacılar tarafından antikanser araştımalarda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Pandey ve ark., 2010; Wu ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2021). Tarafımızca yapılan çalışmada, SRB testi kullanarak, genel konsantrasyon taraması (Şekil 4.1) yapıldı. Sonuçlar literatüre göre (Zhang ve ark., 2021) benzer bulundu. Dox bir pozitif kontrol olarak, SRB testlerinde ve xCELLigence GZHA deneyinde 1 μM konsantrasyonunda kullanıldı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kadınlarda sıkça görülen jinekolojik kanserlerden biri olan servikal kanserin tedavisinde temel olarak cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve bu yöntemlerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Mevcut tedavilerin yetersiz kalması ve kemoterapinin hastalar tarafından düşük tolerans görmesi, yeni tedavi yöntemlerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu amaçla, tarafımızca gerçekleştirilen çalışmada, servikal kanser hücre hattı olan HeLa üzerinde *C. lycaonica* bitkisinden elde edilen diklorometan ve metanol ekstrelerinin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizması araştırıldı ve bitkiye ait potansiyel antikanser aktivite verileri ilk kez ortaya kondu. HeLa hücre hattında CHD 48 sa. için 30; 100 ve 180 µg/ml ve CHM 240 µg/ml konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdi. CHD 10; 15 µg/ml ve CHM 10; 30; 100 ve 180 µg/ml konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermedi (Şekil 4.2, 4.3). SRB testinin sonuçlarına göre; IC_{50} değerleri CHD için 39,27 µg/ml ve CHM için 516,50 µg/ml; xCELLigence GZHA sonuçlarına göre CHD için 60,89 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.1). IC_{50} değerindeki bu farklılık, hücre canlılığının ölçüldüğü metotların farklı prensiplerinin olmasından ileri gelmektedir. SRB testi, bir end-point test olarak (Vichai ve Kirtikara, 2006) hücre canlılığını ölçmeye yarayan hücreleri boya ve organik solventlerle muamele ederek spektroskopik veriler elde eden bir yöntemdir. xCELLigence sistemi ise hücre canlılığında meydana gelen değişimlerdeki bütün sürecin takibinin elektrokimyasal yolla ve gerçek zamanlı olarak yapıldığı, bir boyanın kullanılmadığı, yeni ve daha çok verinin elde edildiği bir yöntemdir (Lamarche ve ark., 2020). xCELLigence GZHA ile hücre ölümünün başlangıç zamanının ve morfolojisindeki erken değişikliklerin net tespit edilebilir olmasının yanında ölçümün hücrelere zarar vermeden yapılabilir olması üstünlüğüdür (Atmaca ve ark., 2016). Bu çalışmada, xCELLigence GZHA sisteminde CHD ve CHM'nin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etksinin, etki

mekanizmasına bağlı olarak ekstreye özgü gerçek zamanlı profili oluşturuldu. xCELLigence GZHA ile, CHD ile muamele edilen HeLa hücrelerinde artan konsantrasyona bağlı olarak apoptotik etkinin indüklendiği görüldü (Şekil 4.4). IC_{50} değerleri daha önce *Centaurea* üzerinde yapılan çalışmalar ile (Artun ve Karagöz, 2021; Beltagy, 2015; Bulut ve ark., 2021; Kayacan ve ark., 2018; Kebbi ve ark., 2021;Yirtici ve ark., 2017) karşılaştırıldığında kabul edilebilir sınırlarda olduğu, CHD ve CHM'nin sitotoksik etkiye sahip olarak belirtilen konsantrasyonlarının (CHD için 30 ve 100 µg/ml; CHM için 240 µg/ml) apoptotik hücre ölümünü Kaspaz-3, 9 aktivitesindeki ve Bax/Bcl-2 oranındaki artış ile belirgin olarak indüklediği ilk kez ortaya koyuldu.

C. lycaonica toprak üstü kısmının diklorometan ve metanol ekstresinin sitotoksik etkiye sahip olması, metanol ekstresinde fenolik bileşikler, flavonoitlerin (Ayad ve akkal, 2019; Fatullayev ve ark., 2023) ve terpenlerin (Huang ve ark., 2018) yüksek miktarda bulunmasına bağlı olup CHM'nin sitotoksik etkisinin bununla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. CHD'nin düşük IC_{50} değeri (39,27 µg/ml) ile yüksek etkinlik gösteren diklorometan ekstresinin metanol ekstresinden oldukça etkili olmasının nedeni ise, diklorometan ekstresinde yüksek miktarda seskiterpen laktonların (Cinicin gibi) ve Daucosterin molekülün içerdiğinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmaktadır (Şanal, 2016).

