



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Linum usitatissimum bitkisinden elde edilen
sekoisolarikiresinol diğlukosid maddesinin kolon
kanseri hücre hatları üzerine etkisi

MELTEM ÖZGÖÇMEN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. DİLEK BAYRAM

Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4399-D2-15 proje numarası ile desteklenmiştir

Tez. No: 160

ISPARTA - 2017

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/07/2017

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM

SDÜ, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

ÜYE: Prof. Dr. Meral ÖNCÜ

SDÜ, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

ÜYE: Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU

SDÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD

ÜYE: Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH

Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından, yapımına ve yazımına kadar geçen tüm aşamalarda herhangi bir etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki tüm bilgileri akademik ve etik kurallar dahilinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak tezin yapılması ve yazımı sırasında patent ve telif hakları ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Linum Usitatissimum Bitkisinden Elde Edilen Sekoisolarikiresinol Diglukozid Maddesinin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisi adlı doktora tezi Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez önerisi ve yazma yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Meltem ÖZGÖÇMEN

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM

İmza

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimde son basamak olan doktora sürecimin sonuna gelmiş bulunmaktayım. Öncelikle yıllar önce başladığım ilk günden beri yanımda olan, arkamı döndüğümde desteğini göreceğimden emin olduğum, hiçbir zaman tereddüt etmeden tüm bilgilerini deneyimlerini benim ile paylaşan, her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, varlığını daima hissettiren, sadece mesleki anlamda değil hayatta da attığım her adımda yanımda olacağını bildiğim, bir abla, bir arkadaş, bir eğitimci olarak her an yanımda olan sevgili danışmanım Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM' a, çalışma olanakları konusunda beni daima özgür bırakan yapabileceğim her türlü çalışma da önümü açan, yardımcı olan, desteğini hissettiren değerli Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. Meral ÖNCÜ' ye, Anabilim Dalı hocalarımdan değerli Yrd. Doç. Dr. Kanat GÜLLE' ye,

Maddi manevi her türlü desteği, arkadaşlığı, dostluğu, yakınlığı, içtenliği, merhameti, sevgisi ve daha sayamayacağım güzellikleriyle yanımda olan bölüm arkadaşlarımdan kıymetli Uzman. Dr. İlkey ARMAĞAN' a, hücre kültürü deneyi boyunca yardımcı olan, dostum, kıymetlim, sırdaşım, kardeşim, dert ortağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Gülçin TÜREL' e, bu yola aynı heyecanla, aynı kaygıyla ve korkularla başladığım, ilk günden beri benle olan kıymetli ve değerli dostum Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör. Dilek AŞCI ÇELİK' e, İstinye Üniversitesi'nde görev yapan değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Hakan DARICI' ya, Alanya Alaattin Keykubat Üniversitesi'nde görev yapan değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Aydın CANDAN'a ve daha ismini saymadığım bir şekilde yardımını gördüğüm herkese en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak kaderin her birimizi ayrı yerlere savurduğu canım aileme; her zaman kahrımı çeken, son üç yılımda yalnızlığımı paylaşan, ruhuma huzur veren, yanımdan hiç ayrılmasın istediğim bir parçam ANNEM'e ve rahmetle andığım, dört duvara sıkıştığımı hissettiğim anlarda aradığımda, çaresizliğime uzaktan ama içten dua edişi ile kulaklarımdan sesi hiç gitmeyen ve şuanda da benimle gurur duyduğunu hissettiğim pamuk kalpli BABAM' a minnet ve teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	iv
BEYAN	v
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
GRAFİKLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2.Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler.....	4
2.3. Kanser Tedavisi Ve Uygulanan Yöntemler.....	5
2.4. Kolon Kanseri ve Oluşum Nedenleri	6
2.4.1. Kolon Kanserinin Tedavi Yöntemleri	8
2.5. Keten Tohumu	9
2.5.1. Keten Tohumunda Bulunan Biyoaktif Bileşikler ve Faydaları	10
2.5.2. Keten Tohumunun Farmakolojik Etkileri.....	11
2.5.3. Kolon Kanseri Tedavisinde Keten Tohumunun Etkisi.....	12
2.5.4. Keten Tohumunun Olumsuz Etkileri.....	13
2.5.5. Lignanlar	14
2.5.6. Sekoisolarikiresinol Diglikozit	17
2.6. Hücre Döngüsü.....	18
2.7. Apoptozis	20
2.8. Hücre Kültürü.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. GEREÇ.....	23
3.1.1. Kullanılan Malzeme Ve Cihazlar	23
3.1.1.1. Kimyasal Malzemeler – İlaçlar – Kitler - Çözeltiler.....	23
3.1.1.2. Hücre Hattı ve Bitki Ekstraktı.....	24
3.1.1.3. Kullanılan cihazlar	24
3.2. YÖNTEM.....	25

3.2.1.Hücre Hattının Temini ve Hücre Soyunun Açılması.....	25
3.2.2.Hücre İnkübasyon Koşulları ve Hücrelerin Çoğaltılması.....	25
3.2.3.Hücrelerin Pasajlanması	25
3.2.4.Hücre Sayımı Hesaplaması	26
3.2.5.Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	26
3.2.6.Sekoisolarikiresinol Diglikozitin Doz Belirleme Deneyi	27
3.2.7. İki Boyutlu Kültürlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme	27
3.2.8. İki Boyutlu Kültürlerde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Metodu	28
3.2.9. İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İmmünohistokimyasal İşaretleme. 28	
3.2.10. İki Boyutlu Kültürlerde AIF İle İmmünohistokimyasal İşaretleme.....	29
3.2.11. Üç Boyutlu Sferoid Modelde Hücre Kültürü Deneyleri.....	30
3.2.12. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme	30
3.2.13. Üç boyutlu kültürde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Metodu	31
3.2.14. Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İmmünohistokimyasal İşaretleme	32
3.2.15. Üç Boyutlu Kültürlerde AIF İle İmmünohistokimyasal İşaretleme	32
3.2.16.Hemotoksilen Eozin Boyama	33
3.2.17.Gen Ekspresyon Tayini.....	33
3.2.18.İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	35
4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları	35
4.2. Proliferasyon Deneyi Bulguları	36
4.3. İki Boyutlu Kültürlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları.....	37
4.4. İki Boyutlu Kültürlerde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Bulguları	40
4.5. İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz – 3 İşaretleme Bulguları.....	43
4.6. İki Boyutlu Kültürlerde AIF İşaretleme Bulguları	46
4.7. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerde Hematokksilen Eozin Boyanma Bulguları	49
4.8. Üç Boyutlu Kültürlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları.....	50

4.9. Üç Boyutlu Kültürde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Bulguları	53
4.10. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz -3 İşaretleme Bulguları.....	55
4.11. Üç Boyutlu Kültürde AIF İşaretleme Bulguları	57
4.12. Gen Ekspresyon Tayini Bulguları.....	59
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	71
7.ÖZET.....	73
ABSTRACT	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	85



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ACE	: Anjiyotensin Konverting Enzim
ADP	: Adenozin Difosfat
AIF	: Apoptoz Uyarıcı Faktör
ALA	: Alfa Lipoik Asit
BRAF	: V-Raf Murine Sarkom Viral Onkogen Homolog
BRDU	: 5-Bromo-2-Deoksiuridin
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
DAB	: Diaminobenzidin
DK	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DPBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponu
EDL	: Enterodiol
ENL	: Enterolaktan
EPA	: Eikosapentenoik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HCL	: Hidroklorik Asit
H-E	: Hematoksilen-Eozin
ID50	: İnhibisyon Dozu 50
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-2	: İnterlökin-2

KCL	: Potasyum Klorür
KH₂PO₄	: Mono Potasyum Fosfat
K-RAS	: V-K ₁ -Ras2 Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog
LA	: Lipoik Asit
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAT	: Matairesinol
ML	: Mililitre
mRNA	: Haberci RNA
NaCL	: Sodyum Klorür
NaH₂PO₄	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
P53	: Protein 53
PARP	: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tampon Salin
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
PVP	: Polivinil Prolidon
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RT PCR	: Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon
SDG	: Sekoisolarikiresinol Diglikozid
SMG	: Sekoisolarikiresinol Monoglikozit
TAT	: Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı Etiketleme

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Apoptosize Giden Hücre.	4
Şekil 2: Kolon Kanseri Gelişiminin Moleküler Modeli.	7
Şekil 3: Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı.	8
Şekil 4: Lignanların Sınıflandırılması	16
Şekil 5: Hücre Siklusu.	19
Şekil 6: Apoptoz Kontrolündeki Genler	22
Şekil 7: Thoma Lamı.	26



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: 24. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	38
Resim 2: 24. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	38
Resim 3: 48. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	38
Resim 4: 48. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	39
Resim 5: 72. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	39
Resim 6: 72. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler	39
Resim 7: 24. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	41
Resim 8: 24. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	41
Resim 9: 48. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	41
Resim 10: 48. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	42
Resim 11: 72. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	42
Resim 12: 72. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler	42
Resim 13: 24. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	44
Resim 14: 24. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	44
Resim 15: 48. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	44
Resim 16: 48. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	45
Resim 17: 72. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	45
Resim 18: 72. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler	45
Resim 19: 24. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	47
Resim 20: 24. Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	47
Resim 21: 48. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	47
Resim 22: 48. Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	48
Resim 23: 72. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	48
Resim 24: 72 Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler	48
Resim 25: 24. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları	49
Resim 26: 48. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları	49
Resim 27: 72. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları	50
Resim 28: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler	52
Resim 29: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler	52
Resim 30: 72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler	52
Resim 31: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler	54
Resim 32: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler...	54

Resim 33:	72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler	54
Resim 34:	24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler .	56
Resim 35:	48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler .	56
Resim 36:	72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler .	56
Resim 37:	24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler	58
Resim 38:	48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler	58
Resim 39:	72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler	58



GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: SDG 'nin Doz İnaktivasyon Grafiği.....	35
Grafik 2: Zamana Göre Hücre Çoğalma Verileri	36
Grafik 3: İki Boyutlu Kültürde BrdU İşaretleme Grafiği	37
Grafik 4: İki Boyutlu Kültürde TUNEL İşaretleme Grafiği.....	40
Grafik 5: İki Boyutlu Kültürde Kaspaz-3 İşaretleme Grafiği.....	43
Grafik 6: İki Boyutlu Kültürde AIF İşaretleme Grafiği.....	46
Grafik 7: Üç Boyutlu Kültürde BrdU İle İşaretleme Grafiği.....	51
Grafik 8: Üç Boyutlu Kültürde TUNEL İle İşaretleme Grafiği.....	53
Grafik 9: Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz - 3 İle İşaretleme Grafiği.....	55
Grafik 10: Üç Boyutlu Kültürde AIF İle İşaretleme Grafiği	57
Grafik 11: İki Boyutlu Kültürde 24. Saat Kontrol Gurbu İle SDG Grubunun Kaspaz-3 Gen Ekspresyonu	59
Grafik 12: Üç Boyutlu Kültürde 24. Saat Kontrol Gurbu İle SDG Grubunun Kaspaz-3 Gen Ekspresyonu	59

1. GİRİŞ

Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bir taraftan apoptoz ile yok olurken, diğer taraftan da ihtiyaca göre bölünür ve büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalırlar. Kanseri, çeşitli faktörler nedeniyle değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan bir hastalıktır.

Meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra görülme sıklığı bakımından en sık görülen kanserler arasında kolorektal kanser, 4. sırada yer almaktadır. Kolon tümörlerinin çok büyük bir bölümü adenokanserlerdir ve adenokanserler dışındaki tümörler tüm kolon tümörlerinin yaklaşık %3'lük bir bölümünü oluştururlar. Bunlar arasında skuamöz kanserler (%34) ve kolonun karsinoid tümörü (%33) en sık görülenlerdir. Kolon kanseri nedenleri arasında; kalıtım, çevresel, beslenme kaynaklı, radyasyon, adenomatöz polip, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolonda daha önceden karsinom varlığı gibi durumlar bulunmaktadır.

Kanser tedavisinde daha çok; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tedavilerin yan etkilerinin hastada oluşturduğu sıkıntılardan ve iyileşme sürecine olumsuz etkilerinden dolayı günden güne kansere yönelik farklı tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Gelişen bu tedavilerin başında; tamamen doğal olmaları, eşirimi açısından daha kolay ve daha ucuz olmaları nedeniyle bitkisel yöntemler gelmektedir. Kolon kanseri tedavisinde de diğer kanserlerde olduğu gibi daha çok kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra son yıllarda kolon kanserine yönelik bitkisel tedaviler de iyileştirici etkileriyle dikkat çekmektedir.

Keten tohumu (*Linum usitatissimum*), 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Keten tohumu genellikle; fonksiyonel gıda -biyoaktif gıda ya da endokrin aktif gıda olarak gruplandırılır. Keten tohumu, besin değeri olan ve olmayan bileşenler içerir. Keten tohumunun besin değeri ve koruyucu etkisi sahip olduğu karmaşık doğasından kaynaklanmaktadır. Günümüzde bitkisel ürünlere dayalı beslenmenin kronik hastalıkları, özellikle kanser riskini azaltabildiğine dair çok sayıda *in vivo*, *in vitro* ve klinik deneme verileri vardır. Keten tohumu bu açıdan incelendiğinde, α -linolenik asit ve iyi kaliteli protein bakımından zengin olmasının

yanı sıra, flavonoid, lignan ve fenolik asitler gibi fitokimyasalların da doğal kaynağı durumundadır.

Lignanlar, koroner kalp hastalıklarından kanser türlerine kadar birçok hastalığı azaltıcı etkiye sahiptirler. Keten tohumu memeli lignan ön maddesi olan sekoisolarikiresinol diglikozit (SDG) açısından en zengin kaynaktır. Keten tohumunda bulunan SDG, anti-kanser ve antioksidan başta olmak üzere; antiviral, antibakteriyal, antifungal ve daha birçok özelliğe sahip bir ajandır.

Çalışmamızda keten tohumunda bulunan sekoisolarikiresinol diglikozitin anti-kanser özelliği göz önüne alınarak, kolon kanseri hücre hatları üzerinde, apoptotik etkilerini hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında incelenmesi planlandı. DSMZ 'den alınan CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücre hatları üzerine, *in vitro* ortamda keten tohumu ekstraktını uygulanarak, ekstraktın etkisi; proliferasyon, canlılık ve tutunma deneyi, imünohistokimyasal olarak; 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) işaretleme indeksi, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick and Labelling (TUNEL) metodu, Kaspaz-3 ve AIF tayini, RT PCR ile Kaspaz-3' ün mRNA ekspresyon düzeyleri incelenerek belirlenecektir.

Keten tohumu ekstraktının kolon kanseri hücrelerinde apoptosize yol açtığını iki boyutlu ve üç boyutlu kültür ortamında, gen ekspresyonu düzeyinde belirlememiz durumunda; SDG 'nin etkisi daha net açıklanmış olacaktır. Bu etki sayesinde, ilerde yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacak ve kolon kanserine alternatif yeni tedavi yöntemleri geliştirilebilecektir. Ayrıca, çalışmamızda bitkisel tedavinin pozitif sonuçlarının olması ve bu tür çalışmaların artmasıyla, ülkemizde hastalıklar için ilaç üretimine yapılan ekonomik giderlerin azalabileceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Latince'de yengeç anlamına gelen kanser, günümüzün en korkulan hastalıklarından olup; çevresel, genetik ve bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, kontrolsüz olarak büyüyüp çoğalmalarının sonucu oluşan ve ölüm nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelen kötü seyirli bir hastalıktır(1). Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar (2). Hücreler bir taraftan programlı ölüm, apoptoz ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalırlar (Şekil 1). Büyüme faktörleri DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona uğradıklarında hücrelerin aşırı büyümesine neden olarak kanseri oluşturturular ve "onkogen" olarak bilinirler. Onkogenleri oluşturan mutasyonlar; karsinojen maddelerin, virüslerin ve X ışınlarının etkisiyle meydana gelirler (2-5).

Kanser bir organda oluşuktan sonra, uzak doku ve organlara da metastaz denilen yayılma gösterir ve genel olarak hastalar bu metastaz nedeniyle kaybedilirler. Metastaz oluşumu tesadüften yayılmaktan çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır (6).

Kanser hücreleri karakterize olarak bazı özelliklere sahiptirler ve bunlar; büyüme sinyalleri oluşturabilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlaşma, programlanmış hücre ölümünden kaçabilme, sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, invazyon ve metastaz yapabilme özellikleri şeklindedir (7, 8).

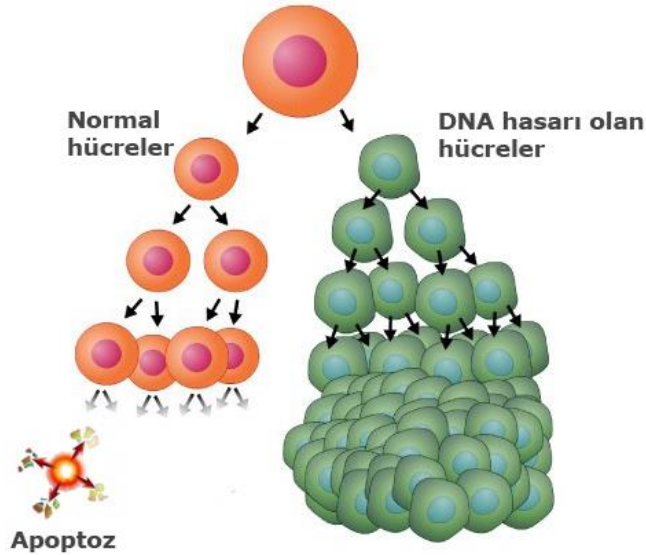
Kanserler, hücre tipine göre genellikle dört gruba ayrılmaktadır. *Lösemiler ve lenfomalar*; lökosit ve lenfositlerin ihtiyaçtan fazla üremesinden dolayı oluşmaktadır. *Sarkomalar*; kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezodermden gelişen doku tümörleridir. *Karsinomalar*; kanserlerin %85'ini oluşturan; bez, meme, deri ve ürogenital dokulardan köken alan kanserlerdir (9, 10).

Kanserde tedavi yöntemi olarak; cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olup, onların arkasından kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler uygulanmaktadır (3, 6). Kanser tedavisi birçok zorluk içermektedir.

Bunlardan en çok karşılaşılan hücrelerin ilaca karşı direnç oluşturmaları, kullanılan ilaçların sağlıklı hücreleri etkilemesi ve kanserli hücrelerin kolayca metastaz yapabilme özellikleridir (7). Yapılan tedavilerin yan – olumsuz etkileri nedeniyle farklı tedavi yöntemleri geliştirilmekte ve doğal, ucuz ve yan etkilerinin çok az olmalarından dolayı, bitkisel yöntemler tercih edilmektedir (1).

2.2.Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde birden fazla mekanizmanın rol oynadığı bilinmektedir, fakat bu mekanizmaların tümü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu dönüşümün nasıl meydana geldiğini anlamadan önce normal bir hücrenin yaşamsal döngüsünün bilinmesi gerekir. Tümör hücreleri çevre dokulara yayılma özelliklerine göre benign ve malign olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Benign tümörlerde, tümör hücreleri çevre dokuları işgal etmez veya vücudun diğer bölümlerine yayılmazlar. Kapsül oluşturarak canlılığın yaşamını çok fazla tehlikeye sokmayan benign tümörler sinir sistemi, damarlar ve kanallara basıncı yaparak hastalık belirtilerini gösterirler ve genellikle operasyonla alınırlar. Kapsül oluşturmayan malign tümörler ise oluştukları yerden ayrılarak vücut içinde başka bir bölgeye ilerler ve ikinci bir tümöre sebep olarak, metastaz yaparlar.



Şekil 1: Apoptosize Giden Hücre (11).

2.3. Kanser Tedavisi Ve Uygulanan Yöntemler

Kanser hastaları daha iyi olabilme ve hastalıklarının tedavisi için hem tıbbi hem de alternatif olarak birçok yönteme başvururlar. Bu yöntemlerden tıbbi olanlar daha yaygın olup, hastayı iyileşeceği konusunda daha fazla ikna eden fakat bir o kadar da masraflı ve yan etkileri olan yöntemlerdir (12).

Kanser tedavisinde uygulanan tıbbi yöntemler başlıca 3 ana başlık altında toplanabilir:

- 1) Cerrahi Müdahale
- 2) İlaçla Tedavi (Kemoterapi)
- 3) Işınla Tedavi

Neoplastik hücreler, önce cerrahi ya da radyasyon tedavisi ile azaltılmakta veya gelişimleri yavaşlatılmakta, ardından kemoterapi, immunoterapi veya bu tedavi yöntemleri birlikte uygulanmaktadır (13). Dünyada her yıl bir milyon yeni kanser hastası teşhis edilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük bir kısmına ise hastalığının herhangi bir döneminde kemoterapi uygulanmaktadır (14). Günümüzde kanser hastalarının bir kısmında kanserin tipine bağlı olmak üzere kemoterapi ile tam tedavi ya da uzun bir iyileşme dönemi sağlanabilmektedir. (15).

Hastalar TAT'ları hem kanserle savaşma, hem de yaşam kalitesini artırmak amacıyla kullanmaktadırlar. Tedaviye destek olmak için kullananlar ise, tedavinin yan etkileri ile baş etme, immün sistemlerini güçlendirme, beden-vücutta iyilik sağlama, fiziksel uyum ve onarım sağlama, sağlıklı davranışları güçlendirme ve geleneksel tedavilere destek sağlama amacıyla kullanmaktadırlar. Kanserlin tekrarlmasını önleme için TAT kullananlar, besin destek ürünlerinin yararlı olduğu inancı ya da davranışları düzenlemek-kontrol etmek amacıyla, daha çok korunmaya yönelik uygulamalar yapmaktadırlar. Son bir çare olarak TAT kullanan kanser hastaları, çoğunlukla daha önce TAT kullanmamış ama tedavilerin yan etkileri ile artık baş edemeyen ve hastalığın tekrar etmesi ile son bir çare olarak TAT kullanmaya başlamaktadırlar (16, 17).