Sonuç olarak, kaspazlar, apoptozun erken evrelerinde aktive olarak artış apoptotik bir belirteç olarak kabul edildiğinden CHD düşük IC_{50} değeri ile sitotoksik ve apopototik etkili bir ekstre olarak servikal kanser araştırmalarında kayda değer öneme sahip olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca bitkinin toprak üstü kısmının metanolde çözünebilen kısımlarının da sitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya konulmaktadır. Bu çalışma ile ilk kez *C. lycaonica*'dan hazırlanan metanol ve diklorometan ekstrelerinin HeLa üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri saptandı. Yapılan bu çalışma, *Centaurea* cinsi ile servikal kanser hakkında Kaspaz-9 protein aktivitesi, Bax/Bcl-2 oranındaki değişikliklerin araştırıldığı araştırma olarak da bir ilk teşkil etmektedir. Literatürde bu türle yapılan çalışmayı kıyaslayabileceğimiz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İçerdiği bileşiklerin izolasyonları

tamamlandığında sitotoksik ve apoptotik etkilere neden olan maddelerin tespiti önemli bir rol oynayacaktır.

7. KAYNAKLAR

Aboul-Soud MAM, Ennaji H, Kumar A, Alfhili MA, Bari A, Ahamed M, Chebaibi M, Bourhia M, Khallouki F, Alghamdi KM, Giesy JP. Antioxidant, Anti-Proliferative Activity and Chemical Fingerprinting of *Centaurea calcitrapa* against Breast Cancer Cells and Molecular Docking of Caspase-3. Antioxidants (Basel). 2022; 11(8):1514-1525. doi: 10.3390/antiox11081514.

Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci 2001; 26:61-666.

Ahmed SA, Kamel EM. Cytotoxic activities of flavonoids from *Centaurea scoparia*. ScientificWorldJournal. 2014; 2014:274207. doi: 10.1155/2014/274207

Aissous I, Benrebai M, Ameddah S, Menad A, Erenler R, Benayache S, Benayache F. The preventive effects of *Centaurea maroccana* Ball. extract against oxidative stress induced by cisplatin in mice brains: *in vitro* and *in vivo* studies. Drug Chem Toxicol, 2023; 46(6):1162-1175. doi: 10.1080/01480545.2022.2139841.

Akkülah Şenol G, Çalişkan M, Topçul MR. Evaluation of kinetic effects of Gliotoxin in different breast cancer cell lines. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2023; 69(14):76-80. doi: 10.14715/cmb/2023.69.14.12.

Alper M, Güneş H. The Anticancer and Anti-inflammatory Effects of *Centaurea solstitialis* Extract on Human Cancer Cell Lines. Turk J Pharm Sci, 2019; 16(3):273-281. doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.27146.

Arif R, Küpeli E, Ergun F. The Biologıcal Actıvıty Of *Centaurea* L. Specıes. Gazi University Journal Of Science, 2010; 17(4):149-164.

Artun FT, Karagoz A, Ozcan G, Melikoglu G, Anil S, Kultur S, Sutlupinar N. In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology, 2016; 21(3):720-725.

Artun FT, Karagöz A. Antiproliferative and apoptosis inducing effects of the methanolic extract of *Centaurea hermannii* in human cervical cancer cell line. Biotechnic & Histochemistry, 2021; 96(1): 1-10.

Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi 2007; 22: 197- 204.

Atmaca, Harika, Bozkurt, Emir, Kısım, Aslı and Uslu, Rüçhan. "Comparative analysis of XTT assay and xCELLigence system by measuring cytotoxicity of resveratrol in human cancer cell lines" Turkish Journal of Biochemistry, vol. 2016; (41)6: 413-421. https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0128.

Ayad R, Akkal S. Phytochemistry and biological activities of algerian *Centaurea* and related genera. Studies in Natural Products Chemistry, 2019; 63(12): 357-414.

Bakr RO, Mohamed SAEH, Ayoub N. Phenolic profile of *Centaurea aegyptiaca* L. growing in Egypt and its cytotoxic and antiviral activities. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2016; 13(6): 135-143.

Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. Methods Mol Biol, 2014:1170:29-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2.Bedell SL, Goldstein LS, Goldstein AR, Goldstein AT. Cervical Cancer Screening: Past, Present, and Future. Sex Med Rev, 2020; 8(1):28-37. doi: 10.1016/j.sxmr.2019.09.005.

Beltagy AM. Chemical composition and cytotoxic activity of *Centaurea scoparea* Sieb against four human cell lines. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015; 7(3), 103-112.

Blitz S, Baxter J, Raboud J, Walmsley S, Rachlis A, Smaill F, Ferenczy A, Coutlée F, Hankins C, Money D. Canadian Women's HIV Study Group. Evaluation of HIV and highly active antiretroviral therapy on the natural history of human papillomavirus infection and cervical cytopathologic findings in HIV-positive and high-risk HIV-negative women. J Infect Dis, 2013; 208(3):454-62. doi: 10.1093/infdis/jit181.

Bouzghaia B, Moussa MTB, Goudjil R, Harkat H, Pale P. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. dufourii (dostál) greuter. Nat Prod Res, 2021; 35(22):4734-4739. doi: 10.1080/14786419.2020.1715397.

Brennan K, Offiah G, McSherry EA, Hopkins AM. Tight junctions: a barrier to the initiation and progression of breast cancer?. J Biomed Biotechnol, 2010;3: 460607. doi: 10.1155/2010/460607.

Bruno M, Modica A, Catinella G, Canlı C, Arasoglu T, Çelik S. Chemical composition of the essential oils of *Centaurea tomentella* Hand.-Mazz. and *C. haussknechtii* Boiss. (Asteraceae) collected wild in Turkey and their activity on microorganisms affecting historical art craft. Nat Prod Res, 2019; 33(8):1092-1100. doi: 10.1080/14786419.2018.1463531.

Bulut F, Demirtas I, Koldas S, Gul F, Behcet L, Ozen T, Oke Altuntas F. The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic *Centaurea derderiifolia*. Natural Product Research, 2021; 35(11): 1919-1922.

Bülent Köse Y, Işcan G, Demirci B, Başer KH, Celik S. Antimicrobial activity of the essential oil of *Centaurea aladagensis.* Fitoterapia, 2007; 78(3):253-264. doi: 10.1016/j.fitote.2006.12.002.

Cancer Research UK. (2017). Cervical cancer statistics. Erişim:[http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer statistics/statistics-by-cancer-type/cervicalcancer/risk-factors.], Erişim Tarihi 27 Ocak 2024.

Cancer Research UK. (2023). Types of Cancer. Erişim:[https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer#:~:text=For%20example%2C%20nerves%20and%20muscles,breast%20cancer%20or%20lung%20cancer], Erişim Tarihi 27 Ocak 2024.

Ceyhan Güvensen N, Keskin D, Güneş H, Kesik Oktay M, Yıldırım H. Antimicrobial property and antiproliferative activity of *Centaurea babylonica* (L.) L. on human carcinomas and cervical cancer cell lines. Ann Agric Environ Med. 2019; 26(2):290-297. doi: 10.26444/aaem/108563.

Coope G M, Hausman RE, 1-The cell A molecular Approach, 2016; 1-60535-290-2999.

Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol, 2005: 100(1-2):72-79. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.

Csapi B, Hajdú Z, Zupkó I, Berényi Á, Forgo P, Szabó P, Hohmann J. Bioactivity□ guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. Phytotherapy research, 2010; 24(11): 1664-1669.

Csupor Löffler B, Hajdú Z, Réthy B, Zupkó I, Máthé I, Rédei T, Falkay G, Hohmann J. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. Phytotherapy Research, 2009; 23(8): 1109-1115.

Çelikezen FÇ, Hayta Ş, Özdemir Ö, Türkez H. Cytotoxic and antioxidant properties of essential oil of *Centaurea behen* L. *in vitro.* Cytotechnology, 2019; 71(1):345-350. doi: 10.1007/s10616-018-0290-9.

Davis PH, Asteraceae, Şu eserde: Davis PH (ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh 1975: 5: 1

Demiroz T, Albayrak G, Nalbantsoy A, Gocmen B, Baykan S. Anti-inflammatory properties of *Centaurea calolepis* Boiss. and cnicin against Macrovipera lebetina obtusa (Dwigubsky, 1832) and Montivipera xanthina (Gray, 1849) venoms in rat. Toxicon, 2018; 152:37-42. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.07.016.