2.4. Kolon Kanseri ve Oluşum Nedenleri

Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon insanda kanser teşhis edilmekte ve kolorektal kansere bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir. 2013 yılının kayıtlarına göre Çin’de kolorektal kanser kaynaklı ölümler, ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada bulunmaktadır (18). Farklı coğrafyalarda yaşayan toplumlarda farklı orandaki kanser sıklığının, diyet ve çevresel faktörlerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (2, 10).

Epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanserin yüksek yağ ve düşük lif içeren diyetle beslenen toplumlarda daha sık görüldüğünü göstermiştir. Özellikle lif içeriği fazla besinler tüketmenin kanser oluşumunu engellediği bilinmektedir (2, 10, 16).

Kolon tümörlerinin çok büyük bir kısmı adenokanserlerdir (8). Kolorektal kanser gelişme riski kolondaki adenom sayısı ve büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bunların dışında, pelvik radyasyona maruz kalma rektal kanser oluşumunda kanıtlanmış bir risk faktörüdür (2, 8, 10).

Kanserde Etkili Olan Genler

- Proto-onkogenler
- Antionkogenler; Tümör Baskılayıcı Genler

Protoonkogenler: Hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için aldıkları iletileri hücre membranından başlamak üzere çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlerdir (19).

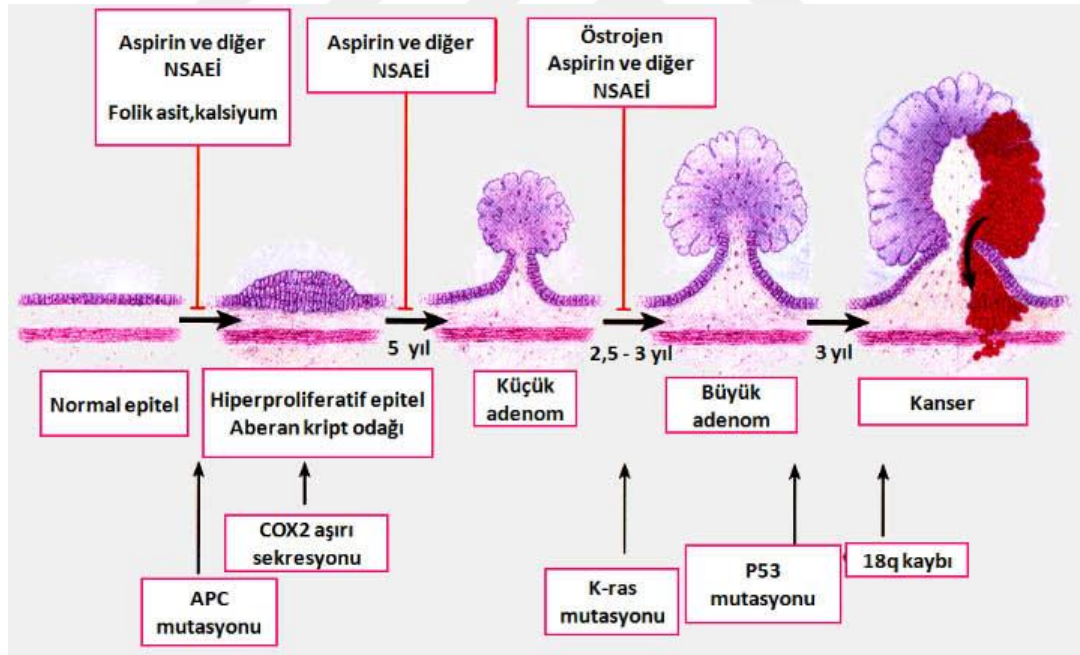
Antionkogenler; Tümör Baskılayıcı Genler: Normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan genlerdirler; Rb geni, P53 geni, CDK-İnhibitörleri, Kadherinler, BRCA-1/2.

Tümör supresor genler ancak her iki allel gende mutasyon veya kayıp oluştuğunda aktivitelerini kaybetmekte ve hücrede apoptosizi engellenmektedir. Bir tümör supresor gen olan APC geninin (Adenomatous polyposis coli) inaktivasyonu ile başlayan bu yol kolorektal kanserlerin yaklaşık %70 – 80’nin patogenezinde rol oynamakta ve heterozigozite kaybı olarak bilinmektedir.

p53 gen mutasyonu: p53 geni bir tümör supresor gen olup 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur (17p) ve bir hücre fosfoproteini olan p53 proteininin sentezinden sorumludur. *DCC:* DCC geni (Deleted in colorectal carcinogenesis) bir supresor gendir ve 18. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur (18q21). DCC varlığı 2. ve 3. evredeki kolorektal kanserlerde kötü prognozun kuvvetli bir işaretidir.

Proto-onkogenler hücrede uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynarlar. Proto-onkogenler, normal hücrelerde proliferasyon ve diferensiyasyonu kontrol ederler. Hücre bölünmesi, normal hücrede fizyolojik gereksinimlere göre ve kontrollü olarak yürütülmektedir..

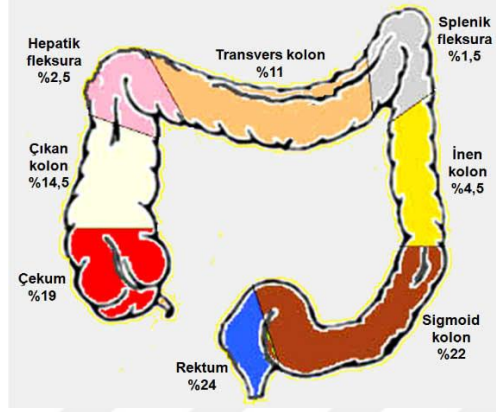
DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değişiklikler Kolon kanseri oluşumunda adenomdan karsinom geçişi esas olarak K-RAS geni ile düzenlenir (Şekil 2). K-RAS geni bir proto-onkogendir ve hücre dışı sinyallerin alınarak hücre içerisine iletilmesini sağlayan bir GTPaz proteindir (22).



Şekil 2: Kolon Kanseri Gelişiminin Moleküler Modeli (NSAEİ: Nonsteroid Anti Enflamatuar İlaçlar) (23).

Genomik kararsızlık (genomic instability), yeterince mutasyona uğramış bir hücrenin kanser hücresine dönüşümüne zemin sağlar ve kolon karsinogenezinde rol oynayan önemli bir mekanizmadır. (10).

Kolon tümörlerinin yaklaşık 1/3'ü rektumda yerleşirken kalan 2/3' lük bölümü kolonun diğer kısımlarında ve özellikle sol kolonda yerleşim gösterir (Şekil 3).



Şekil 3: Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı (10).

Klinikte;

Kolorektal kanserler yavaş büyüyen neoplazmalar olup özellikle çekum ve sağ kolondaki tümörlerin semptomatik hale gelmesi uzun süre alan kanser türüdür. Genellikle bu bölgedeki kanserlerin ilk bulgusu demir eksikliği anemisi şeklinde bulgu gösteren gizli kanamadır. (10). Kolorektal kanserli hastaların yaklaşık % 25'inde hastalık süresinde kanserin farklı organlara yayılmasından kaynaklı ölümler gerçekleşmiştir. Günümüzde hala kolorektal kanserin metaztazı, bu hastalığın getirdiği en büyük problemlerdendir (18).

2.4.1. Kolon Kanserinin Tedavi Yöntemleri

Cerrahi tedavi: Kolon kanserinde öncelikli tedavi yöntemi cerrahidir. Yapılacak rezeksiyonun sınırları; tümörün evresi, yeri ve bulunduğu kolon segmentinin vasküler ve lenfatik drenajına göre belirlenir. (8).

Kolorektal kanserde kemoterapi ve radyoterapi: Kolon kanserinde kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi, adjuvan kemoterapi ve ileri evre hastalık için yapılan kemoterapi olmak üzere üç grupta incelenir (20). Kolon kanserinde radyoterapi özellikle rektum tümörlerinin tedavisinde tercih edilir. Kolon kanserlerinin %80'den fazlasının kolon poliplerinden geliştiği bilindiğinden tarama testleriyle kolonda polip veya erken evrede kanser saptanan hastaların uygun tedavi

ile normal ömürlerini sürdürmeleri mümkün olduğundan kolon kanseri artık nispeten önlenebilir kanserler arasında sayılmaktadır (10, 24).

Bitkisel Tedavi: Günümüzde kansere yönelik alternatif tedavi yöntemleri gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. İlaçlar, kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler; gerek olumsuz yan etkileri, gerek hastadaki psikolojik süreçleri ve gerekse maddi açıdan ulaşım zorlukları nedeniyle her geçen gün daha az tercih edilmektedirler (25). Birçok kanserde olduğu gibi kolon kanserinde de alternatif tedavi imkânları sürekli artmaktadır(26). Fonksiyonel gıdalar, vücudun temel besin öğeleri gereksinimini karşılamanın ötesinde insan fizyolojisi ve metabolik fonksiyonları üzerinde faydalar sağlayan ve hastalıklardan koruyarak daha sağlıklı bir yaşama imkânı sağlayan gıda ya da gıda bileşenleridir (14). Sağlık otoriteleri; tahıl, taze sebze ve meyveler bakımından zengin, hayvansal et ve yağ oranının azaltıldığı diyetleri önermektedir. Yapılan birçok çalışmada lif içeriği zengin meyve ve sebzelerin, zencefil, keten tohumu, sarımsak, zerdaçal gibi yüksek protein içeriği olan besinlerin kolon kanseri üzerine azaltıcı etkisi olduğunu ortaya koymuştur (10, 27). Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser önleyici gıdalar arasına aldığı ve üzerinde çalışılmasını öngördüğü bitkisel materyalden birisi olarak keten bitkisini belirlemiştir (14, 28).

2.5. Keten Tohumu

Keten (flax, *Linum usitatissimum*), Linaceae familyasına ait, 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli, tek yıllık bir kültür bitkisidir ve tohumları; 4-6 mm uzunlukta, yumurta biçiminde, yassı, parlak, kırmızımsı esmer renkli, kokusuz, yağlı ve lezzetlidir (15, 29). Mezapotamya orjinli keten tohumunun tarımı, Mısırlılardan beri yaklaşık milattan önce 5000'li yıllara dayanır, fakat ticari olarak işlenmesi, kâğıtlarda ve kıyafetlerde kullanımı 1990'lı yıllarda başlamıştır (15, 24, 30).

İlkel zamanlardan beri tarımı yapılan keten tohumu lipit ve lif açısından önemli bir besin kaynağıdır. 1990' lı yıllarda kullanımının başlamasıyla, tarımı daha çok artmış ve gelişerek sağlıklı besin maddesi olarak ticaretine başlanmıştır (31). Günümüzde yaklaşık 2.6 milyon civarında kültürü yapılan keten tohumu, daha çok sağlıklı yaşam için bitkisel ilaç olarak, ekme içinde ya da laksatif olarak tüketilmektedir (24, 29, 32, 33). Ayrıca Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser

önleyici gıdalar arasına aldığı ve üzerinde çalışılmasını öngördüğü 6 bitkisel üründen birisi olarak keteni belirlemiştir (34).

Linaceae familyasından Linum cinsi dünya üzerinde 200' den fazla tür bulunmaktadır. Bu türler genellikle Akdeniz, Asya ülkeleri, Hindistan, Balkanlar ve Türkiye'de yetişmektedir (24, 29). Özellikle Çin'de ve Hindistan'da her yıl 1.3 milyon hektarlık alanda keten tohumu tarımı yapılmaktadır (30). Keten tohumu, besin değeri olan ve olmayan bileşenler içerir. Bu bileşenlerin, tüketilen doza, zamana ve sıklığa bağlı olarak hem yararlı hem de zararlı etkileri görülebilir (28).

Keten tohumu genel olarak öğütülmemiş (tüm) tohum, öğütülmüş tohum ve keten tohumu yağı şeklinde bulunmaktadır (24, 28). Hem yiyecek hem de endüstri bakımından önemli olan bu yağın bileşiminde yüksek oranda linoleik asit bulunmaktadır (15). Keten tohumu genellikle fonksiyonel gıda - biyoaktif gıda - endokrin aktif gıda olarak gruplandırılır (29). Son yıllarda yapılan çalışmalarda keten tohumunun işlenmiş halinde iki önemli yapı bulunmuştur. Bunlardan birincisi: SDG (Sekoisolarikiresinol Diglikozid) kaynağı olan fakat düşük miktarda α -linolenik asit (ALA) içeren kısım, diğeri ise düşük lignan fakat yüksek oranda ALA içeren kısımdır. Günümüzde en az % 5 SDG içeren keten tohumu ticari olarak kullanılmakta ve marketlerde satılmaktadır. Saf olarak SDG satışı keten tohumuna kıyasla daha pahalıdır (4).

Keten tohumunu kendisi öğütülmüş ya da tohum olarak kullanıldığı gibi yağı da besin olarak çok tüketilmektedir (24). İçerdiği bu bileşenler sayesinde keten tohumu; kalp hastalıklarından, diabetten, kanser türlerinden daha başka birçok kronik hastalıklardan koruyucu bir besin olarak kabul görmüş ve bu durum keten tohumunun fonksiyonel gıdalar arasına girmesine olanak sağlamıştır (24, 33, 35-37). Keten tohumunun önemi anlaşıldıktan sonra, ekme dahil birçok ürünün etiketinde keten tohumu içeriği belirtilmiştir (8).

2.5.1. Keten Tohumunda Bulunan Biyoaktif Bileşikler ve Faydaları

Fenolik Asitler: Yağlı tohum ürünlerinde fenolik asitler, benzoik ve sinnamik asitlerin hidroksile edilmiş türevleri olarak oluşurlar (38).

Flavonoidler: Flavonoidler, doğal benzo- γ -piran türevlerinin bir grubudurlar ve fotosentez yapan hücrelerde bulunurlar (39).

Tokoferoller: Tokoferoller, yağda çözünebilen en güçlü doğal antioksidanlardır (40).

Lipitler: Keten tohumu yağı, yağ asitlerinin yaklaşık %55'ini oluşturan omega - 3 (n-3) yağ asitlerinden α -linolenik asidin (ALA) en zengin kaynaklarından birisidir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda keten tohumunda bulunan yağ asitleri oranı %30 - 40 arasındadır (29). ALA ve linoleik asit (LA, n-6)'in her ikisi de esansiyel yağ asitleridir ve diyetle alınmaları gerekir. Bir kere alındıklarında, LA ve ALA, iltihap oluşumu, platelet agregasyonu ve vasokonstriksiyon üzerine farklı etkileri olan, eikosanoidlerin farklı sınıflarına dönüşürler (28, 29, 41). Omega - 3 yağ asitleri vücutta; kan basıncı, bağışıklık sistemi tepkisi ve yağların yıkılması gibi çeşitli düzenleyici fonksiyonları yerine getirir (29, 41). Keten tohumunun, tümör büyümesini engellemesi sadece lignan içeriğinden değil aynı zamanda α -linolenik asit bakımından zengin olmasından da kaynaklanmaktadır (42, 43).

Proteinler: Keten tohumunun protein içeriği genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. %20,9 -41 arasında gösterilmekte, ancak ortalama %34.5 olarak kabul edilmektedir (24, 29). Keten tohumu proteini kan glukozunu iki farklı yolla etkileyebilmektedir; bunlardan birincisi insulin salgısını teşvik ederek glisemik indekste azalmaya sebep olmak, diğeri polisakkaritlerle interaksiyona girerek gıdaların glisemik indeksinde etkili olmak şeklindedir (28, 33).

Müsilaj: *Linum usitatissimum* tohumunda izole edilen müsilajın yapısında majör bileşenler olarak; galaktoz, ksiloz, ramnoz, galakturonik asit, minör olarak da glukoz, arabinoz, fruktoz bulunmaktadır (29, 33, 43).

Steroller: Keten tohumunun GC-MS analizi sonucu, kolesterol (%2), sitosterol, kampesterol, stigmasterol, A5-avenasterol (%13), sikloartenol (%9), 24-metilsikloartanol (%2) taşıdığı tespit edilmiştir (29, 33).

2.5.2. Keten Tohumunun Farmakolojik Etkileri

Keten tohumunun ilaç olarak kullanılan kısımları; kuru ve olgunlaşmış tohumları, yağı, keten lifleri ve taze çiçekli halde tüm bitkidir. Günümüzde, yapılan

çalışmalarla kronik hastalıklarla beslenme arasında bir ilişki olduğu ve özellikle kanser gelişiminde beslenmenin en önemli çevresel faktör olduğu düşünülmektedir. (41, 44, 45). Keten tohumunun, yapısındaki liganaların etkisiyle birçok kanser çalışmasında koruyucu rol oynadığı gözlemlenmiştir (13, 46).

Keten tohumu 100 g'da yaklaşık 28 g diyet lifi içerdiğinden iyi bir kaynak durumundadır ve insanlarda hipoglisemik etkiye sahiptir (29). Keten tohumundaki fitoöstrojenlerin; akciğer, prostat, kolon başta olmak üzere birçok kanser türünde koruyucu rol oynadığını kanıtlayan epidemiyolojik, klinik ve laboratuvar çalışmaları bulunmaktadır (27, 30, 43).

Keten tohumu; hücre, doku ve organ onarımında temel rol oynayan protein sentezi için önemli bir takım esas amino asitleri içeren zengin bir besin kaynağı olarak bilinir (36). Keten tohumunun içerdiği, siklinopeptit A gibi biyoaktif peptitler bakımından güçlü bir immün baskılayıcı olduğu ve sıtma parazitini engellemesinden dolayı antimalarial etkiye sahip olduğu bilinmektedir (24).

2.5.3. Kolon Kanseri Tedavisinde Keten Tohumunun Etkisi

Günümüzde kolon kanseriyle ilişkili *in vivo ve in vitro* birçok çalışma yapılmaktadır. Kolon kanserli hastalara beslenmeleri için, yüksek miktarda sebze düşük miktarda kırmızı et önerilmektedir (28). Lif (fiber); selüloz, hemisellüloz ve pektin gibi karbonhidratlarla; lignin gibi karbonhidrat olmayan maddelerden oluşarak, üst gastrointestinal sistemde sindirilmeden kolona ulaşmaktadır (47).

Keten tohumundan izole edilen SDG, hidroksimatairesinol ve EDL (Entereodiol) ile yapılan çalışmalarda tümör gelişiminin baskılandığı, ayrıca SDG'nin bazı kanser türlerinde metaztazı da engellediği görülmüştür (35). Yapılan *in vitro* çalışmalarda da memeli liganlarının hormon biyosentezi içeren enzim aktivitelerini ve östrojen etkisini azalttığı gözlemlenmiştir (48). Keten tohumuyla beslenen ratlarda yapılan çalışmalarda keten tohumuyla beslenen grupta kontrol grubuna kıyasla tümör hücrelerinde azalmalar gözlenmiştir (8). Birçok çalışmada bitkilerden köken alan liganların kolon kanserinde; apoptosiz aracılığı ile hücre kaybını, kanser hücre ölümünü sağladıkları görülmüştür (49).

2.5.4. Keten Tohumunun Olumsuz Etkileri

Keten tohumunun yararının çok fazla olmasının yanı sıra kısmen de olsa alerjik etkilerinin bulunduğu da bilinmektedir. Keten tohumu allerjisi ilk kez 1930 yılında tanımlanmıştır, ancak o zamandan beri nadir olarak bildirilmiştir (32).

Keten tohumundaki besinsel bileşenlerin olası negatif etkisi yüksek miktardaki çoklu doymamış yağ asidi miktarı ile ilgilidir. Keten tohumunun pişirilmeden tüketimi, hayvan ve insanlar için fazla miktarda alındığında toksik olabilecek bir bileşik olan siyanojenik glukosidlerin üretimine neden olabilir (47, 50-52). Keten tohumunun hem besin olarak hem de fonksiyonel olarak kullanılmasına ve faydalı olmasına rağmen, bulunan yan etkileri içerdiği; kadmiyum ve siyanojenik glikozitlerden kaynaklanmaktadır (24, 44). Yapılan çalışmalarda; keten tohumu ve içerdiği lignanların daha çok yetişkinler için faydalı olduğu ve hamile bayanların sınırlı miktarlarda tüketmeleri gerektiği bildirilmiştir (43).

Fitoöstrojenler

Fitoöstrojenler kimyasal yapılarına göre izoflavonlar, flavanonlar, kalkonlar, lignanlar, kumestanlar, makrolitler, stilbenler ve steroller olarak sınıflandırılır. Fitoöstrojenler üzerinde en çok çalışılan izoflavonlardır (27). Fitoöstrojen kaynaklarının binlerce yıldır tüketildiği toplumlarda bile fitoöstrojen toksisitesi bildirilmemekte ve diyetle alınan doğal fitoöstrojen kaynakları ile toksik doza ulaşamayacağı düşünülmektedir (30, 53).

Fitoöstrojen bakımından zengin olan birçok besin vardır. (30). Fitoöstrojenlerin aktivitelerinin ortamın endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olarak örneğin: yüksek östrojenli çevrede antiöstrojenik etki gösterirken, düşük östrojenli çevrede östrojenik etki şeklinde farklı etki gösterebilecekleri düşünülmektedir (27, 30, 53). Fitoöstrojenlerin östrojenik etkileri esas alınarak yapılan deneysel çalışmalarda, deney hayvanlarının üreme sistemlerinde gelişmeler gözlemlenmiş ve fitoöstrojenlerin östrojenik etkilerinin zaman ve uygulanan fitoöstrojen dozuna bağlı olduğu anlaşılmıştır (30).