Demirtas I, Sahin A. Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. carduiformis var. carduiformis. Journal of Chemistry, 2013; 6:41-49.

Deplanche M, Filho RA, Alekseeva L, Ladier E, Jardin J, Henry G, Azevedo V, Miyoshi A, Beraud L, Laurent F, Lina G, Vandenesch F, Steghens JP, Le Loir Y, Otto M, Götz F, Berkova N. Phenol-soluble modulin α induces G2/M phase transition delay in eukaryotic HeLa cells. FASEB J, 2015: 29(5):1950-9. doi: 10.1096/fj.14-260513.

DeVita VT Jr, Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. N Engl J Med. 2012: 366(23):2207-2214. doi: 10.1056/NEJMra1204479.

Diamandopoulos GT. Cancer: an historical perspective. Anticancer Res, 1996: 16(4A):1595-1602.

Duru ME, Ceylan O, Sarac N, Varol O, Kivrak I. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Centaurea ensiformis* Hub.-Mor. (Asteraceae), a species endemic to Mugla (Turkey). Nat Prod Res, 2009: 23(2):149-167. doi: 10.1080/14786410801915770.

Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği, Ankara 2000; 975-93611-93619.

Elgun T, Merdan YE. Effect of Motiflor AS probiotic for oral health on cell viability in human gingival fibroblasts and human dental pulp stem cells. J Conserv Dent Endod, 2023; 26(6):621-626. doi: 10.4103/JCDE.JCDE_125_23.

Erdtman G. An Introduction to Pollen Analysis, Chronica Botanica Company Press, Stokholm 1954: 66-128.

Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NU, Karaalp C. Bioactivity screening of five *Centaurea species* and *in vivo* anti-inflammatory activity of *C. athoa.* Pharm Biol, 2014: 52(6):775-781. doi: 10.3109/13880209.2013.868493.

Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, Krenn L. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. Pharm Biol, 2011: 49(8):840-849. doi: 10.3109/13880209.2010.551538.

Erenler R, Sen O, Sahin Yaglioglu A, Demirtas I. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. solstitialis. Combinatorial chemistry & high throughput screening, 2016: 19(1): 66-72.

Erol Dayı Ö, Pekmez M, Bona M, Aras Perk A, Arda N. Total phenolic contents, antioxidant activities cytotoxicity of three *Centaurea* species: *C. calcitrapa* subsp. *calcitrapa, C. ptosimopappa C. spicata*. Free Radicals and Antioxidants, 2011; 1(2): 31-36.

Fatullayev H, Paşayeva L, Celik I, İnce U, Tugay O. Phytochemical Composition, *In Vitro* Antimicrobial, Antioxidant, and Enzyme Inhibition Activities, and In Silico Molecular Docking and Dynamics Simulations of *Centaurea lycaonica*: A Computational and Experimental Approach. ACS Omega, 2023: 8(25):22854-22865. doi: 10.1021/acsomega.3c01819.

Forgo P, Zupkó I, Molnár J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. Fitoterapia, 2012; 83(5): 921-925.

Gallucci BB. Selected concepts of cancer as a disease: From the Greeks to 1900. Oncol Nurs Forum,1985; 12: 67-71.

Gerstberger S, Jiang Q, Ganesh K. Metastasis. Cancer Cell, 2023: 186(8):1564-1579. doi: 10.1016/j.cell.2023.03.003.

Gilgenkrantz S. Requiem pour Henrietta [Requiem for Henrietta]. Med Sci (Paris). 2010: 26(5):529-533. French. doi: 10.1051/medsci/2010265529.

GLOBOCAN (2022). Cancer Today Dataviz. Erişim: [https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=population], Erişim Tarihi:28 Aralık 2023.

Gou J, Lu Y, Xie M, Tang X, Chen L, Zhao J, Li G, Wang H. Antimicrobial activity in Asterceae: The selected genera characterization and against multidrug resistance bacteria. Heliyon, 2023: 9(4):e14985. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14985.

Gökhan A, Kılıç KD, Gülle K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T. Apoptotic Pathways and Targeted Therapies. Med J SDU, 2020; 27(4): 565-573.

Grafakou M E, Barda C, Heilmann J, Skaltsa H. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory activities of sesquiterpene lactones from *Centaurea papposa* (Coss.) Greuter. Natural Product Research, 2022; 36(12): 3211-3215.

Guvensen N C, Keskin D, Gunes H, Oktay MK, Yildirim H. Antimicrobial property and antiproliferative activity of *Centaurea babylonica* (L.) L. on human carcinomas and cervical cancer cell lines. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2019; 26(2): 290-297.

Gürbüz I, Yesilada E. Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. solstitialis by using various *in vivo* and biochemical techniques. J Ethnopharmacol, 2007; 112(2):284-291. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.009.

Hadjira S, Mansour A, Berkel C, Seghiri R, Menad A, Benayache F, Benayache S, Cacan E, Ameddah S. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cytotoxic Properties of *Centaurea africana* Lamk var. [Bonnet] M]. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem, 2021; 20(1):89-100. doi: 10.2174/1871523019666200609140532.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. Biomed Res Int, 2014;150845. doi: 10.1155/2014/150845.

Hechaichi FZ, Bendif H, Bensouici C, Alsalamah SA, Zaidi B, Bouhenna MM, Souilah N, Alghonaim MI, Benslama A, Medjekal S, Qurtam AA, Miara MD, Boufahja F. Phytochemicals, Antioxidant and Antimicrobial Potentials and LC-MS Analysis of *Centaurea parviflora* Desf. Extracts. Molecules, 2023: 28(5):2263-2270. doi: 10.3390/molecules28052263.

Heng HH. Genomics: HeLa genome versus donor's genome. Nature. 2013: 501(7466):167. doi: 10.1038/501167d.

Heywood VH. Compositae. In: V H Heywood (Ed.), Flowering plants of the world. Oxford University Press, Oxford 1978:263-268.

Honda G, Yeşilada E, Tabata M, Sezik E, Fujita T, Takeda Y, Takaishi Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey. VI. Folk medicine in west Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydin provinces. J Ethnopharmacol, 1996: 53(2):75-87. doi: 10.1016/S0378-8741(96)01426-1432.

Huang W, Gfeller V, Erb M. Root volatiles in plant-plant interactions II: Root terpenes from *Centaurea stoebe* modify Taraxacum officinale root chemistry and root herbivore growth. bioRxiv, 2018;4: 441790.

IUCN Red List Categories. Version 3.1. Prepared by the IUCN Species Survial Commission. IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK 2001.

Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan IA. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaurea* L. species. Phytother Res, 2007; 21(5):488-491. doi: 10.1002/ptr.2097.

Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. Apoptosis, 2022: 27(7-8):482-508. doi: 10.1007/s10495-022-01735-y.

Kasinski AL, Kelnar K, Stahlhut C, Orellana E, Zhao J, Shimer E, Dysart S, Chen X, Bader AG, Slack FJ. A combinatorial microRNA therapeutics approach to suppressing non-small cell lung cancer. Oncogene, 2015: 34(27):3547-3555. doi: 10.1038/onc.2014.282.

Kayacan S, Sener LT, Melikoglu G, Kultur S, Albeniz I, Ozturk M. Induction of apoptosis by *Centaurea nerimaniae* extract in HeLa and MDA-MB-231 cells by a caspase-3 pathway. Biotechnic & Histochemistry, 2018; 93(5): 311-319.

Kebbi S, Ciavatta M L, Mahmoud AM, Carbone M, Ligresti A, Seghiri R, Gavagnin M. Sesquiterpene lactones with the 12, 8-guaianolide skeleton from Algerian *Centaurea omphalotricha*. Biomolecules, 2021; 11(7): 1053-1061.

Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. Eur J Cancer Clin Oncol, 1991; 27(7): 897-900.

Khammar A, Djeddi S. Pharmacological and biological properties of some *Centaurea* species. European Journal of Scientific Research, 2012; 84(3): 398 416.

Khan T, Ali M, Khan A, Nisar P, Jan SA, Afridi S, Shinwari ZK. Anticancer Plants: A Review of the Active Phytochemicals, Applications in Animal Models, and Regulatory Aspects. Biomolecules, 2019: 10(1):47. doi: 10.3390/biom10010047. PMID: 31892257; PMCID: PMC7022400.

Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, du Mez E, Angel CE, Graham ES. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. Biosensors (Basel), 2015: 5(2):199-222. doi: 10.3390/bios5020199.

Klimentova EA, Suchkov IA, Egorov AA, Kalinin RE. Apoptosis and Cell Proliferation Markers in Inflammatory-Fibroproliferative Diseases of the Vessel Wall (Review). Sovrem Tekhnologii Med, 2021; 12(4):119-126. doi: 10.17691/stm2020.12.4.13.