Keten tohumunun diğer bioaktif bileşenleri, fenolik bileşenler olan ve lignanlarında içinde bulunduğu, flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Keten

tohumundaki en bilinen flavonoidler flavon C ve O- glikozitlerdir (24). Üç yüzün üstünde besinde fitoöstrojen olduğu tespit edilmiştir (54).

İsoflavanlar: Genistein- didzein- gilesitein- formonontein-biokanin A, üzerinde en fazla çalışma yapılan fitoöstrojenlerdendirler (8). Bir tür fitoöstrojenler bitkisel hormon olarak bilinir ve kimyasal yapı olarak östrojen hormonuna benzerlik gösterirler (27). İzoflavonlar bitkilerde doğal olarak şekerlerle konjuge yapılar halinde, yani glikozit halde bulunurlar (30). İsoflavanlar lignanlara kıyasla daha fazla östrojenik özelliğe sahiptirler fakat östrodiol kıyasla ise yaklaşık 100 kat daha az aktiviteye sahiptirler (55).

Kumestanlar: Kolestrol, üzerinde en az çalışılmış olan fitoöstrojenlerdendirler (8). Buna rağmen, kumestanların da kanserde koruyucu rol oynadıkları gözlemlenmiştir. Kumestanlar; barbunya, bezelye gibi baklagillerde fazla bulunmaktadır (30).

Lignanlar: Keten tohumu (*L.usitatissimum* L.) α -linolenik asit ve lif açısından zengin olmasının yanı sıra fitoöstrojenlerden, lignan bakımından, özellikle de sekoizolarisiresinol diglikozit bakımından zengin bir bitkidir. Keten tohumunda bulunan lignanlar, memeli lignanları olarak bilinen ve antikarsinogenik aktiviteye sahip enterodiol (EDL) ve enterolaktan (ENL) bileşiklerinin öncülleridir. (24, 55, 56). Lignanlar aynı zamanda bitkiler arasında yaygın olarak bulunan fitonitrojen grubundandır (15, 30).

2.5.5. Lignanlar

İlk kez 19. yüzyılda ağaçlardan izole edilen lignanlar; 2,3 dibenzilbütan iskeleti ile tanımlanan ve bütün damarlı bitkilerde glikozit formda bulunan önemli bir fitoöstrojendirler (8, 30, 33). Bitkilerde bulunan temel lignanlar matairesinol, sekoizolarisiresinol, larisiresinol ve izolarisiresinol olup, bunlar insanlarda östrojenik aktivite gösteren iki temel bileşiği, enterodiol (EDL) ve enterolaktanı (ENL) vermektedirler (33) (Şekil 4). İzoflavonlar gibi enterodiol ve enterolaktan da bağırsak mikroflorasının bitki lignan öncüleri üzerindeki aktivitesi sonucu oluşurlar (27, 31, 33).

Lignanların yapı olarak 17- β estradiol ile benzerlik göstermesi, onların kanser çalışmalarında östrojen aracılığıyla etkili olabilceği düşüncesinin kaynağıdır. Feneolik lignanlar yani bitkilerdeki lignanalar daha çok; buğday, susam tohumu, keten tohumu, soya tohumu, arpa, çavdar, yulaf gibi baklagiller de ve brokoli, havuç, sarımsak gibi sebzelerde bol miktarda bulunurlar (8, 15, 36).

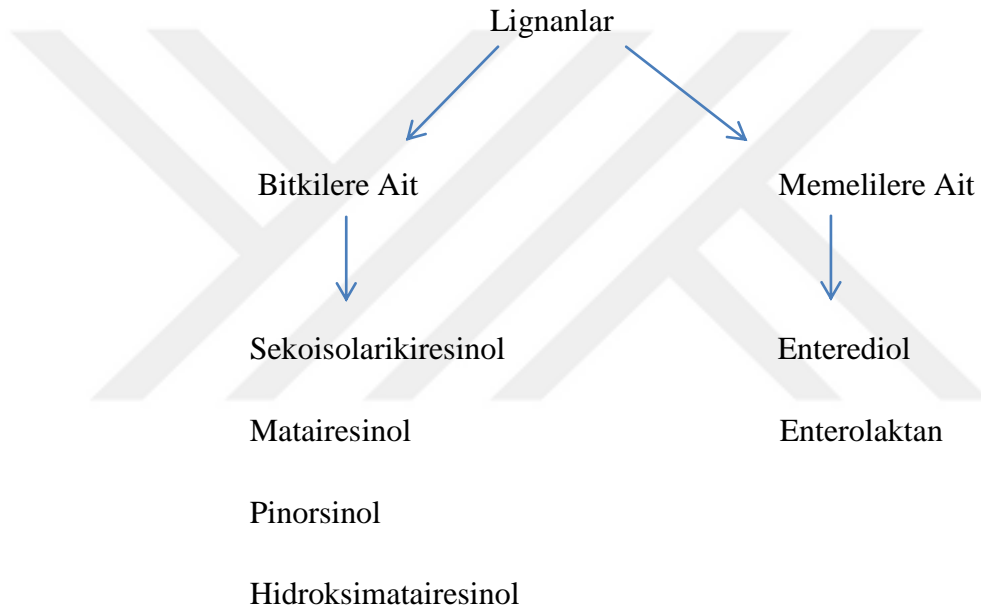
Lignanlar, bitkiler aleminde yaklaşık 90 familyada hatta kahve ve çayda bile saptanan, önemli biyolojik aktivitelere sahip doğal ürünlerdir (30).

Keten tohumunun diğer tüm bitkilerden yaklaşık 80-100 kat fazla oranda lignan, özellikle de SDG kaynağı olduğu bilinmektedir (48, 59). Yüksek keten tohumu alımı ile yapılan çalışmalarda SDG veya memeli lignanların genotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve lignanların herhangi bir genotoksik etkisinin bulunmadığı görülmüştür. Ketendeki lignanlar ayrıca oksidatif stresi de azaltabilirler (56, 59). Keten tohumu ekstraktları ve özellikle saflaştırılmış lignanlar, cilt kanserine karşı koruyucu olmakta ve promotajenler ile prokarsinojenlerin aktivasyonunun inhibisyonu şeklinde antioksidan etki gösterebilmektedirler (60). Lignanlar, öneminin anlaşılmasından sonra daha fazla çalışılmaya başlanmış ve antioksidan, proapoptotik, antianjiyogenik, antiproliferatif gibi birçok özellikleri de çalışmalarla kanıtlanmıştır (48). Lignanlar fitohormon olarak yoğun ilgi çekmekte olup, diyetle fazla tüketimlerinin meme, kolon kanseri ve koroner kalp hastalıkları riskini azalttığı bildirilmiştir (8, 9).

*Linum usitatissimum*dan izole edilen lignan sekoizolarisirezinol diglikozit (SDG) ve pinorezinoldiglikozittir. Bitki lignanları insan kalın bağırsağında, EDL ve ENL'ye metabolize olarak sirkülasyona katılır ve sonunda hedef dokulara ulaşırlar. Enterolaktan ve enterodiolün sahip oldukları geniş metabolik özelliklerinden dolayı sağlık açısından çok daha önemli olabilecekleri düşünülmektedir (40, 46). Lignanların ve öncülü oldukları memeli lignanlarının antioksidan özelliklerinin de olduğu bilinmektedir (57). Memeli lignanları olan insan kolon mikroflorasında üretilen ENL ve EDL'nin kanser koruyucu oldukları bilinmekte ve bu etkilerinden dolayı her geçen gün farklı kanser türlerindeki etkileri çalışılmaktadır (24). Bunca çalışmaya rağmen hala lignanların kullanımlarına yönelik doz miktarları açısından

yeterli çalışmalar bulunmamakta, kullanılacak lignan miktarı net olarak bilinmemektedir (8).

Lignanların proapoptotik özellikleri; *bcl-2* ve *kaspaz 3* aktivitelerini inhibe ederek gösterdikleri kanser hücre hatları üzerinde gözlemlenmişken, antiproliferatif özellikleri ise tümör hücrelerinin sayısını, hacmini azaltarak ve büyüme oranını baskılayarak gösterdikleri yapılan *in vitro* – *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır (24). Yiyecek olarak tüketilmeyen bitkilerden elde edilen yeni ligninlerin da kanser araştırmalarında kullanıldıkları bilinmektedir (8).



Şekil 4: Lignanların Sınıflandırılması.

Sekoisolarikiresinol diglikozit ve matairesinol vücuda şeker türevleri olarak alınır, gastrik hidroklorik asitler ve β glikosidaz aracılığı ile bir seri metabolik reaksiyon sonrası memeli lignanları olan enterodiol (EDL) ve enterolaktana (ENL) dönüşürler. SDG ilk olarak Sekoisolarikiresinole (SECO) metabolize olur ve SECO da bağırsak mikroflorasında EDL'ye ve EDL'de ENL'ye dönüşür. (28). Enterodiol döngüde öncelikli olan lignandır, enterediol daha sonra enterolaktana okside olur. Bu lignanlar, bağırsak bakterileri tarafından sentezlendikten sonra absorbe edilerek karaciğere taşınır ve buradan safra kesesine gönderilirler. EDL ve ENL kalın bağırsakta bulunan öncül memeli lignanlarındandır ve kısa zincirli yağ asitlerine benzer şekilde pasif difüzyonla emildikleri bilinmektedir (30, 55). Yani insanların

bitki lignanlarını metabolize etmeleri sindirim sistemi faaliyetlerine göre değişmektedir (8).

Tahıllar arasında buğday, matairesinol ve sekoisolarikiresinol bakımından zengin bir tahıldır. Buğday ekmeği tüketen bireylerde ENL ve EDL miktarlarının yaklaşık 7,3 kat arttığı gözlemlenmiştir (58). Entereodiol, entereolaktana kıyasla bağırsak florasında daha fazla oksidize olabilme yeteneğine sahiptir. Memeli lignanları sindirim sisteminde epitelyal sınırı geçerek emilip sindirime katılabilir ve karaciğerde sindirime katılıp son olarak safra kesesine atılabilirler (55).

2.5.6. Sekoisolarikiresinol Diglikozit

Lignanlar arasında en fazla öneme sahip olan ve enterolignanların (enterodiol, enterolaktan) prekürsörü olarak bilinen SDG, keten tohumundan ilkez 1956 yılında izole edilmiştir. Fakat herhangi bir labarotuar çalışması yapılan kadar SDG ile ilgili hiçbir analiz olamamış ve keten tohumunun SDG içeriği bakımından ne kadar zengin olduğunu yine bu tarihe kadar bilinmemiştir (8). SDG, östrojen benzeri aktivitesinden dolayı non-steroid bileşik olarak bitki kökenli fitoöstrojenler şeklinde sınıflandırılmıştır (30). Enterodiol, endojen östrojene yapı olarak benzerliğinden dolayı, zayıf ta olsa östrojen ya da anti östrojen etki göstermektedir (37, 59). Enterolignanlar α ve β östrojen reseptörlerine bağlanabilme özelliğiyle bazı dokularda östrojenik ya da antiöstrojenik etki gösterirler (37). Yapılan çalışmalar bu etkide mikrobiyotanın da önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (12, 30, 59).

Sekoisolarikiresinol (SECO), bitkilerde sekoisolarikiresinol diglikozit SDG olarak bulunan bir lignandır ve ED ve EL basamağı için gerekli olan bir formdur. Bitkilerde SDG olarak bulunan lignanlar SECO ya dönüştükten sonra bir seri reaksiyon aşamasından sonra faydalı hale gelmektedirler (30). Bu dönüşüm kalın bağırsak florasındaki mikrobiyotaya ile gerçekleşmektedir. İnsan kalın bağırsağı, karmaşık ve yoğun bir mikrobiyotaya sahiptir ve bağırsak içeriğinin gramında yaklaşık 1011 kadar mikroorganizma bulunduğu tespit edilmiştir (56).

Keten tohumu lignanlarından sekoisolarikiresinolün ve öncülü olan sekoisolarikiresinol diglikozitin sayısız faydalarının olmasının nedeni, sahip oldukları antioksidan özelliklere dayandırılmaktadır. Ayrıca SDG sahip olduğu;

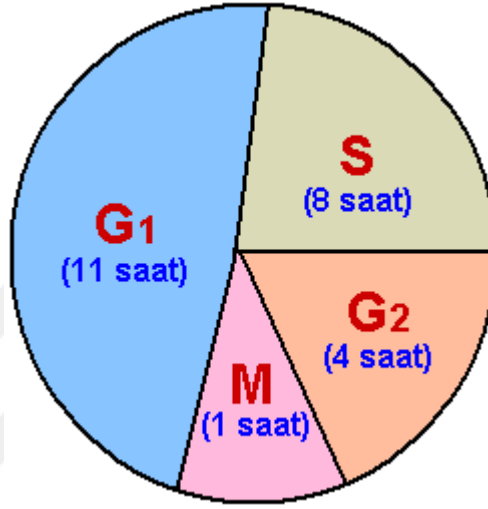
gerek hormonal gerekse antioksidan (non-hormonal) ya da östrojenik veya antiöstrojenik özellik; keten tohumunun kansere arşı koruyucu rol oynamasını sağlarken, antioksidan özelliği de hipolipidemik etki göstermektedir (15, 30). Hipertansiyon ile ilgili çalışmalarda SDG' nin, anjiyotensin konverting enzime (ACE) alternatif olduğu ve tansiyon azaltıcı etkisi olduğu da gözlemlenmiştir (24).. Sekoisolarikiresinol diglikozit başta olmak üzere daha başka birçok ligan, östrojenik ve antioksidan aktivitelerinden dolayı koruyucu olarak çeşitli kanser türlerinde çalışılmıştır (43). SDG sahip olduğu antioksidan ve kısmi östrojenik aktivitesi ile β - glikoronidaz aktivitesini de etkileyerek kolon kanseri oluşumunu engellediği bilinmektedir (15, 37). SDG' nin; meme, kolon, prostat gibi kanserlerde ve ateroskleroz gibi durumlarda koruyucu görev yaptığı da bilinmektedir (59, 61). SDG' nin kanserden koruyucu etki mekanizması hala tartışılmaktadır (43). Bu bilgiler eşliğinde yapılan çalışmalarla SDG' nin %75 oranında diyabetten koruduğu kanıtlanmıştır (37, 61). Bunun yanı sıra SDG'nin; kandaki total kolesterolü düşürdüğü, LDL ve glikoz düzeylerini azalttığı da bilinmektedir (56, 61). SDG'nin etkisinin araştırıldığı diğer birçok çalışmada kalp hastalıklarında önemli rolleri oldukları da gözlemlenmiştir (40, 62). Sekoisolarikiresinol diglikozit tüketiminin ardından az bir miktar ürünü ince bağırsakta emilir ve böbreklerden süzülerek idrara katılır. Daha büyük oranı ise kalın bağırsağa taşınır ve bağırsak mikroflorası tarafından metabolize edilir. Bağırsak mikroflorasının kritik önem taşımaya rağmen, hakkında çok az çalışma yapılmıştır (40, 42).

2.6. Hücre Döngüsü

Hücresinin normal yaşam döngüsü yani hücre siklusu genel olarak dinlenme ve bölünme dönemi olarak ikiye ayrılır. Dinlenme dönemi, yaşamsal faaliyetlerin devam ettiği ve bölünmeye göre daha uzun olan bir dönemdir; bu dönem G0 fazı olarak da adlandırılır. Bölünme dönemi ise mitoz bölünmeye hazırlığın yapıldığı G1, S ve G2 fazları ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazından oluşur (Şekil 5). G1 fazında DNA replikasyonunda kullanılacak olan RNA ve proteinlerin üretimi yapılır, S fazında DNA replikasyonuna başlanacak bölgeler işaretlenir ve DNA eşlenerek diploid (4N) hale getirilir, G2 fazında ise mitoz bölünme için gerekli olan son

hazırlıklar yapılır. Bir hücrenin iki eş hücre haline geldiği mitoz bölünme aşamasına da M fazı denilmektedir (7).

Ökaryotik hücre döngüsü; hücre büyümesi, DNA'nın iki katına çıkarılması ve iki katına çıkan kromozom ve hücre içeriğinin yavru hücrelere dağıtılması şeklinde gerçekleşir. Bütün bu aşamalar sıkı bir denetim altında düzenlenmekte ve aynı zamanda hücrelerin çoğalmasını kontrol altında tutan hücre dışı uyarılara da bağlı bulunmaktadır (7, 63).



Şekil 5: Hücre Siklusu (64).

Hücre siklusu sırasında mitoz yaklaşık 1 saatlik bir süreci kapsarken, siklusun %95'lik kısmı interfazda geçmektedir. Ökaryotik bir hücre genellikle 24 saatte bir bölünür. Bu bölünme 2 temel aşamadan oluşur. Bunlar mitoz ve interfaz aşamalarıdır. Mitoz; çekirdeğin bölünmesidir ve sonuçta sitoplazmanın bölünmesiyle (sitokinez) yavru hücreler oluşur (63).

DNA hasarı G2 gibi G1'de de hücrenin ilerleyişini durdurur. Bu aşamadaki kontrol noktası p53 proteindir. Yapılan çalışmalarda bazı kanser tiplerinde bu genin mutasyona uğradığı saptanmıştır (65). Hücre proliferasyonu sadece büyüme faktörlerince değil aynı zamanda hücre döngüsünü engelleyen sinyallerce de düzenlenir (63). Hücre döngüsü; protein kinazların aktivasyonu, hücre içi ifade düzeyleri, büyüme faktör sinyalleri ve hücrel mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Hücrelerin bir fazdan diğer faza geçişlerinde önemli rol oynayan düzenleyici proteinler cdk'lardır. Hücre döngüsü sürecinde cdk'ların aktiviteleri

birden fazla mekanizmaya bağlıdır (63, 66). Büyüme faktörlerinin yokluğunda hücreler sınırlanma noktasını geçemez, sessiz kalır ve dinlenme dönemi olan G0 dönemine girer (63, 67).

Yapılan çalışmalar, siklin ve cdk2'nin birçok proteinle ilişkili büyük bir ailenin üyeleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu ailenin değişik üyeleri hücre döngüsünün değişik aşamalarında görev almaktadırlar. Cdc2 hem G1, hem de G2'de kontrol noktasında görev alır ve bu görevini birçok siklinle beraber gerçekleştirir. Cdk'ların hücre döngüsündeki aktiviteleri en az dört moleküler mekanizma tarafından düzenlenir. Birinci düzey düzenlenme, cdk'nın ilgili sitokinle birleşmesini içerir. İkinci düzey, cdk/siklin bileşkesinin aktivasyonu cdk treonin rezidüsünün fosforilasyonuna ihtiyaç gösterir. Dolayısıyla cdk ailesinin bu üyeleri üç farklı hücresel aktivitede yani transkripsiyon, DNA tamiri ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev almaktadırlar. Üçüncü düzey ise; treonin ve tirozin rezidülerinin fosforillenmesidir. Bunların fosforillenmesi cdk inaktivasyonuna neden olur. Defosforile olmaları ile cdk aktive olur. Cdk'ların düzenlenmesinde dördüncü mekanizma inhibitör proteinlerin cdk/siklin bileşğine bağlanmasıdır. Bunlara örnek p21'dir. Bu dört mekanizmanın toplam etkisi ile dış uyarılara ve denetim noktalarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrol eşliğinde devam etmektedir (9, 63, 67).

2.7. Apoptozis

Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K. Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen bir ölüm şekli için kullanılmıştır (7). Apoptozis, hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da neoplastik hücrelerin yok edilmesi olarak tanımlanır.

Doku homeostazisi, apoptoz ile hücre çoğalması arasındaki dengenin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır ve bu dengenin bozulması kanser oluşumunun en büyük nedenlerinden biridir (7, 68). Hücre çoğalmasının kontrolsüz bir şekilde artması ve apoptoz işlevinin azalması, karsinogeneze aracılık etmektedir (9).

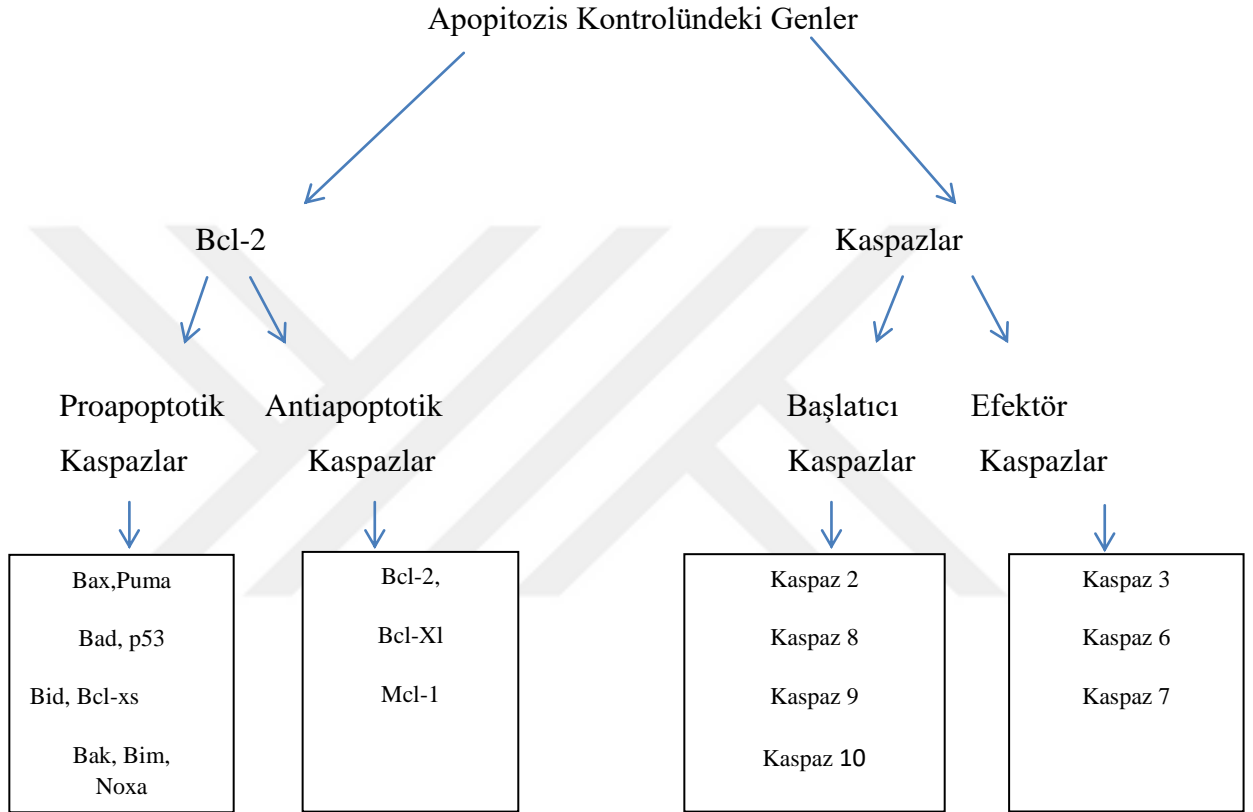
Apopitotik hücre ölümünde, nekrozdan farklı bir süreç işler. Apoptozis, nekrozun tam tersine tamamen kontrollü ve programlı bir hücre ölümüdür (7, 68). Apoptoz olayını gerçekleşmesi esnasında gözlenen genetik olaylar hem en toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştirdiği açık olduğundan, hem de bu işlemde tümör supresör genleri ile onkoproteinlerin birlikte iş görmesi açısından önemlidir (66, 68).