Kochetkov DV, Il'inskaia GV, Komarov PG, Strom E, Agapova LS, Ivanov AV, Budanov AV, Frolova EI, Chumakov PM. Transcriptional inhibition of human papilloma virus in cervical carcinoma cells reactivates functions of the tumor suppressor p53. Mol Biol (Mosk), 2007; 41(3):515-523.

Köksal CK. Cytotoxic and antibacterial activities of *Centaurea cadmea* Boiss. Turk J Pharm Sci, 2014;11(1):101-106.

Köse YB, İşcan G, Göger F, Akalın G, Demirci B, Başer KH. Chemical Composition and Biological Activity of *Centaurea baseri*: New Species from Turkey. Chem Biodivers, 2016: 13(10):1369-1379. doi: 10.1002/cbdv.201600070.

Kumar V, Abbas, AK, Aster JC. In: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (9th Ed). Elsevier, Philadelphia 2015:26-32.

Lamarche B, Velez J, Zhao L. Agilent Technologies, Inc. (2020). Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading xcelligence real-time cell analysis. Erişim:[https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-monitoring-cell-adhesion-and-spreading-xCELLigence-5994-1691en-agilent.pdf] Erişim Tarihi: 20 şubat 2024.

Liang Z, Xu Y, Zhang Y, Zhang X, Song J, Jin J, Qian H. Anticancer applications of phytochemicals in gastric cancer: Effects and molecular mechanism. Front Pharmacol, 2023: 13:1078090. doi: 10.3389/fphar.2022.1078090.

Lopez J, Tait SW. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. Br J Cancer, 2015: 112(6):957-962. doi: 10.1038/bjc.2015.85.

Loue S, Sajatovic M. Cervical cancer. In: Encyclopedia of Women's Health, USA 2011:144-147.

Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Arch Pathol Lab Med, 2009: 133(9):1463-7. doi: 10.5858/133.9.1463.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer, 2009: 9(3):153-66. doi: 10.1038/nrc2602.

Michael W. Davidson and The Florida State University (2015). Human Cervical Adenocarcinoma Cells (HeLa Line). Erişim: [https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/hela/helacells.html], Erişim Tarihi:19 Ocak 2024.

Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. Current Medicinal Chemistry vol:8, No:12, 2001;p.:1467- 1486.

Mutlu B, Ekici B, Kaya Z. Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Centaurea, Cyanus* ve *Psephellus* Cinslerine Ait Bazı Taksonların Bitkisel Tasarım İlkeleri Yönünden Değerlendirilmesi. PAUD- Peyzaj Uygulamaları ve Araştırmaları Dergisi, Türkiye 2023: Sayı:5(2), s. 1-16.

National Cancer Institute (2015). Risk Factors for Cancer. Erişim: [https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk], Erişim Tarihi:19 Ocak 2024.

Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2001: 41:367-401. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367.

Ok CY, Woda B, Kurian E. The Pathology of Cancer. In: Pieters RS, Liebmann J, eds. Cancer Concepts: A Guidebook for the Non-Oncologist. Worcester, MA: University of Massachusetts Medical School; 2017;3:33-45. doi: 10.7191/cancer_concepts.1023.

Orellana EA, Kasinski AL. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. Bio Protoc, 2016; 6(21):e1984. doi: 10.21769/BioProtoc.1984.

Ozcan G, Dagdeviren Ozsoylemez O, Akman G, Khalilia W, Tezel Yetiz B, Karagoz A, Melikoglu G, Anil S, Kultur S, Sutlupinar N. Screening for antitumor activity of various plant extracts on HeLa and C 4-I cell lines. J BUON, 2016: 21(6):1552-1560.

Özel E. Tehtid Altındaki *Centaurea lycaonica* Boiss.& Heldr. (Compositae) Populasyonlarındaki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi Üzerine Moleküler Bir Çalışma,. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2008.

Pandey V, Jung Y, Kang J, Steiner M, Qian PX, Banerjee A, Lobie PE. Artemin reduces sensitivity to doxorubicin and paclitaxel in endometrial carcinoma cells through specific regulation of CD24. Translational oncology, 2010: 3(4), 218-IN5.

Perlmann H, Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook, San Diego, CA, Academic Press; 1994; 3: 322-328.