Apoptoz, ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki ana mekanizmadan oluşur: **Ekstrinsik** yolda apoptozis; radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi hücre dışı uyaranlar TNF, Fas, nöron büyüme faktörü (NGF), IGF, IL-2 gibi maddelerin ortamda azalmasına neden olurlar. **Intrinsik** yolda Apoptozis ise; radyasyon, DNA hasarı nedeniyle bir tümör baskılayıcı gen olan p53 aktive edilir. Hücre içinde ise viral-bakteriyel enfeksiyonlar, sitokinler, hücredeki kalsiyum miktarında artış gibi hücre içi uyaranlar tarafından uyarılır (7).

Apoptoz kontrolünde önemli genler **Bcl-2 ailesi** ve **kaspazlardır** (Şekil 6). Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik üyelerden oluşur. Bunlar; **proapoptotik**: Bax, Bad, Bid, Bcl-xs, p53, Bak, Bim, Noxa, **anti-apoptotik**: Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 şeklindedir. Bir hücrenin devamlılığı, bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin oranına bağlıdır. Eğer Bax fazla ise hücre apoptoza gidecektir, Bcl-2 fazla ise apoptoz inhibe edilecektir (9). Kaspazlar birbirlerini aktive ederek proteolitik bir kaskad oluştururlar. **Başlatıcı kaspazlar**; kaspaz 2, 8, 9, 10, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini alıp efektör kaspazlara iletirken, **efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6, 7** de ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (7).

Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir. Proapoptotik gen olan p53, apoptozu uyarıcı bir proteindir. DNA koruyucusu olarak ta bilinen p53 proteini, proapoptotik bir protein olup tümör baskılayıcı protein olarak da bilinmektedir. Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu uyarmakta ve malignan oluşumunu engellemektedir (9). Yapılan araştırmalardan edinilen sonuçlara

dayanarak Siklin-A, PCNA, Cdc-2, P53, Cmyc'nin yüksek seviyeleri sürekli olursa ve bu durum hücrenin G1/S fazında durması olayı ile birleşirse hücrenin apoptotik döngüye girdiği söylenebilir. Bu proteinlerin yüksek seviyelerinin daimi hale gelmesi bir protein ailesi ya da özel bir proteinin kendine özgü alanının maskelenmesinin bir sonucu olarak gerçekleşir. Sonuç olarak hücre genomu stabil değildir ve bütün hücreler potansiyel olarak tümör oluşturabilir (9, 68).



Şekil 6: Apoptozis Kontrolündeki Genler.

2.8.Hücre Kültürü

Hücre kültürü; canlı hücrelerin, ait oldukları organizma dışında laboratuvar ortamında (*in vitro*) kültüre edilmesidir. Hücre kültürü ilk kez 1907 yılında kurbağa sinir hücrelerinin incelenmesinde kullanılmıştır (9, 65, 69, 70). Hücre kültür aşamaları: Medyum hazırlama, hücreleri büyütme - pasajlama ve çoğaltma, azot tankında saklama, dondurulan hücrelerin saklanması şeklindedir (9, 65).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Kullanılan Malzeme Ve Cihazlar

3.1.1.1. Kimyasal Malzemeler – İlaçlar – Kitler - Çözeltiler

RPMI 1640 Medium (21875-034) - DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Appllichem),

DPBS (Gibco 14190-090) - PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma),

Formaldehit (Riedel – de Haen) - Metanol (Merck 106008),

Absolü Etanol (Merck 100983) - H₂O₂ (Merck 108600),

Trypan Blue (Sigma T6146) - Parafin (VMS Chemical),

CaCl₂ (Merck 2380) - HCL (Merck 113386),

Ksilol (Riedel – de Haen) - Agar (Merck 101614),

NaHPO₄ (Merck 106586) - NaH₂PO₄ (Merck 106346),

KCl (Merck 104934) - KH₂PO₄ (Merck 105108).

Penisilin Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B) - Tripsin (Gibco, 15050-065)

BRDU (Sigma B5002) - BRDU Staining Kit Streptavidin - Biotin System (Zymed 96-3-3943) - Detection Syatem Anti – Polyvalent AEC/HRP (Zymed),

Aueous –Mount (Zymed) - Rabbit ABC Staining System (Santa Cruz),

Kaspaz - 3 için, Primer ve Sekonder Antikor Kompleks Kit (Santa Cruz),

Fetal Sığır Serumu (Biological Industries, 04-007-1A) - L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B) - NaOH (Merck 106495) - NaCl (Merck 106406),

24 ve 6 kuyucuklu hücre petrilere (Plate) (Costar 3526),

75 cm² hücre büyütme kapları (Flask) (Corning REF, 430641U),

Pipet uçları (Corning incorporated, 4860),

Serolojik pipetler (10 mL) (Costar stripette, 4488),

Şırınga filtreleri (0.22 µm) (Corning incorporated NY, 14831),

Eppendorf (labasel Direvite 98/79/CE) - Kriyo tüp, CRYO.S™ (Greiner bio-one E130203P).

AGAR: 3 gr agar 100 ml ultrapure su içerisinde karıştırılır. Otoklavda 121 °C de, 3 atm basınçta steril edilir.

H₂O₂: 1.5 ml H₂O₂ - 98.5 ml metanole ilave edilir.

HCl: 12.08 ml HCl – 87.92 ml distile suda çözülür.

% 5 CaCl₂: 5 gr CaCl₂ - 100 ml distile suda çözülür.

NaOH: 1 gr NaOH - 100 ml distile suda çözülür.

3.1.1.2. Hücre Hattı ve Bitki Ekstraktı

Çalışmamızda Linaceae familyasına ait *Linum usitatissimum* bitkisinin ekstraktı Sekoisolarikiresinol Diglikozit ve DSMZ'den alınan CCL-228- SW 480 kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Bitki ekstraktı Sigma'dan temin edildikten sonra buzdolabında ve karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

3.1.1.3. Kullanılan cihazlar

Laminar Akım Kabini (ISO TS EN 12469) - İnvirt Mikroskop (Olympus CKX41),

CO₂ İnkübatörü (Heal Force) - Sıvı Azot Tankı (Thermolyne),

Su Banyosu (Leica) - Otoklav (Hüreyama HVY- 50),

Manyetik Karıştırıcı (Nüve) - Mikrotom (Leica),

Santrifüj (Nüve NF 200) - Buzdolabı (Siemens),

Derin Dondurucu (U 410 Premium) - Pipet Aid (LEVO PLUS).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Hattının Temini ve Hücre Soyunun Açılması

Çalışmamızda DSMZ'den alınan CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücre soyları kullanıldı. Soğuk zincir ile donmuş olarak ulaştırılan hücreler, 37 °C 'lik su banyosunda çözünmeye bırakıldı. Çözünen hücre süspansiyonu (50 ünite/ml penisilin ve streptomisin, 1,0 mM sodyum piruvat, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asit, % 90; inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu ile zenginleştirilmiş RPMI 1640 mediumlu hücre) santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 1-2 ml medium ilave edilerek 4000 RPM de 3 dk sanrifüj edildi. Santrifüjden alınan hücrelerin üzerindeki süpernatant kısmı atıldı, tekrar 1-2 ml medium ilavesi ile aynı şekilde bir kez daha sanrifüj edildi. Sanrifüj işleminden sonra tüpte kalan pelete 2-3 ml medium eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı ve medium eklenmiş flaslara eşit miktarlarda ekim yapılarak flaslarda etüvde kültüre edildi.

3.2.2. Hücre İnkübasyon Koşulları ve Hücrelerin Çoğaltılması

CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücreleri; %5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki CO₂ inkübatöründe 75 cm²'lik flaslarda steril şartlarda inkübe edildi. Böylelikle hücrelerin çoğalmaları sağlanmış oldu. Hücreler maksimum yoğunluklarına ulaşmış flaskın yüzeyini tamamen kaplayınca, haftada iki kez pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

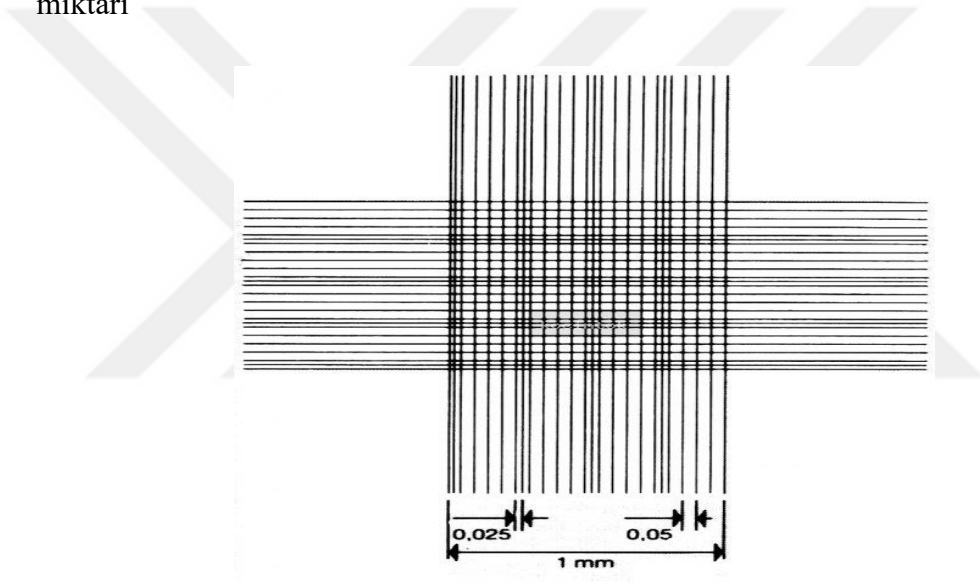
Üremekte olan hücreler, %80-90 doyumluğa (confluent) ulaşınca yeniden pasajlandı. Hücreler istenen yoğunluğa ulaştığında; flaskların içerisindeki medium pipetle alınarak steril fostat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 2 ml, 75 cm² için 4 ml) ile yıkandı. Ardından PBS pipetle uzaklaştırıldı ve hücrelerin yapıştıkları alandan kaldırılması için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde bekletildi. Yüzeye yapışık olan hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre + tripsin-EDTA solüsyonuna 2 ml kadar medium ilave edilip, 15 ml hacimli bir tüp içerisine alındı. Tüpe alınan süspansiyon 4000 RPM'de 3 dk santrifüj edildi, ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler taze hücre medyumunu ile süspanse

edilerek 75 cm² lik flasklara bölünerek yeniden pasajlandı. Yeniden pasajlanan hücreler 37° C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.4. Hücre Sayımı Hesaplaması

1ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 1.5 ml’lik tüpe konuldu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırılarak hesaplama işlemi için thoma lamına alındı (Şekil 7). Karışım thoma lamı üzerine konulduktan sonra 16 kare içindeki kareden bir tanesindeki hücreler sayıldı.

Toplam Hücre Sayısı/ ml = hemasitometre sayım sonucu x 16 x 10⁴ x medium miktarı



Şekil 7: Thoma Lamı (12).

3.2.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler %0.25’ lik tripsin ile yüzeyden kaldırıldı ve tripsinin etkisini engellemek için üzerine medyum eklendi. Hücre süspansiyonu 4000 RPM’de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlemden sonra pellete DMSO’ lu medyum karışımından 1 ml ilave edildi ve pipetaj yapılarak kriyo tüplere konuldu. Kriyo tüpler 1 gece -20 °C’ de, 1 gece -80 °C’ de bekletildikten sonra sıvı azot tankına konularak saklandı.

3.2.6. Sekoisolarikiresinol Diglikozitin Doz Belirleme Deneyi

Pasajlama seviyesine ulaşmış olan hücreler, flasklardan tripsin yardımıyla kaldırıldı ve üzerine medyum ilavesi ile tüplere konularak santrifüj edildi, süpernatant kısmı atılan tüplere tekrar medyum ilave edilerek pipetaj yapıldı. Süspansiyon haline getirilen hücreler hemasitometride sayıldı. Deneylede 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Her kuyucuğa canlı olacak şekilde 500.000 hücre medium içinde ekildi. Sekoisolarikiresinol diglikozitin uygun doz aralığı için literatürler dikate alınarak; 40 – 50 – 75 – 100 – 150 - 200 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde taze çözeltileri 100'er μ M'lik eşit hacimlerde 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki hücrelere verildi. Etken maddenin tüm dozları için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar için 24., 48. ve 72. saatler sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler tripsin ile ayrı ayrı toplandı ve hemasitometre de sayılarak kaydedildi. Etken maddenin inhibisyon dozu (ID50 ya da IC50) değeri belirlendi.

3.2.7. İki Boyutlu Kültürlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve SDG'nin doz belirleme deneyinde hesaplanan inhibisyon dozu kullanıldı. 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37 °C'de inkübe edildi. Üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'te 37 °C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra % 70 etanolde 4 °C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi. İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış % 0.5 H₂O₂'de 10 dk tutulup 3 kez 2'şer dk distile su ile yıkandı. Daha sonra BrdU Staining Kit Streptavidin-Biotin System adı verilen BrdU boyama kiti kullanılarak boyama yapıldı. Kit içerisindeki denatürasyon solüsyonunda 30 dk bekletilip, PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. 10 dk blocking solüsyonunun ardından 1 saat primer antikorda, (Biyotinli mouse anti-BrdU monoclonal) nemli ortamda oda ısısında tutulup, 3 kez PBS ile 2'şer dk yıkandıktan sonra streptavidin peroksidazda 10 dk bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk

morarmaya bırakıldı ve kapatıcı (Ultramount) ile kapatılarak, ışık mikroskopunda sayım yapıp işaretlenme oranları belirlendi.

3.2.8. İki Boyutlu Kültürlerde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Metodu

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve SDG'nin doz belirleme deneyinde hesaplanan inhibisyon dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS' te 37 °C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra % 70 etanolde 4 °C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi. İmmünohistokimya için lameller PBS'te iki kez 5'er dk yıkayıp 2:1 oranında hazırlanmış etanol-asetik asit karışımında -20 °C'de 5 dk bekletildi. PBS'te iki kez 5'er dk yıkandıktan sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂ 'de 5 dk tutularak iki kez 5 dk PBS ile yıkandı. Kitin içeriğinde bulunan potasyum kokodilat, DTT, BSA, kobalt klorid ve Tris-HCl'den oluşan dengeleyici tampon (equilibration buffer) ile oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bu aşamadan sonra kesitler biotinli nükleotid karışımı (biotinylated nucleotide mix), rTdT enzimi ile dengeleyici solüsyondan oluşan rTdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) reaksiyon karışımı ile 37 °C'de 1 saat bekletildi. Negatif kontroller için rTdT enzimi yerine deiyonize su konuldu. Örnekler, 2X SSC ile oda ısısında 15 dakika bekledikten sonra PBS ile yıkayıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için hidrojen peroksid (H₂O₂) ile muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama aşamasından sonra streptavidin HRP solüsyonu ve sonra DAB-kromojenle (DAB kromojen) ile muamele edildi. Açık kahverengi renk gözlendikten sonra metil green ile zıt boyama yapılarak deiyonize su ile yıkayıp, alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve kapatıcı (Mounting Medium) ile kapatılarak ışık mikroskopunda işaretlenme oranı belirlendi.

3.2.9. İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve SDG'nin doz belirleme deneyinde hesaplanan inhibisyon dozu kullanıldı. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip

atıldıktan sonra PBS'te 37 °C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra % 70 etanolde 4 °C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi. İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk tutularak 3 kez 5 dk distile su ile yıkandı. Daha sonra 30 dk 4 N HCl'de bekletilip PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. 20 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda (kaspaz -3), nemli ortamda ve oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorda (Biotinylated goat anti-mouse) 20 dk, tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda yine 20 dk bekletildi. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bırakılarak, distile su ile yıkandı. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

3.2.10. İki Boyutlu Kültürlerde AIF İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100.000 hücre lamel üzerine ekildi ve SDG'nin doz belirleme deneyinde hesaplanan inhibisyon dozu kullanıldı. 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS'te 37 °C etüvde 15 dk bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra % 70 etanolde 4 °C'de 30 dk bekletilerek hücreler tespit edildi. İmmünohistokimya için lameller PBS'te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk tutularak 3 kez 5 dk distile su ile yıkandı. Daha sonra 30 dk 4 N HCl'de bekletilip PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. 20 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda (AIF), nemli ortamda oda ısısında tutuldu. 3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorda (Biotinylated goat anti-mouse) 20 dk, tekrar yıkamadan sonra streptavidin peroksidazda yine 20 dk tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bekletilip ve distile su ile yıkandı. Mayer hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı. Kapatıcı (Ultramount) ile kapatılıp ışık mikroskobunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

3.2.11. Üç Boyutlu Sferoid Modelde Hücre Kültürü Deneyleri

Üç boyutlu hücre kültürünün (sferoid) *in vivo* katı tümör özelliklerine daha yakın olduğu için son yıllarda yapılan çalışmalarda sferoid modelin önemi artmıştır. Sıcak su içerisinde eritilen %3 agar solüsyonu (60 °C) ve medyum (40 °C) karışımı 2:1 oranında hazırlanarak 6'lı kuyucuklara, 1 ml konarak tüm yüzeyi pürüzsüz bir şekilde kaplanması sağlandı. Agarın donması için kültür kapları 10 dk buzdolabında 4 °C'de bekletildi. Agarın donmasının ardından kuyucuklara 3 ml RPMI 1640 medyum eklendi. Hücreler flasklardan kaldırma yöntemiyle aynı şekilde kaldırılarak toplandı ve her bir kuyucuğa 500.000 hücre ekildi. Her bir grup için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. Hücreler, %5 nem içeren ve 37 °C olan inkübatörde tutularak sferoid oluşturmaları için 7-15 gün bekletildi. Haftada iki kez olmak üzere spontan çöktürme yöntemi ile medyum değişimi yapıldı. Büyüklüğü 100 - 400 mikrona ulaşan sferoidlere önceden bulunan inhibisyon dozunda SDG, kontrol grubu için ise DMSO verilerek 37 °C de inkübe edildi.

3.2.12. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

Etken madde uygulanan sferoidler, 5-bromo-2-deoksiuridin (BrdU) ile 1 saat 37 °C' de inkübe edildi. Sferoidler 15 ml' lik falkon tüplerine aktarılıp, üst medyum atılarak PBS ile yıkandıktan sonra % 10 formaldehitte 30 dakika bekletildi. Yumurta akı uygulamasından sonra % 70 etanol içinde 24 saat oda ısısında bırakıldı. 24 saat sonunda çıkarılan sferoidler ışık mikroskobu takibi için artan alkol serilerinden geçirildi. 56 °C 'de 30 dk ksilolde bekletildikten sonra parafin blokların hazırlanması için 45 dk parafinle inkübe edildi. Parafin kesitler, Poli-L-Lizine kaplanmış lamlara aktarıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra sırasıyla %0.5 H₂O₂ de 1 dk, tripsinle 10 dk, HCl solüsyonunda 30 dk muamele edildi. 0.1 M Boraks solüsyonu inkübasyonunu takiben 15 dk Ultra-V-Block'ta bekletildi. Daha sonra mouse anti-BrdU primer antikorunda (mouse monoclonal antikor) nemli ortamda 1 saat oda ısısında bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikorla (Biotinlylated Goat Anti-Mouse) 30 dk ve ardından streptavidin peroksidazla 30 dk muamele edildi. Substrat-kromojenle (AEC Substrate System) 20 dk bekletildikten

sonra distile su ile yıkanarak, Mayer hematoksilen ile boyandı. Kesitler son olarak kapaticı (Aqueous Ultramount) ile kapatılıp, ışık mikroskobunda BrdU-işaretleme indeksi (BrdU-LI) değerleri belirlendi.