Petropoulos SA, Fernandes Â, Dias MI, Pereira C, Calhelha R, Gioia FD, Tzortzakis N, Ivanov M, Sokovic M, Barros L, Ferreira ICFR. Wild and Cultivated *Centaurea raphanina* subsp. mixta: A Valuable Source of Bioactive Compounds. Antioxidants (Basel), 2020: 9(4):314-323. doi: 10.3390/antiox9040314.

Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. Int J Mol Sci, 2018: 19(2):448. doi: 10.3390/ijms19020448. PMID: 29393886; PMCID: PMC5855670.

Polat DÇ, İlgün S, Karatoprak GŞ, Akkol EK, Capasso R. Phytochemical Profiles, Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of Traditional Medicinal Plants: *Centaurea pichleri* subsp. pichleri, Conyza canadensis, and Jasminum fruticans. Molecules, 2022: 27(23):8249-8259. doi: 10.3390/molecules27238249.

Ray S. The Cell: A Molecular Approach. Yale J Biol Med, 2014: 87(4):603-4.

Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. J Cancer Res Ther, 2014: 10(4):853-858. doi: 10.4103/0973-1482.139267. PMID: 25579518.

Rowley J R, Dahl AO, Rowley J S. Substructure in exines of Artemisia vulgaris (Asteraceae), Review of Palaeobotany and Palynology, 1981; 35: 1-38.

Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK. A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. Mol Neurobiol, 2023: 60(10):5805-5837. doi: 10.1007/s12035-023-03433-5.

Salachna P, Pietrak A, Lopusiewicz L. Antioxidant Potential of Flower Extracts from *Centaurea* spp. Depends on Their Content of Phenolics, Flavonoids and Free Amino Acids. Molecules, 2021: 26(24):7465-7475. doi: 10.3390/molecules26247465.

Sargin SA. Potential anti-influenza effective plants used in Turkish folk medicine: A review. J Ethnopharmacol, 2021: 265:113319. doi: 10.1016/j.jep.2020.113319.

Scherer WF, SYVERTON JT, GEY GO. Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable stracn of human

malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med, 1953; 97(5):695-710. doi: 10.1084/jem.97.5.695.

Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. Int J Oncol, 2019;54(2):407-419. doi: 10.3892/ijo.2018.4661.

Sen A, Ozbas ST, Akbuga J, Bitiş L. In vitro Antiproliferative Activity of Endemic *Centaurea kilaea* Boiss. against Human Tumor Cell Lines. Clinical and Experimental Health Sciences, 2015;5(3): 149-153.

Sezik E, Yeşilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. J Ethnopharmacol, 2001: 75(2-3):95-115. doi: 10.1016/s0378-8741(00)00399-8.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst, 1990; 82(13):1107-1112. doi: 10.1093/jnci/82.13.1107.

Skommer J, Brittain T, Raychaudhuri S. Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. Apoptosis, 2010: 15(10):1223-1233. doi: 10.1007/s10495-010-0515-7.

Small W JR, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, Jhingran A, Kitchener HC, Mileshkin LR, Viswanathan AN, Gaffney DK. Cervical cancer: A global health crisis. Cancer, 2017; 123(13):2404-2412. doi: 10.1002/cncr.30667.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem, 1985; 150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Solowey E, Lichtenstein M, Sallon S, Paavilainen H, Solowey E, Lorberboum-Galski H. Evaluating medicinal plants for anticancer activity. ScientificWorldJournal, 2014; 721402. doi: 10.1155/2014/721402.

Steward BW, Wild CW (eds): World Cancer Report 2014. IARC Press, Lyon 2014.

Sun Y, Liu Y, Ma X, Hu H. The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. Int J Mol Sci, 2021; 22(13):6923. doi: 10.3390/ijms22136923.

Şanal S. *Centaurea Virgata* Lam. Bitkisinin Sekonder Metobolitlerinin Aktivite Yönlendirmeli İzolasyonu Ve Karakterizasyonu,. Yüksek Lisans Tezi ,Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat 2016; S.:47-49.

Treasure J. Herbal medicine and cancer: an introductory overview. Semin Oncol Nurs, 2005; (3):177-83. doi: 10.1016/j.soncn.2005.04.006.

Ugur A, Sarac N, Ceylan O, Emin Duru M. Antimicrobial activity and chemical composition of endemic *Centaurea cariensis* subsp. niveo-tomentosa. Nat Prod Res. 2010 May;24(9):861-72. doi: 10.1080/14786410903315127. PMID: 20461631.