3.2.13. Üç boyutlu kültürde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Metodu

Doku kesitlerinde ve hücre kültürlerinde apoptotik ve nekrotik hücreleri birbirinden ayırmak amacıyla apoptozun biyokimyasal belirteci olan nükleer DNA kırılmasını radyoaktif olmayan, kolorimetrik olarak ölçmeye yarayan apoptoz saptama-TUNEL kiti (Colorimetric TUNEL System) kullanıldı. Etken madde uygulanan sferoidler daha sonra, 15 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı. Üst medyum atılıp PBS ile yıkandıktan sonra %10 formaldehitte 30 dakika bekletildi. Yumurta akı uygulamasından sonra %70 etanol içinde 24 saat oda ısısında bırakıldı. 24 saat sonunda çıkarılan sferoidler ışık mikroskobu takibi için artan alkol serilerinden geçirildi. 56 °C de 30 dk ksilolde bekletildikten sonra parafin blokların hazırlanması için 45 dk parafinle inkübe edildi. Poli-L-Lizine kaplanmış lamlara aktarılan parafin kesitlerden, ksilen kullanılarak parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan etanol serilerinden (%100, %95, %85, %70 ve %50) geçirilerek dehidrate edilerek, sırasıyla %0.85 NaCl ve PBS ile yıkandı. Lam hidrofobik işaretleme kalemi (Immunopen) ile sferoidlerin yeri belirlendikten sonra kesitler oda sıcaklığında 20 dakika 20 µg/ml Proteinaz K ile muamele edildi. Süre sonunda PBS ile yıkandı. Pozitif kontrollerin hazırlanması için bazı örnekler bu aşamadan itibaren apoptozda olduğu gibi DNA kırılması oluşturmak amacıyla DNaz I solüsyonu ile muamele edildi.

Kitin içeriğinde bulunan potasyum kokodilat, DTT, BSA, kobalt klorid ve Tris-HCl'den oluşan dengeleyici tampon (equilibration buffer) ile oda ısısında 10 dk bekletiletildi. Bu aşamadan sonra kesitler biotinli nükleotid karışımı (biotinylated nucleotide mix), rTdT enzimi ile dengeleyici solüsyondan oluşan rTdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) reaksiyon karışımı ile 37 °C'de 1 saat inkübatörde bekletildi. Negatif kontroller için rTdT enzimi yerine deiyonize su konuldu. Kesitler, 2X SSC ile oda ısısında 15 dakika bekledikten sonra PBS ile yıkayıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Kesitler, tekrar PBS ile yıkama aşamasından sonra Streptavidin

HRP solüsyonu ve sonra DAB - kromojenle ile muamele edildi. Açık kahverengi renk gözlemlendikten sonra metil green ile zıt boyama yapıp alkol ve ksiliol serilerinden geçirilip mounting medium ile kapatılarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.2.14. Üç Boyutlu Kültürlerde Kaspaz-3 İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

Etken madde verildikten 24., 48. ve 72. saat sonra sferoidler, 15 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı. Üst medyum atılıp PBS ile yıkandıktan sonra % 10 formaldehitte 30 dakika bekletildi. Yumurta akı uygulamasından sonra % 70 etanol içinde 24 saat oda ısısında bırakıldı. 24 saat sonunda çıkarılan sferoidler ışık mikroskobu takibi için artan alkol serilerinden geçirildi. 56 °C' de 30 dk ksilolde bekletildikten sonra parafin blokların hazırlanması için 45 dk parafinle inkübe edildi. Parafin kesitler Poli-L-Lizine kaplanmış lamlara aktarılarak deparafinize edildikten sonra metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. Tripsinde 10 dk 37 °C etüvde bekletildikten sonra 3 kez 2 dk PBS'te bekletildi. Daha sonra 1 saat blokama solüsyonunda bekletilerek yıkama yapmadan 1 gece kaspaz 3 primer antikorda nemli ortamda 4 °C' de tutuldu. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikorda 30 dk, PBS ile yıkamadan sonra avidin ve biyotinli HRP içeren AB enzim solüsyonunda 30 dk, tekrar yıkamanın ardından peroksidaz substratta 10 dk bekletileerek, distile su ile yıkandıktan sonra mayer hematoksilen ile boyama yapıldı. Çeşme suyuna alınan kesitler morarana kadar bekletildi. Daha sonra kesitler ultramount kapatıcı ile kapatılıp ışık mikroskopunda değerlendirildi.

3.2.15. Üç Boyutlu Kültürlerde AIF İle İmmünohistokimyasal İşaretleme

Etken madde verildikten 24., 48. ve 72 saat sonra sferoidler 15 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı. Üst medyum atılıp PBS ile yıkandıktan sonra tespit solüsyonu %10 formaldehitte 30 dakika bekletildi. Yumurta akı uygulamasından sonra %70 etanol içinde 24 saat oda ısısında bekletildi. 24 saat sonunda çıkarılan sferoidler ışık mikroskobu takibi için artan alkol serilerinden geçirildi. 56 °C' de 30 dk ksilolde bekletildikten sonra parafin blokların hazırlanması için 45 dk parafinle inkübe edildi.

Parafin kesitler, Poli-L-Lziine kaplanmış lamlara aktarıldı Daha sonra kesitlerden parafin uzaklaştırıldı ve metanolde hazırlanmış %0.5 H₂O₂'de 10 dk karanlıkta bekletildi. PBS ile 3 kez 2 dk yıkandı. Tripsinde 10 dk 37 °C etüvde bekletildikten sonra 3 kez 2 dk PBS'te bekletildi. Daha sonra 1 saat bloklama solüsyonunda bekletilerek, yıkama yapmadan 1 gece AIF primer antikorda nemli ortamda 4 °C'de tutuldu. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikorda 30 dk, PBS ile yıkamadan sonra avidin ve biyotinli HRP içeren AB enzim solüsyonunda 30 dk, tekrar yıkamanın ardından peroksidaz substaratta (substrat buffer + DAB kromojen + peroksidaz substrat içeren soüsyon) 10 dk bekletildi ve distile su ile yıkandıktan sonra Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapılarak ve çeşme suyuna alındı. Çeşme suyunda morartılan kesitler ultramount kapatici ile kapatılarak ışık mikroskobunda değerlendirildi.

3.2.16. Hematoksilen Eozin Boyama

Deparafinize edilen kesitler sırasıyla %96 - %90 - %80 -%70 alkol serilerinden geçirildi ve distile suya alındı. Kesitler daha sonra hematoksilen de 3 dk bekletilip çeşme suyunda morarana kadar yıkandı, ardından eozinde 2 dk bekletildi ve tekrar çeşme suyunda yıkandı. Son olarak alkol serilerinden (%70- %80 - %90 - %96) geçirilerek ksilole alınan dokular entallan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

3.2.17. Gen Ekspresyon Tayini

Hücreler ekstrakt ile 24., 48. ve 72. saat inkübe edildikten sonra RNA izolasyon kiti kullanılarak total-RNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen RNA' ları komplementer DNA' ya (c-DNA) çevirmek için kit kullanıldı. Gerekli primerler kullanılarak gen ekspresyon çalışmaları, eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) tabanlı sistemle ile çalışıldı.

3.2.18. İstatistiksel Analiz

Örneklere ait verilerin gen ekspresyon skorları, SPSS® for Windows computing program, Version 15,0 ile gerçekleştirildi. Sonuçlarda ortalama ± standart sapma kullanıldı. Gruplardan elde edilen veriler arasında fark olup olmadığını

görmek için varyans analizi yapıldı. Analizler RT² Profiler Data Analysis Software-Qiagen'ın data analysis ile ve 2' Average delta CT ile yapıldı. Relative Gen ekspresyonu için 2^{-ΔΔCt} metodu kullanıldı. P değerinin 0.05' in altında (p < 0.05) olması istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

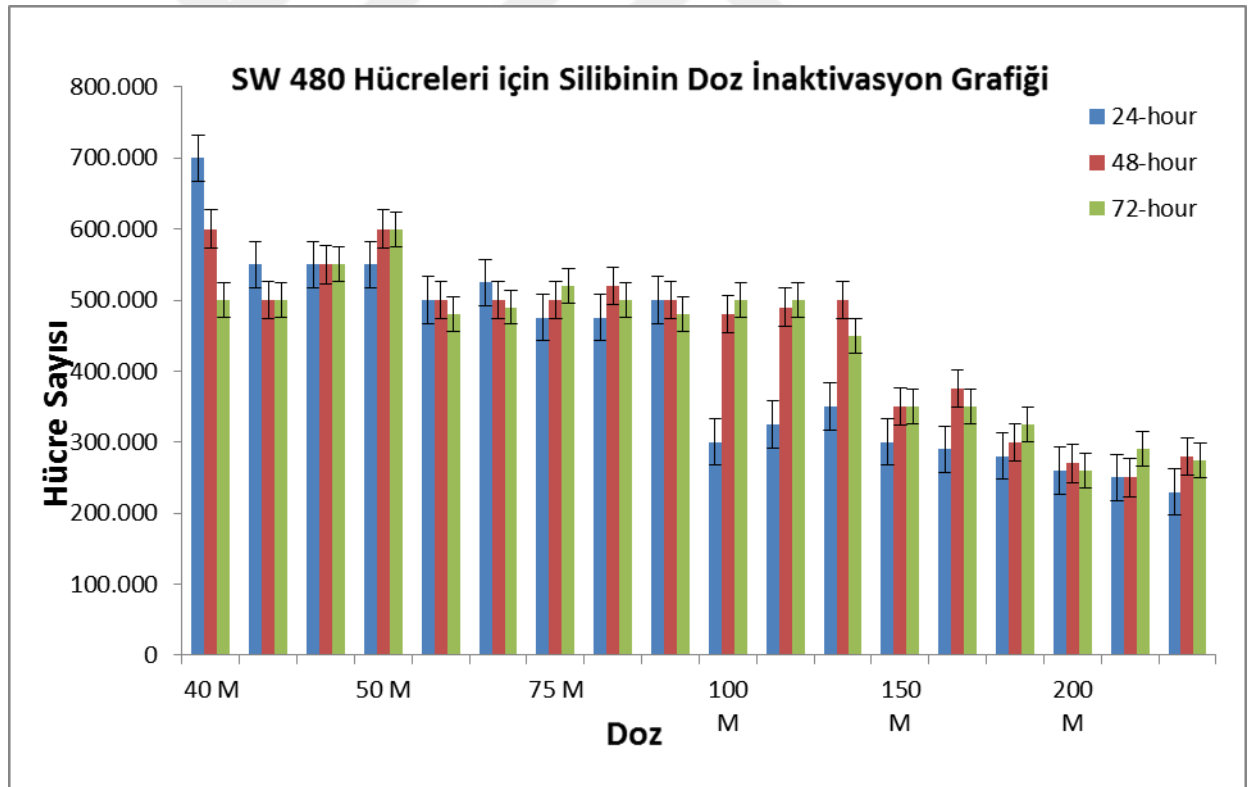


4. BULGULAR

4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları

Doz belirleme için kullanılan 5 ml RPMI 1640 medyumuna ilave edilen 6 kuyucuklu platelerin herbirine canlı olarak 5000.000 SW 480 hücresi ekimi yapıldı. Ketan tohumu ekstraktı olan SDG, DMSO içerisinde çözünerek 40 - 50 - 75 - 100 - 150 - 200 μ M dozlarında 100' er μ l'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi.

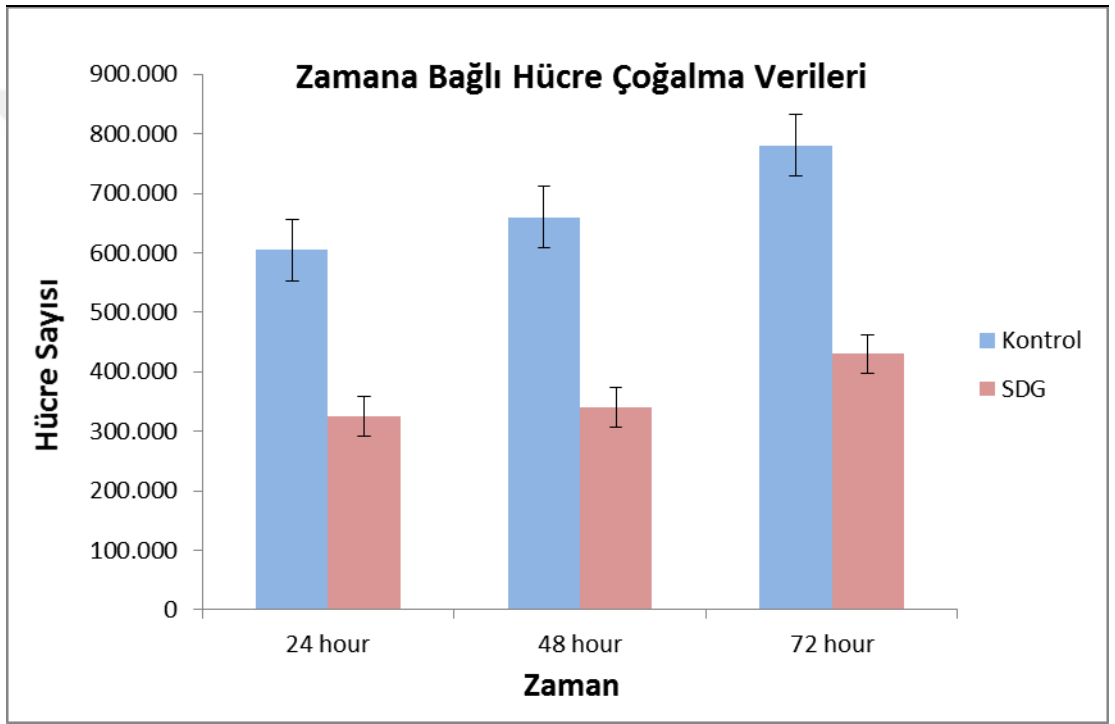
24., 48. ve 72. saatlerin sonunda kuyucuklardaki hücreler tripsin ile kaldırılarak toplanıp, santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml medyum eklenip, pipetaj yapılarak thoma lamına damlatıldı ve sayım yapıldı. Hücre sayımı kaydedilip IC50 her saat için ayrı olarak; 24 saat için 100 μ M, 48. ve 72. saatler için 150 μ M olarak hesaplandı (Grafik 1).



Grafik 1: SDG 'nin Doz İnaktivasyon Grafiği

4.2. Proliferasyon Deneyi Bulguları

6 kuyucuklu plateler kontrol ve SDG grubu olarak ayrılarak sayım işlemi yapıldı. Kontrol grubuna ait kuyuculardaki hücre sayılarında zamanla orantılı olarak artma gözlemlendi. Deney grubunda doz belirleme deneyinde her üç saat için ayrı ayrı bulunan IC50 dozuna uygun olarak ekstrakt verilerek sayım yapıldı ve SDG' nin verilmesiyle hücre sayılarında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$), (Grafik 2).

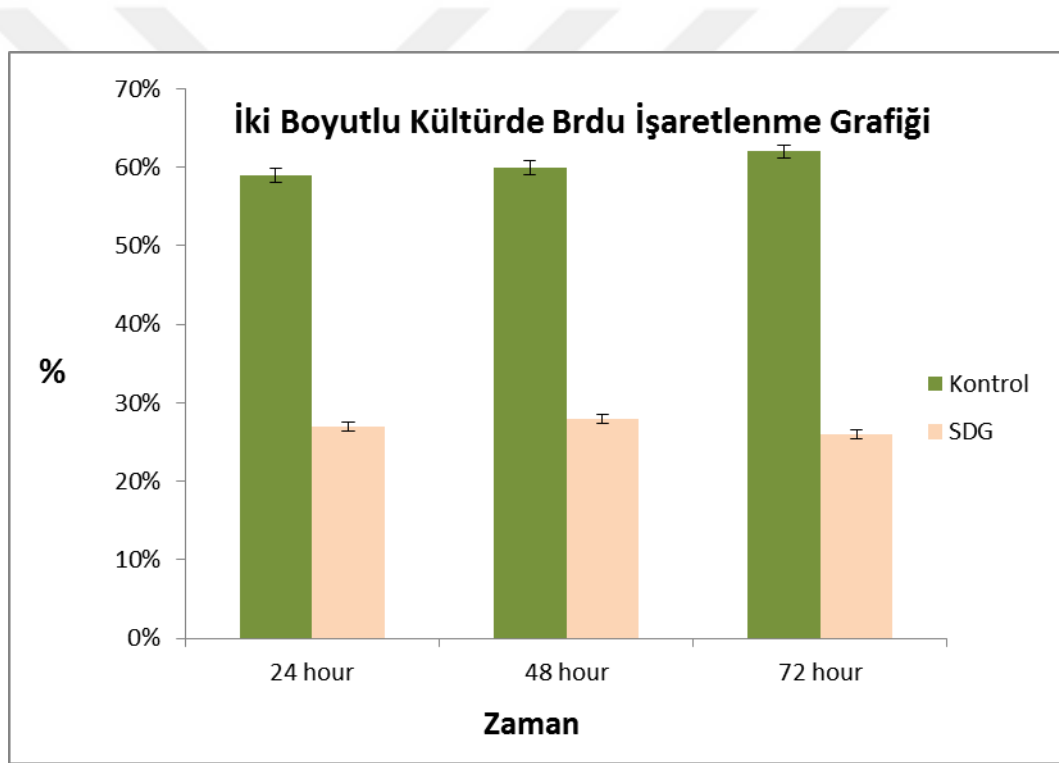


Grafik 2: Zamana Göre Hücre Çoğalma Verileri

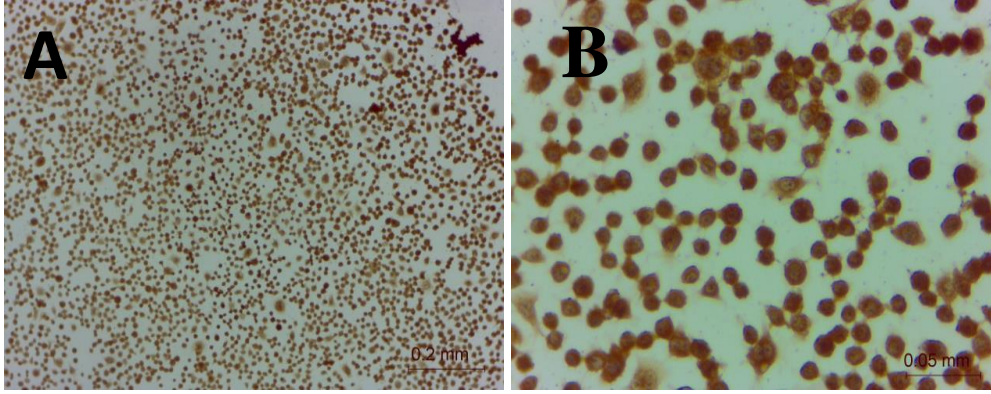
4.3. İki Boyutlu Kùltùrlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları

24 kuyucuklu platelere yuvarlak lameller úzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan BrdU işaretlemesi; her bir saat için (24, 48, 72) ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde sentez fazında çok sayıda BrdU ile işaretlenmiş hücresler gözlemlendi (Resim 1, 3, 5).

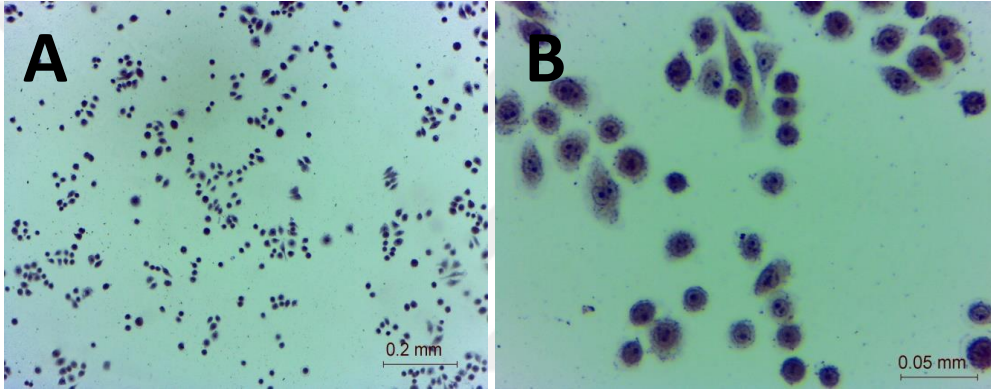
24 – 48 - 72 saatleri için verilen SDG gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla BrdU işaretleme indeksinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0.05$), (Grafik 3), (Resim 2, 4, 6).



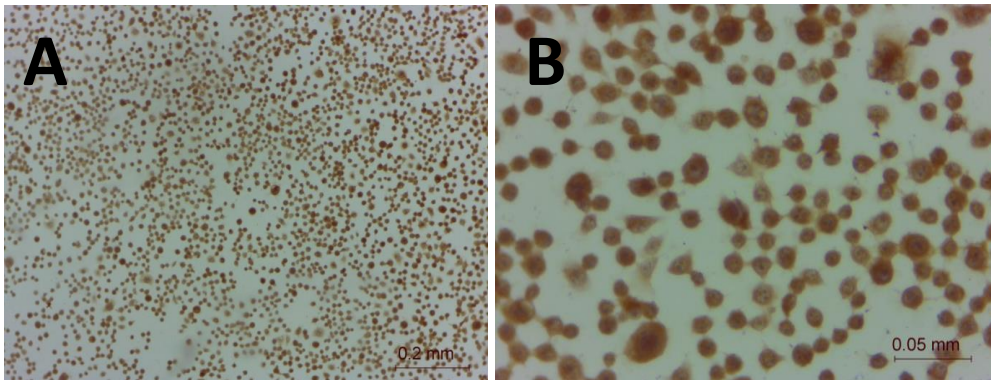
Grafik 3: İki Boyutlu Kùltürde BrdU İşaretleme Grafiği



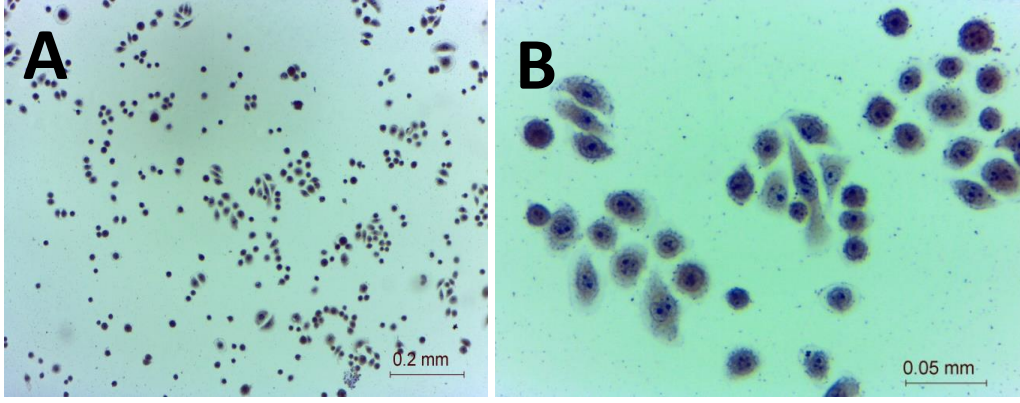
Resim 1: 24. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A, 20x büyütme, B, 40 x büyütme)



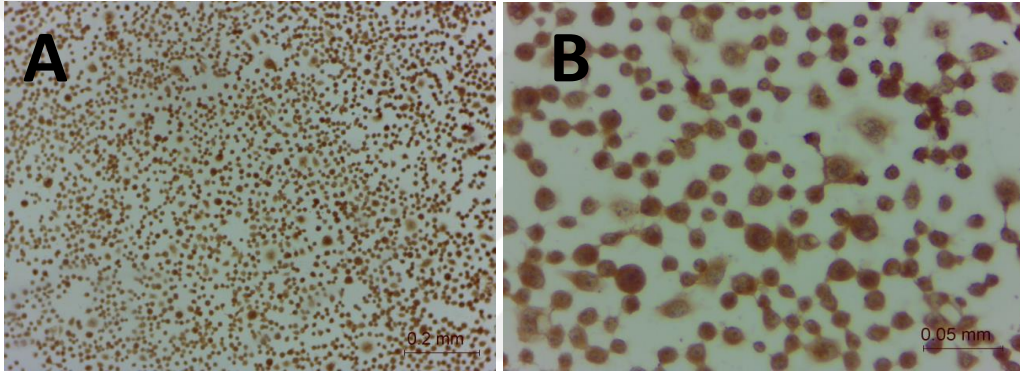
Resim 2: 24. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



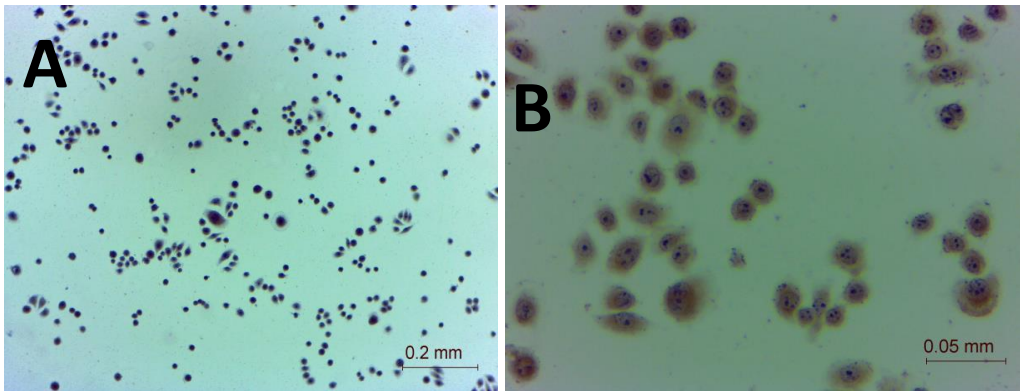
Resim 3: 48. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 4: 48. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 5: 72. Saat Kontrol Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

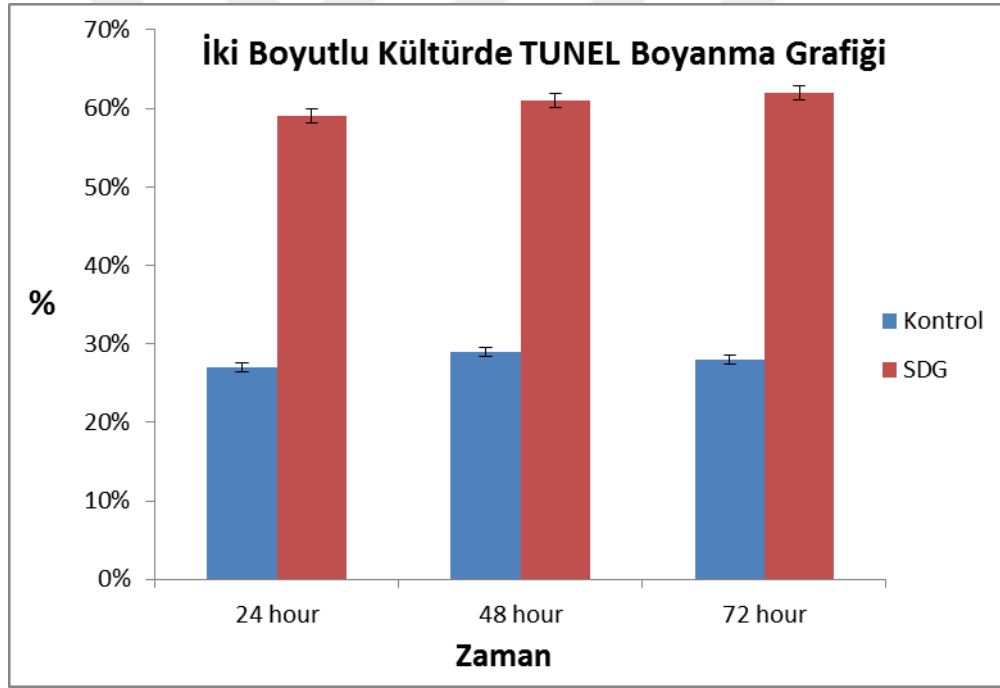


Resim 6: 72. Saat SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

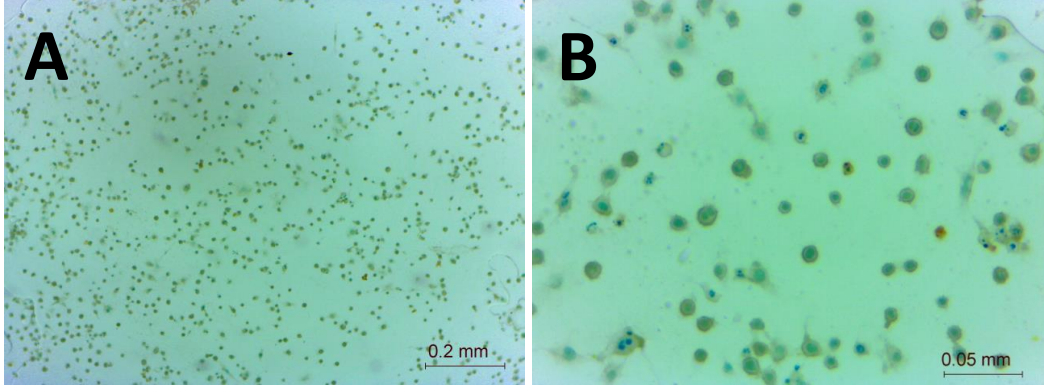
4.4. İki Boyutlu Kültürlerde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt)Mediated Nick-End Labeling) Bulguları

24 kuyucuklu platelere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan TUNEL işaretleme; her bir saat için (24., 48., 72.) ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde çok az sayıda apoptotik hücre (TUNEL ile pozitif boyanan hücre) gözlemlenirken (Resim 7, 9, 11), 24. - 48. - 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda apoptotik hücre gözlemlendi.

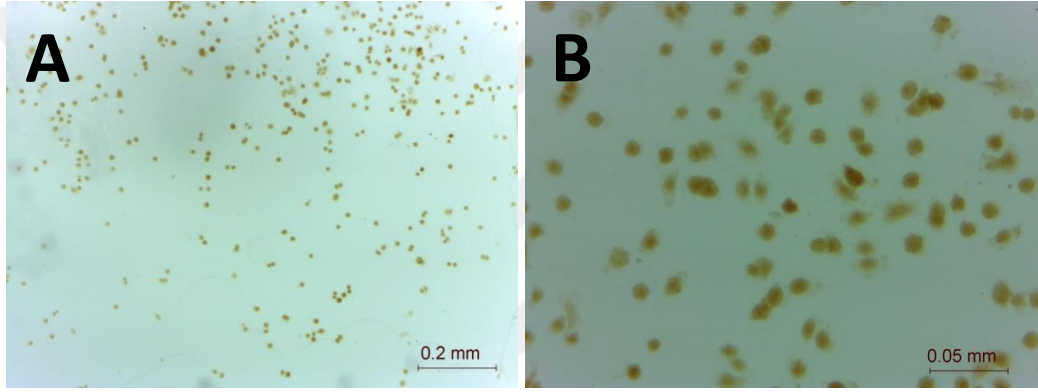
($p < 0.05$), (Grafik 4), (Resim 8, 10, 12).



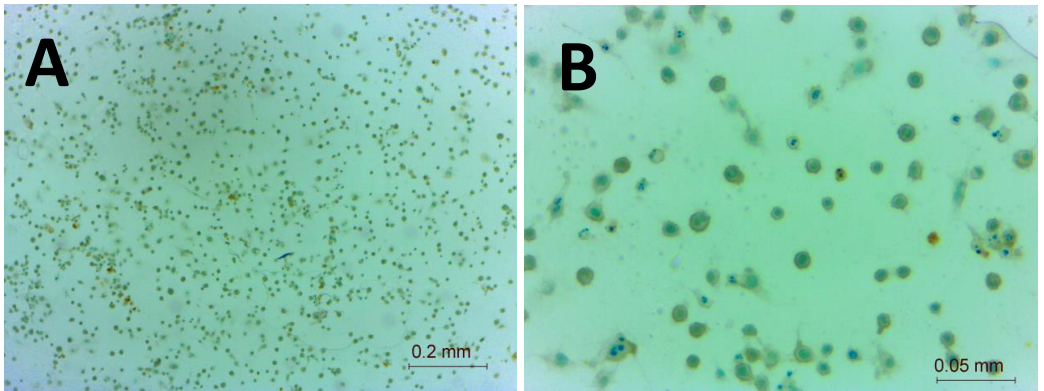
Grafik 4: İki Boyutlu Kültürde TUNEL İşaretleme Grafiği



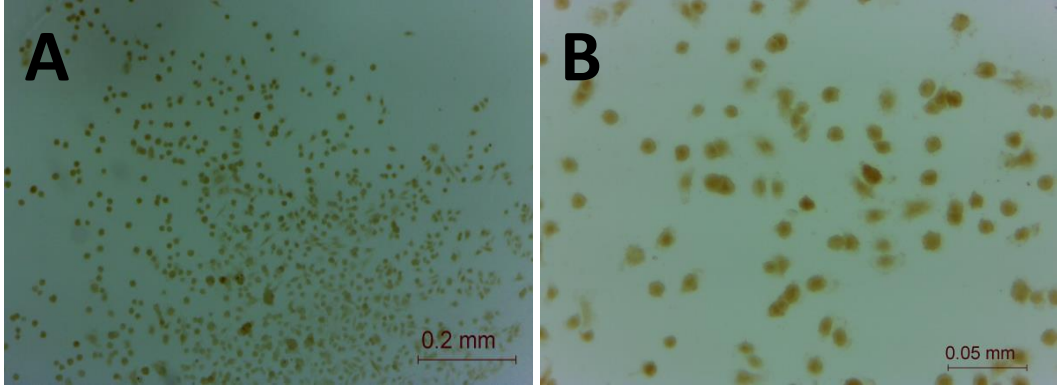
Resim 7: 24. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



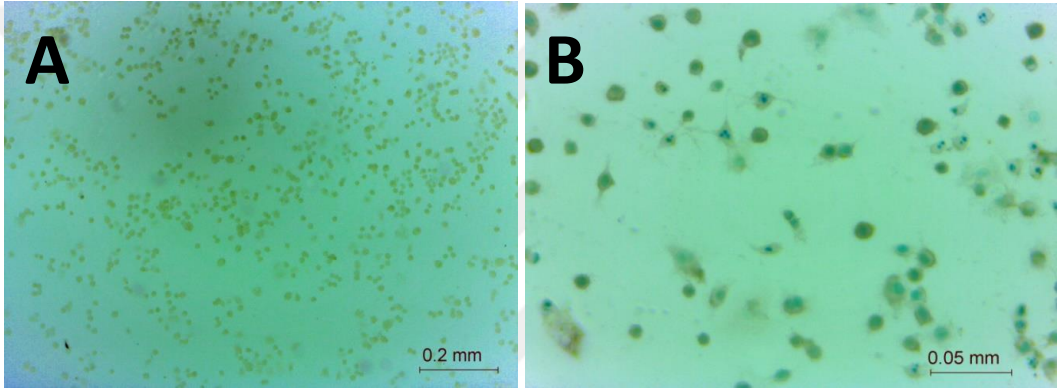
Resim 8: 24. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



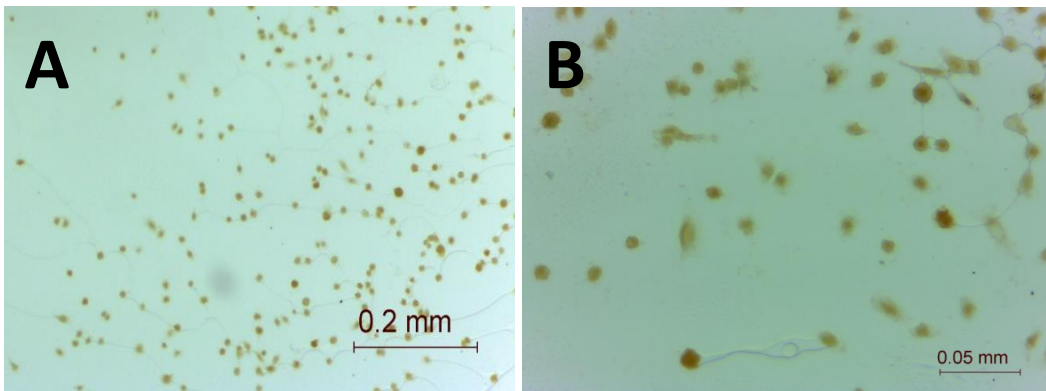
Resim 9: 48. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 10: 48. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 11: 72. Saat Kontrol Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

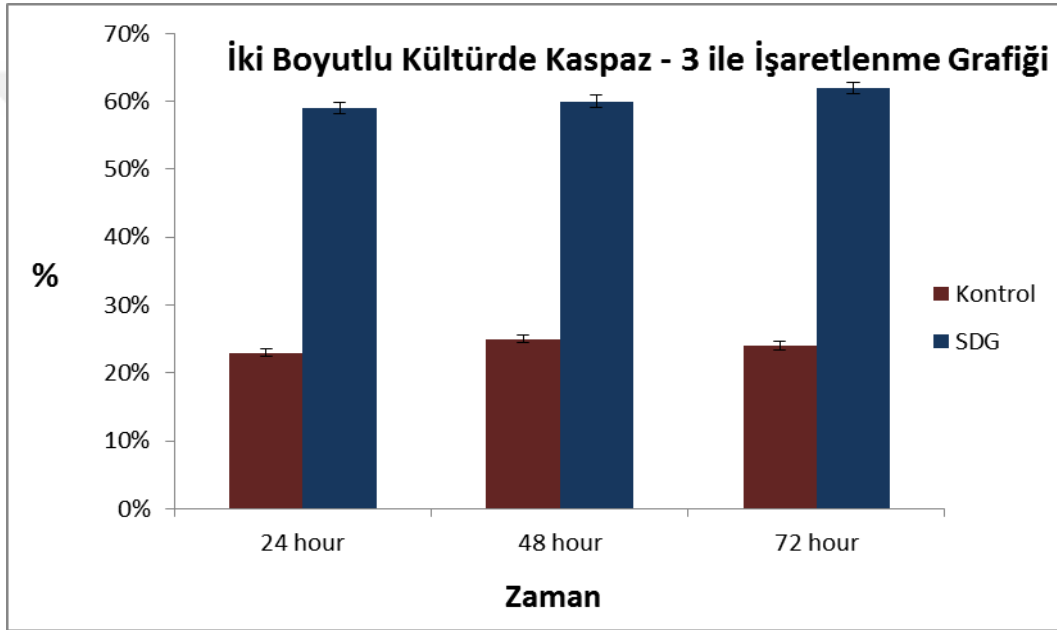


Resim 12: 72. Saat SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

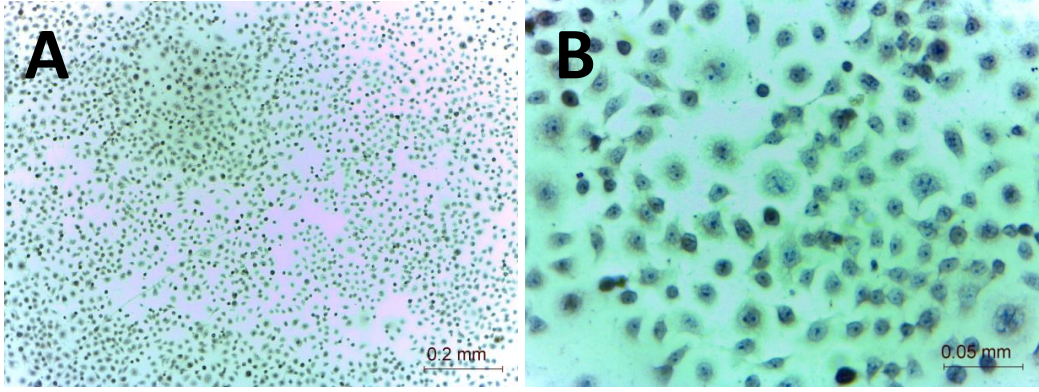
4.5. İki Boyutlu Kültürlerde Kaspaz – 3 İşaretleme Bulguları

24 kuyucuklu planelere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan kaspaz-3 işaretleme; her bir saat için (24., 48., 72.) ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde çok az sayıda apoptotik hücre gözlemlendi (Resim 13, 15, 18).

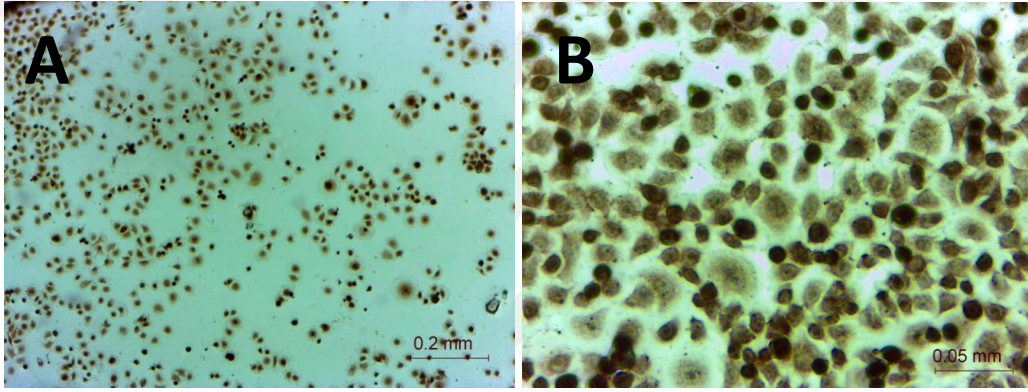
24. – 48.- 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda apoptotik hücre gözlemlendi ($p < 0.05$), (Grafik 5), (Resim 14, 16, 18).