Ugur A, Sarac N, Ceylan O, Emin Duru M. Antimicrobial activity and chemical composition of endemic *Centaurea cariensis* subsp. niveo-tomentosa. Nat Prod Res, 2010; 24(9):861-872. doi: 10.1080/14786410903315127.

Uysal T, Hamzaoğlu E. A new *Centaurea* L. (Asteraceae) species from Turkey, Plant Biosystems. An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 2017: 151(5):813-821, doi: 10.1080/11263504.2016.1211196.

Uzun K, İkiz P, Daşkın R, Gürbüz P, Yalçın F N. Cytotoxic Potentials of Some Asteraceae Plants from Turkey on HeLa Cell Line. In Proceedings, 2017: 1(10), 1068-1079.

Ünver SA. Türk tıb tarihinde kanser ve tedavisine dair. İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası, 1938: 1(5):673-678.

WFO Plant list (2023). Family Asteracea Giseke Erişim: [https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000146-2023-12?page=1], Erişim Tarihi:28 Şubat 2024.

Wu ZS, Huang SM, Wang Y C. Palmitate Enhances the Efficacy of Cisplatin and Doxorubicin against Human Endometrial Carcinoma Cells. International Journal of Molecular Sciences, 2021; 23(1): 80-89.

Yaglioglu AS, Demirtas I, Goren N. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea carduiformis* DC. Phytochemistry Letters, 2014: 8:213-219.

Yıldırım A, Şen A, Göger F, Bingöl Ö, Bitiş L. In vitro antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory activities and phenolic profile of *Centaurea saligna* (K. Koch) Wagenitz. Journal of Research in Pharmacy, 2022; 26(1): 163-173.

Yıldıztugay E. Endemik *Centaurea tuzgoluensıs* Aytaç & h. Duman ve *Centaurea lycaonica* boıss. & heldr.'nın fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine tuz stresinin etkileri, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya 2011:4-6.

Yılmaz G, Özdemir F. Novel Anti-tumor Strategy for Breast Cancer: Synergistic Role of Oleuropein with Paclitaxel Therapeutic in MCF-7 Cells. Anticancer Agents Med Chem, 2024;24(3):224-234. doi: 10.2174/0118715206284107231120063630.

Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. Leuk Lymphoma, 2014: 55(9):1980-1992. doi: 10.3109/10428194.2013.855307.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol, 2007: 302(1):1-12. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.

Zhang J, Wang R, Cheng L, Xu H. Celastrol inhibit the proliferation, invasion and migration of human cervical HeLa cancer cells through down-regulation of MMP-2 and MMP-9. J Cell Mol Med, 2021; 25(11):5335-5338. doi: 10.1111/jcmm.16488.

se_turnitin_yl

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%10	%5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%7
2	Eskiler, Gamze Guney. "Triple Negatif Meme Kanseri Tedavisinde Parp Inhibitoru Yuklu Kati Lipid Nanopartikullerin Ilac Direnc Mekanizmalarinin Asilmasindaki Rollerinin Arastirilmasi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022 Yayın	<%1
3	Eryilmaz, Isil Ezgi. "Farkli DirenC Fenotiplerine Sahip Prostat Kanseri Hucre Hatlarinda Apigenin ve Fenetil Izotiyosiyanat (PEITC) Kombinasyonu Ile Olusturulan Prooksidan Kanser Terapi Modeli Etkinliginin ve Molekuler Hedeflerinin Arastirilmasi", Bursa Uludag University (Turkey), 2022 Yayın	<%1
4	abs.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Alural, Begüm. "Bipolar Bozukluk Tanılı Hastaların Indüklenmiş Pluripotent kök	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı : Safa EMİNOĞLU

Uyruğu : T.C.

Eğitim Bilgileri

Derece / Kurum / Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans / Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü , Kayseri / 2024

Lisans / Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, KKTC / 2018

Mesleki Deneyim

Yıl / Kurum / Görev

2016-2018 / Doğu Akdeniz Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi /Laboratuvar Assistantı

2018-2019 / Al Aksa İnternatıonal Schools (İstanbul) /Laboratuvar Mesul Müdürü

2019-Devam / Masstar Dış Ticaret Ltd. (Kayseri) /İlaç İhracat Mesul Müdürü

Yabancı Diller

İngilizce, Çok İyi

Arapça, Çok İyi