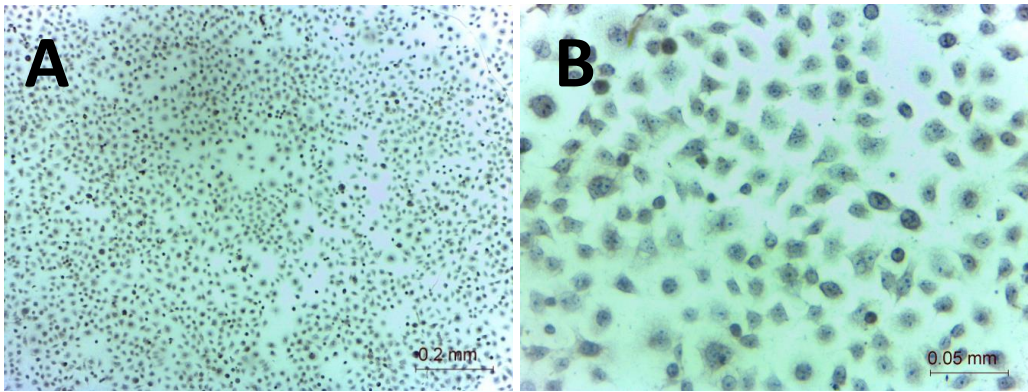
Grafik 5: İki Boyutlu Kültürde Kaspaz-3 İşaretleme Grafiği



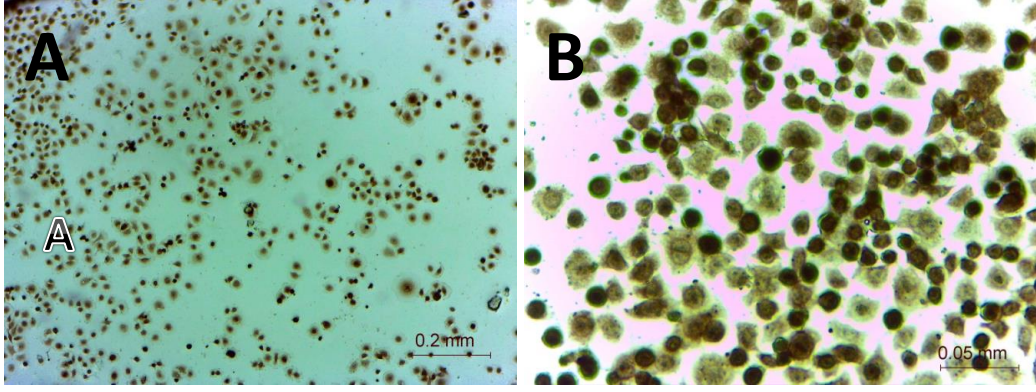
Resim 13: 24. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



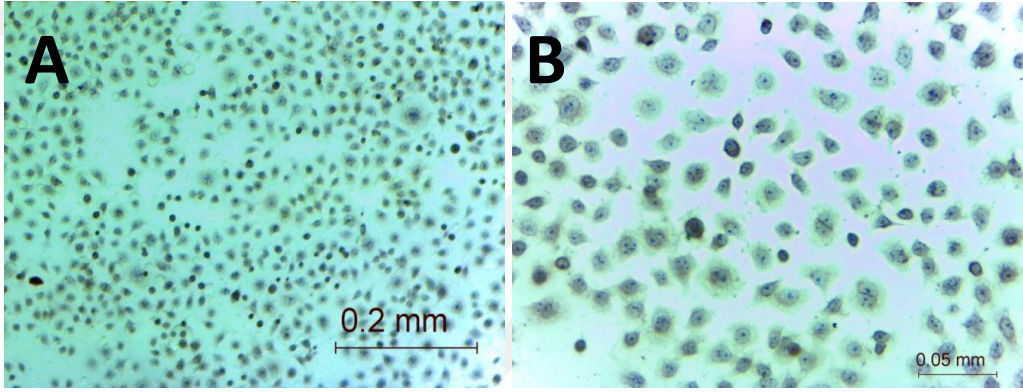
Resim 14: 24. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



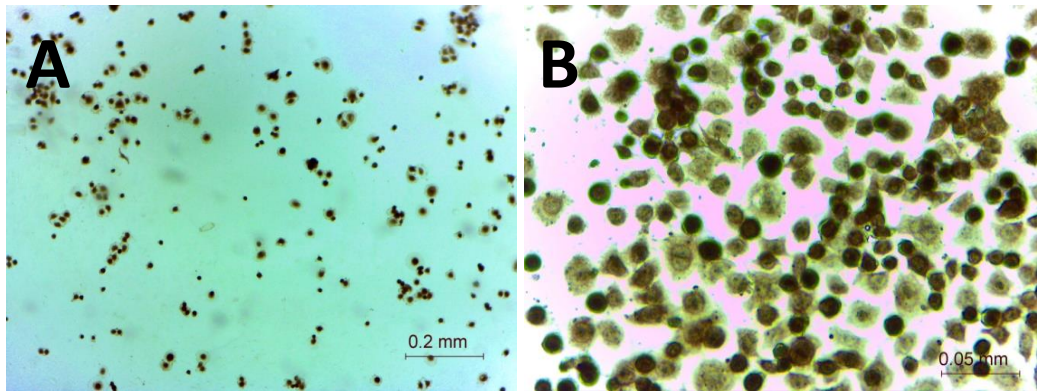
Resim 15: 48. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 16: 48. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 17: 72. Saat Kontrol Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

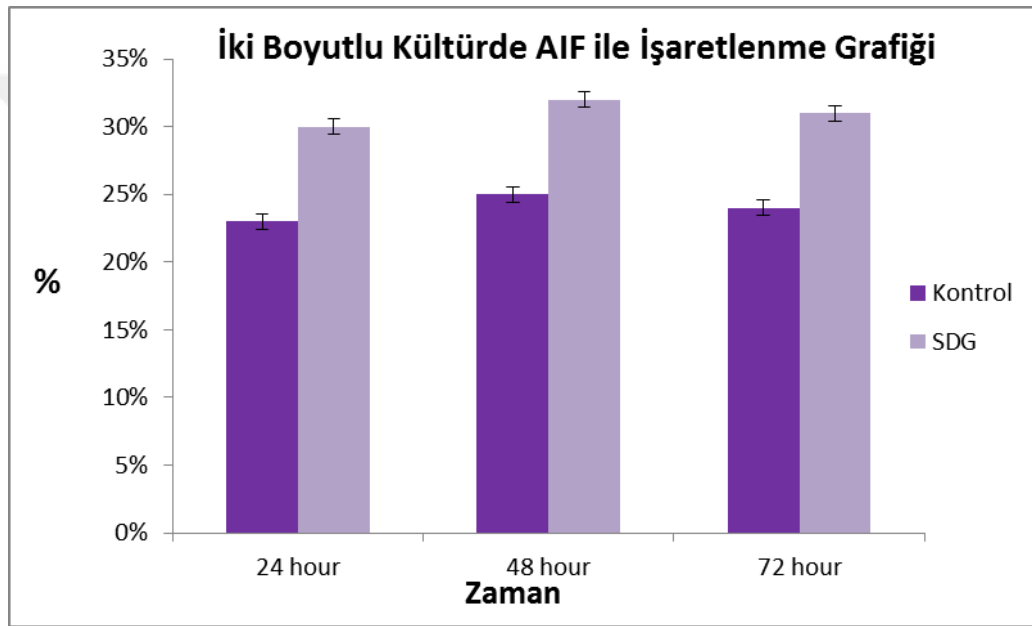


Resim 18: 72. Saat SDG Grubu; Kaspaz-3 İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

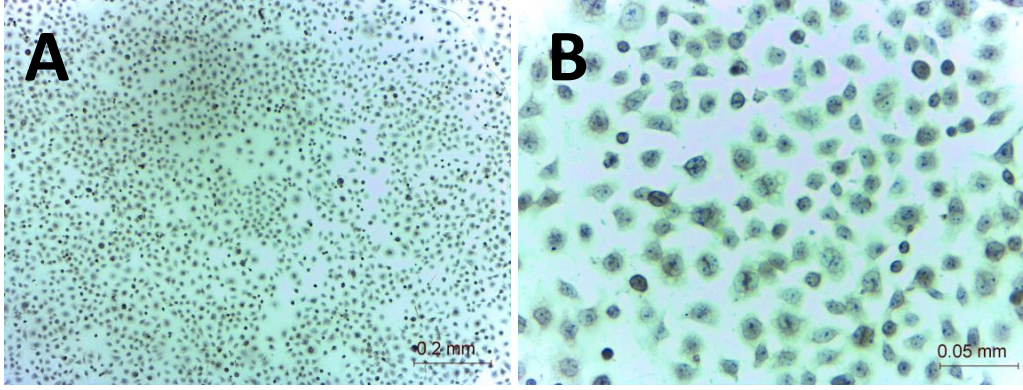
4.6. İki Boyutlu Kültürlerde AIF İşaretleme Bulguları

24 kuyucuklu platalere yuvarlak lameller üzerine ekilen 100.000 SW 480 hücresiyle yapılan AIF işaretleme; her bir saat için (24., 48., 72.) ayrı ayrı kontrol ve deney grupları şeklinde belirlendi. Kontrol grubunda tüm saatlerde çok az sayıda apoptotik hücre (AIF ile pozitif boyanan hücre) gözlemlenirken (Resim 19, 21, 23).

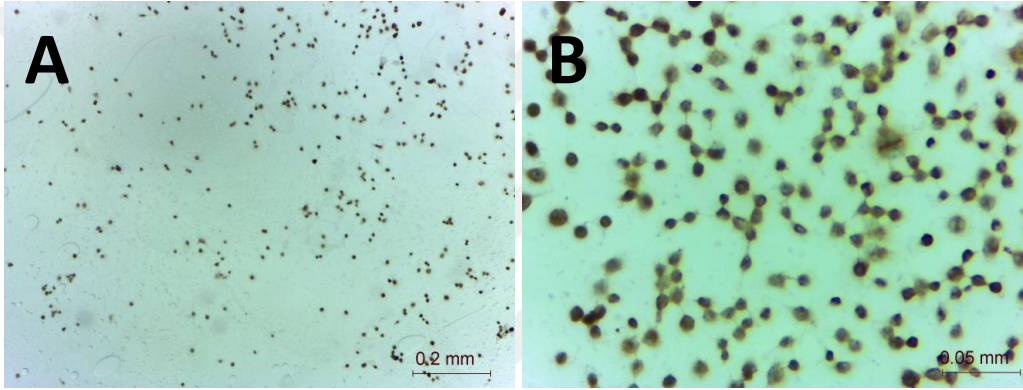
24. – 48.- 72. saatleri için SDG verilen gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla fazla sayıda apoptotik hücre gözlemlendi ($p < 0.05$), (Grafik 6), (Resim 20, 22, 24).



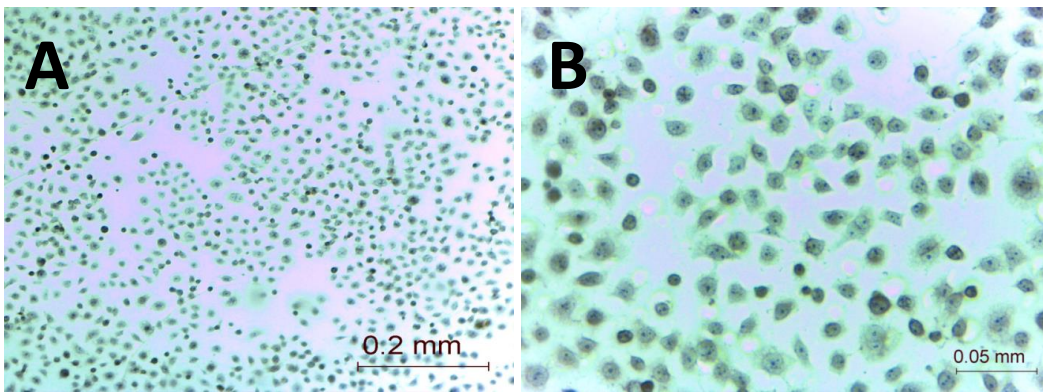
Grafik 6: İki Boyutlu Kültürde AIF İşaretleme Grafiği



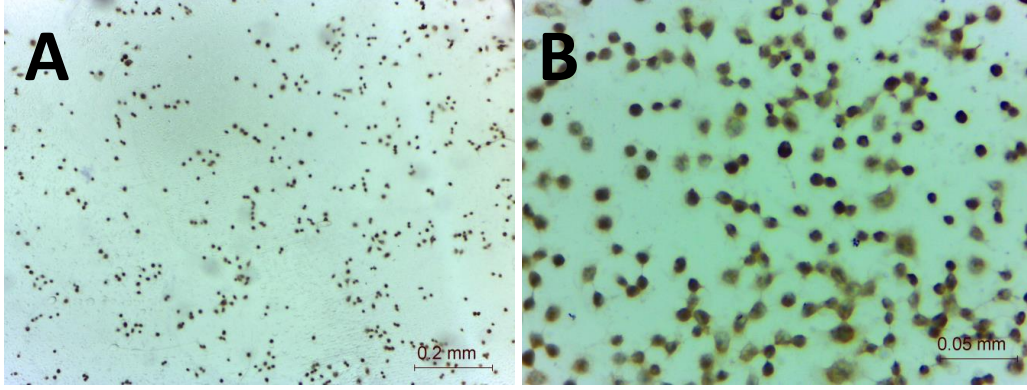
Resim 19: 24. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



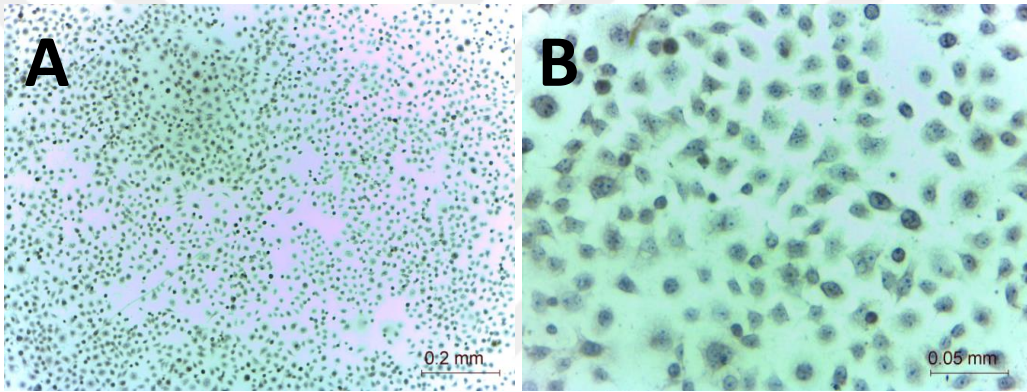
Resim 20: 24. Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



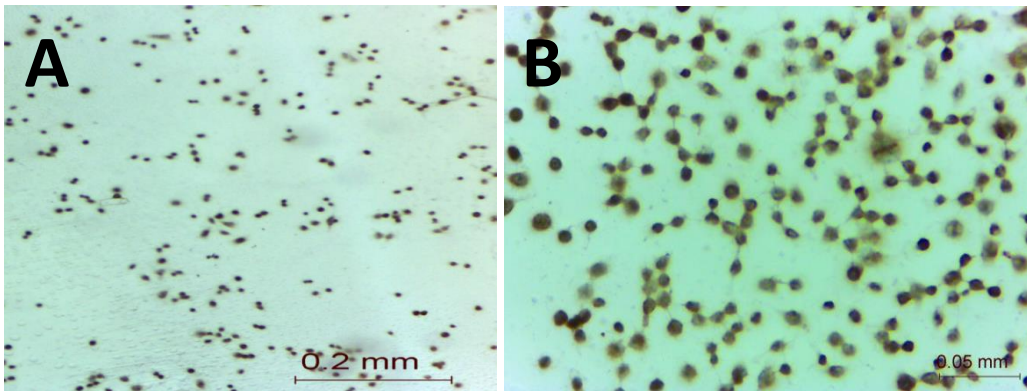
Resim 21: 48. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



Resim 22: 48. Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



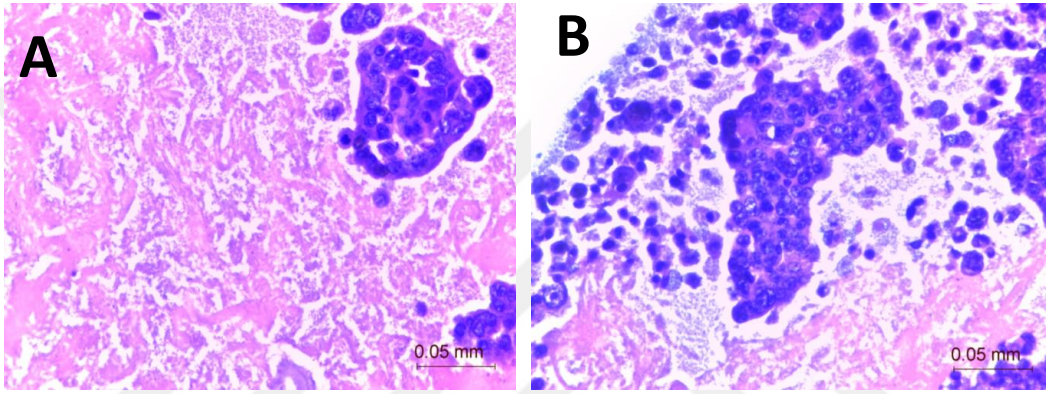
Resim 23: 72. Saat Kontrol Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)



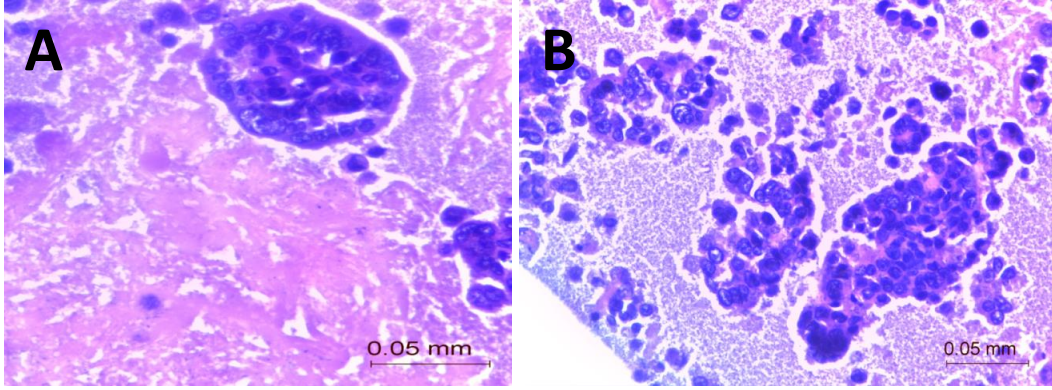
Resim 24: 72 Saat SDG Grubu; AIF İle İşaretlenen Hücreler (A,20x büyütme - B, 40x büyütme)

4.7. Üç Boyutlu Sferoid Kültürlerde Hematokksilen Eozin Boyanma Bulguları

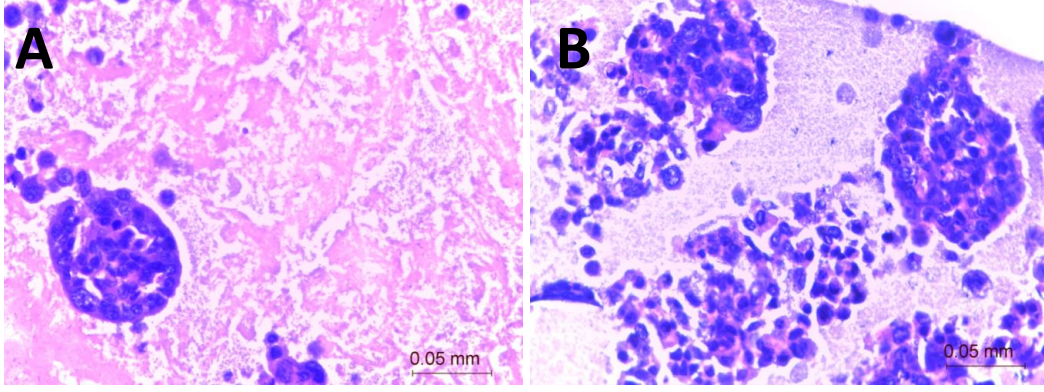
6 kuyucuklu platelerde kontrol ve deney grubu olarak, üç farklı saate göre ayrı ayrı sferoid oluşumu için 15 gün beklendikten sonra oluşan sferoidler ışık mikroskopunda gözlemlendi. Tüm saatlere ait kontrol grubu sferoidleri oldukça düzgün görünümde izlenirken (Resim 25 A, 26 A, 27 A), SDG verilen deney gruplarında ise yapıca düzgün olan sferoidlerin yanı sıra; dağınık, parçalar halinde görünen, sınırları bozulmuş sferoidler de bulunmaktaydı (Resim 25 B, 26 B, 27 B).



Resim 25: 24. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, H-E, 40x büyütme)



Resim 26: 48. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, H-E, 40x büyütme)

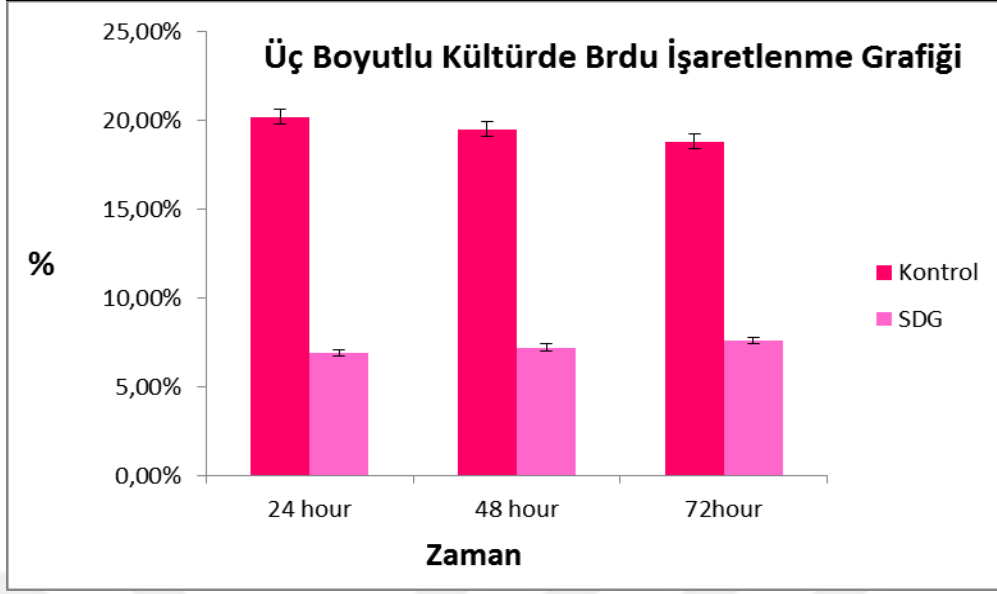


Resim 27: 72. Saat Kontrol ve SDG Gruplarına Ait Sferoid Yapıları (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, H-E, 40x büyütme)

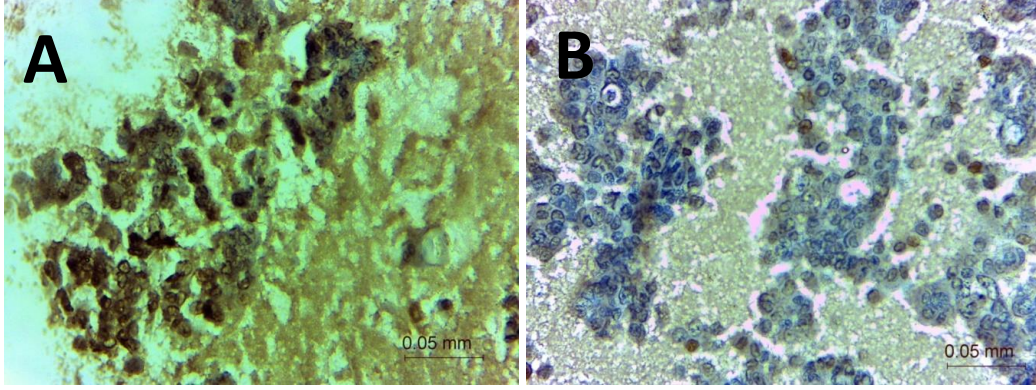
4.8. Üç Boyutlu Kültürlerde 5-Bromo-2-Deoksiuridin (BrdU) İşaretleme Bulguları

Üç boyutlu sferoid kültürde yapılan BrdU işaretleme indeksi değerlendirmelerine göre; kontrol grubu sferoidlerinin, perifer kısmında orta kısma kıyasla çok fazla hücre BrdU ile işaretlenmiş ve işaretlenme değerlendirmesinin iki boyutlu kültür ortamındaki BrdU işaretlemeyle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Resim 28 A, 29 A, 30 A).

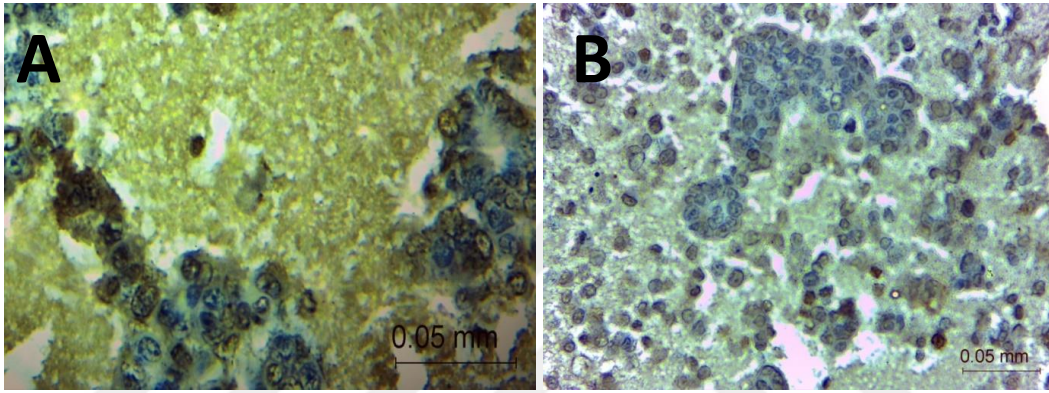
24. – 48. – 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise yine iki boyutlu ortamdaki hücrelerle uyumlu olarak çok az sayıda hücre BrdU ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Grafik 7), (Resim 28 B, 29 B, 30 B).



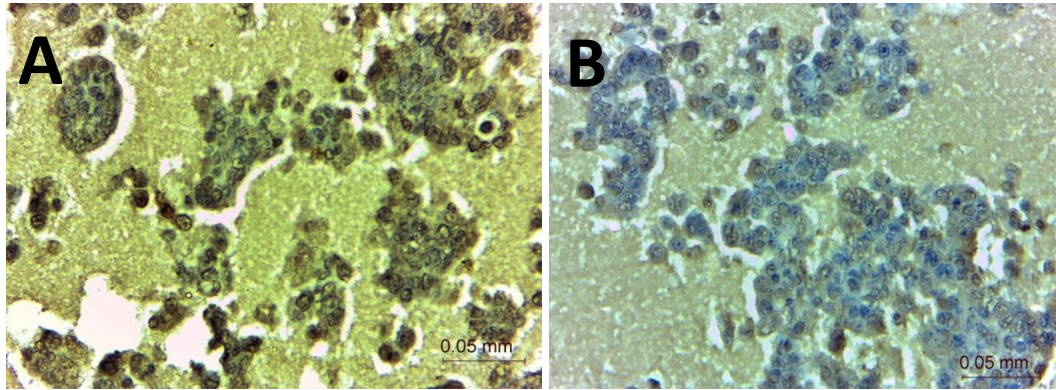
Grafik 7: Üç Boyutlu Kültürde BrdU İle İşaretleme Grafiği



Resim 28: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)



Resim 29: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

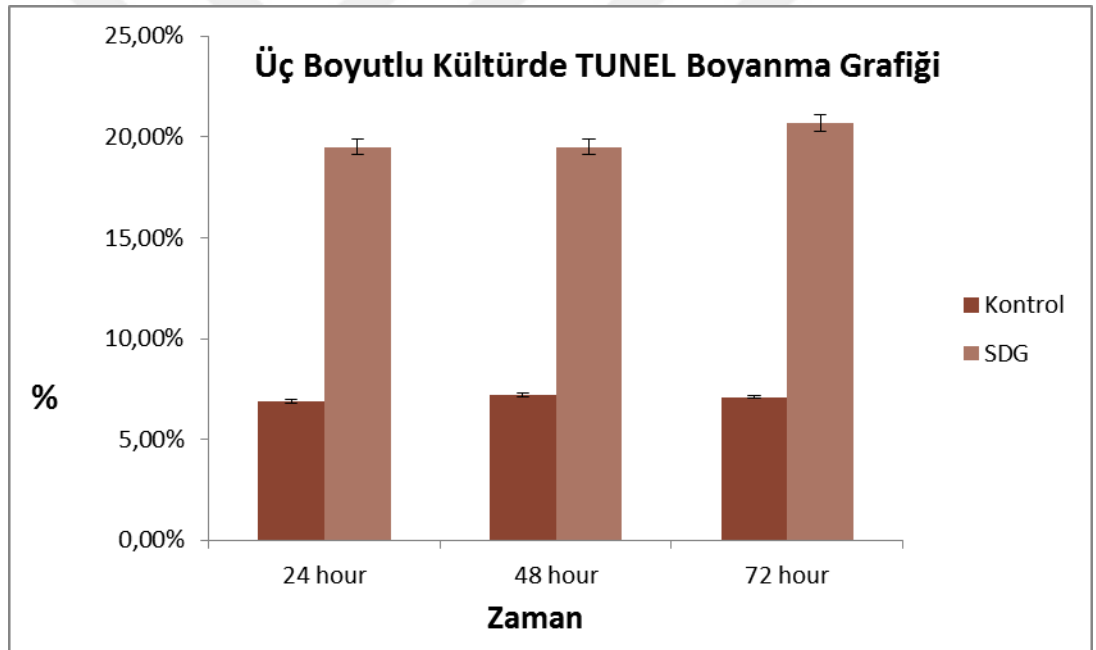


Resim 30: 72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; BrdU İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

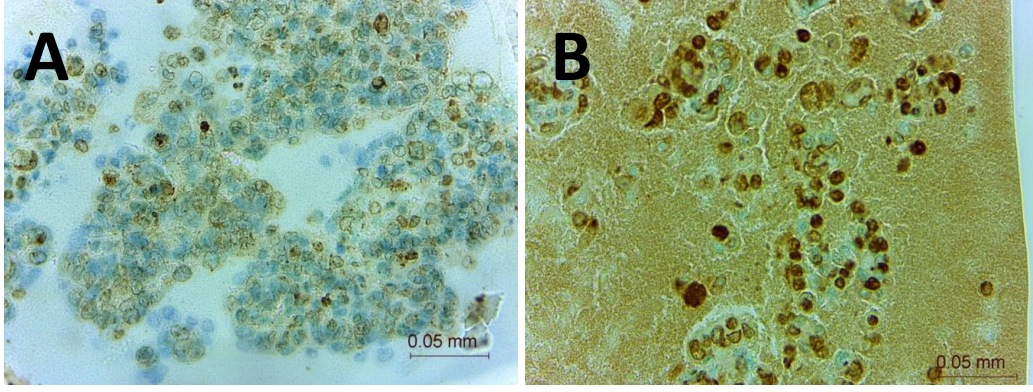
4.9. Üç Boyutlu Kültürde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End Labeling) Bulguları

Üç boyutlu sferoid model kültürde, iki boyutlu kültür ortamındaki sonuçlarımıza uyumlu olarak; kontrol grubunda çok az sayıda hücre TUNEL ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Resim 31 A, 32 A, 33 A). Üç boyutlu sferoid kültürde yapılan TUNEL işaretleme değerlendirmelerine göre; sferoidlerinin perifer kısmında orta kısma kıyasla çok fazla hücre TUNEL ile işaretlenmiştir.

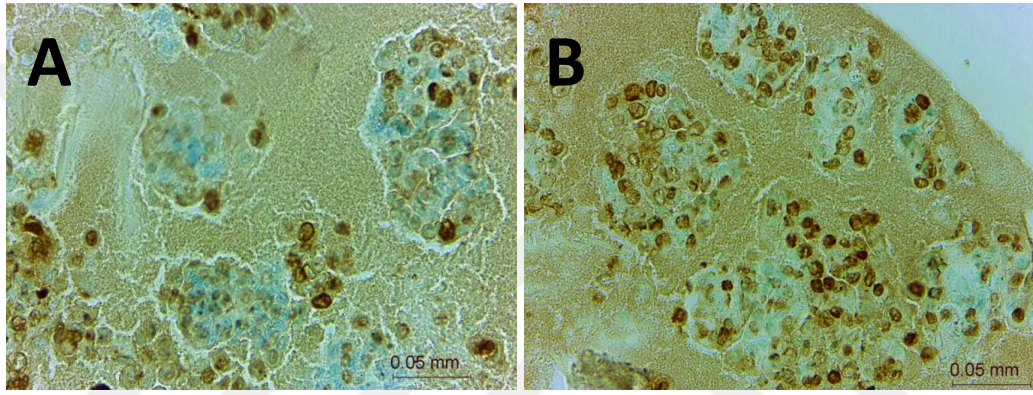
24. – 48. – 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise yine iki boyutlu ortamdaki hücrelerle uyumlu olarak çok fazla sayıda hücre TUNEL ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Grafik 8) (Resim 31 B, 32 B, 33 B).



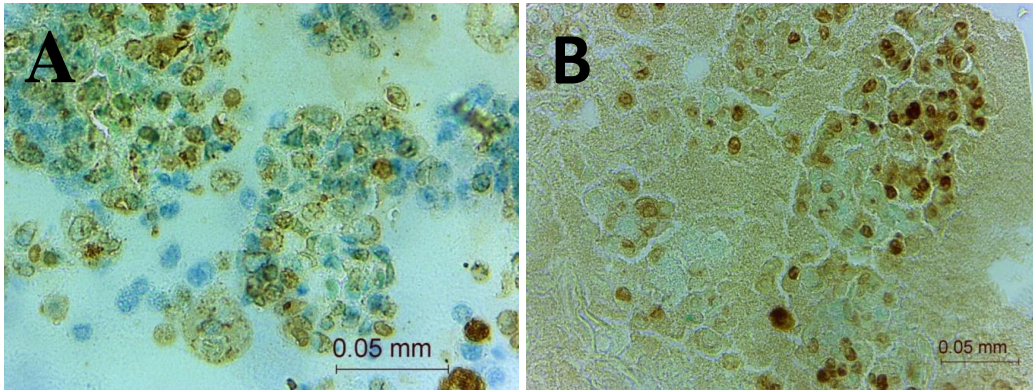
Grafik 8: Üç Boyutlu Kültürde TUNEL İle İşaretleme Grafiği



Resim 31: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)



Resim 32: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

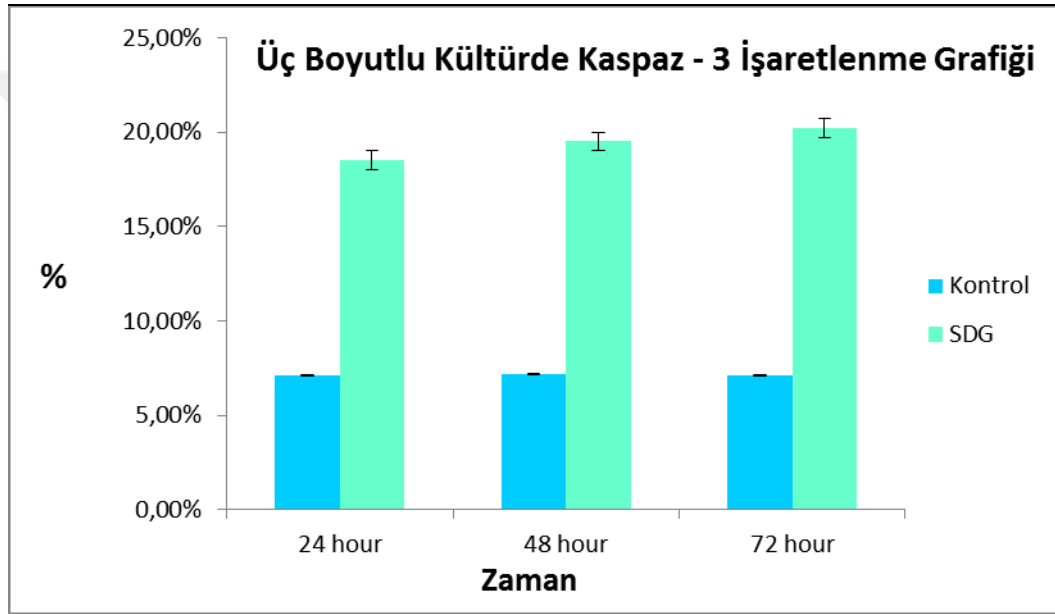


Resim 33: 72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; TUNEL İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

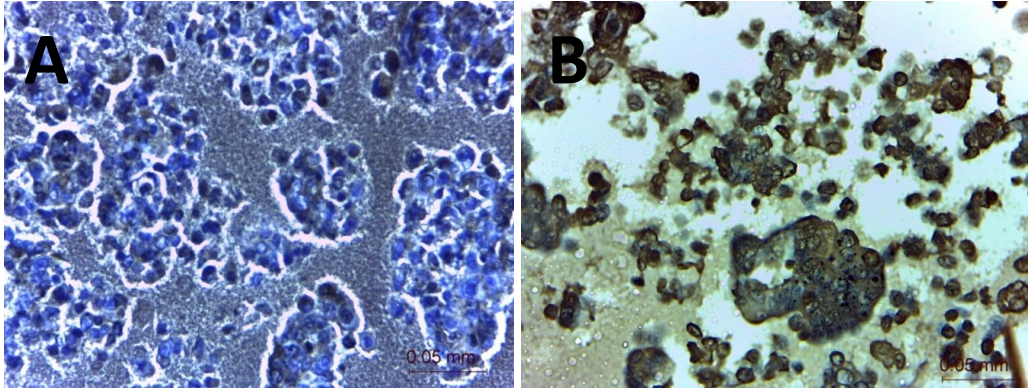
4.10. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz -3 İşaretleme Bulguları

Üç boyutlu sferoid model kültürde, iki boyutlu kültür ortamındaki sonuçlarımıza uyumlu olarak; kontrol grubunda çok az sayıda hücre kaspaz-3 ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Resim 34 A, 35 A, 36 A).

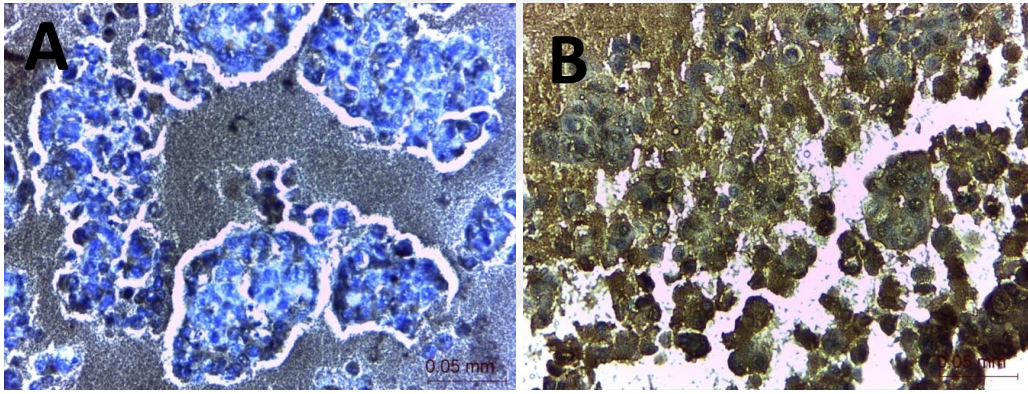
24. – 48. – 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise yine iki boyutlu ortamdaki hücrelerle uyumlu olarak çok fazla sayıda hücre kaspaz-3 ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Grafik 9) (Resim 34 B, 35 B,36 B).



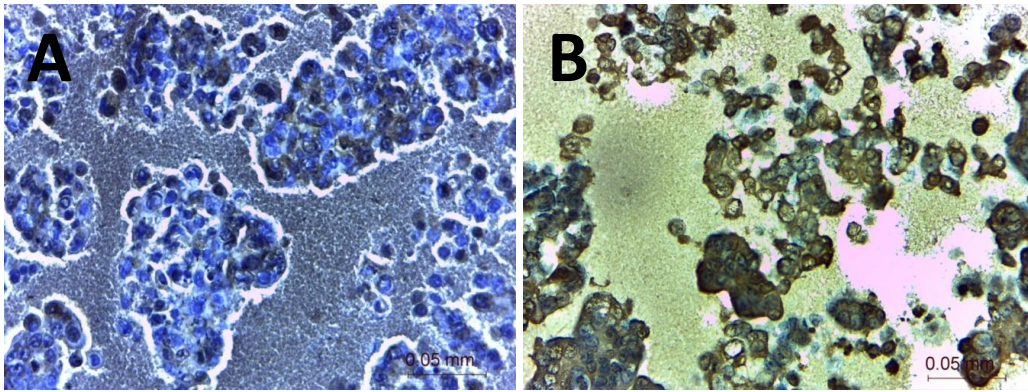
Grafik 9: Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz - 3 İle İşaretleme Grafiği



Resim 34: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)



Resim 35: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

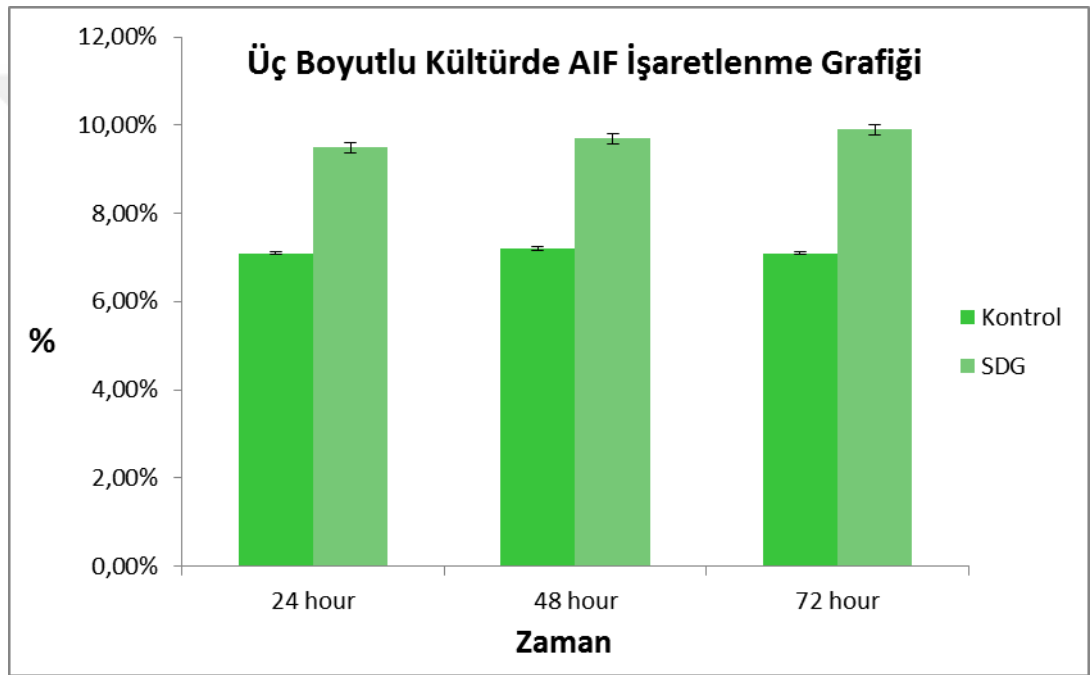


Resim 36: 72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; Kaspaz -3 İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

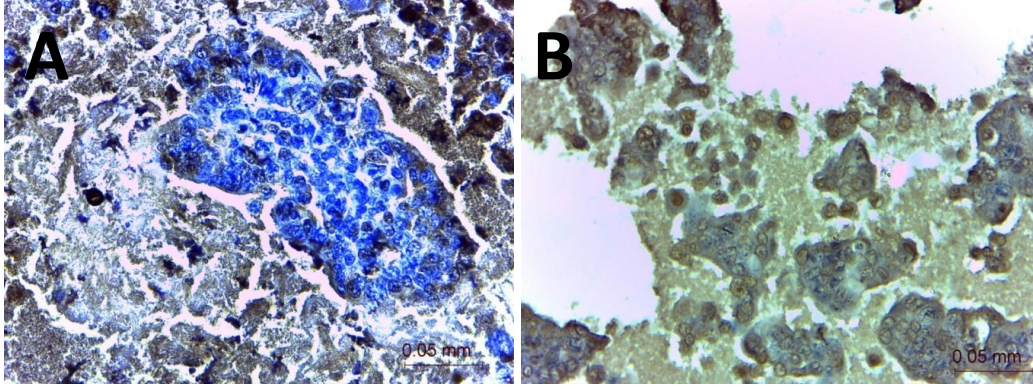
4.11. Üç Boyutlu Kültürde AIF İşaretleme Bulguları

Üç boyutlu sferoid model kültürde, iki boyutlu kültür ortamındaki sonuçlarımıza uyumlu olarak; kontrol grubunda çok az sayıda hücre AIF ile işaretlemiştir ($p < 0.05$), (Resim 37 A, 38 A, 39 A).

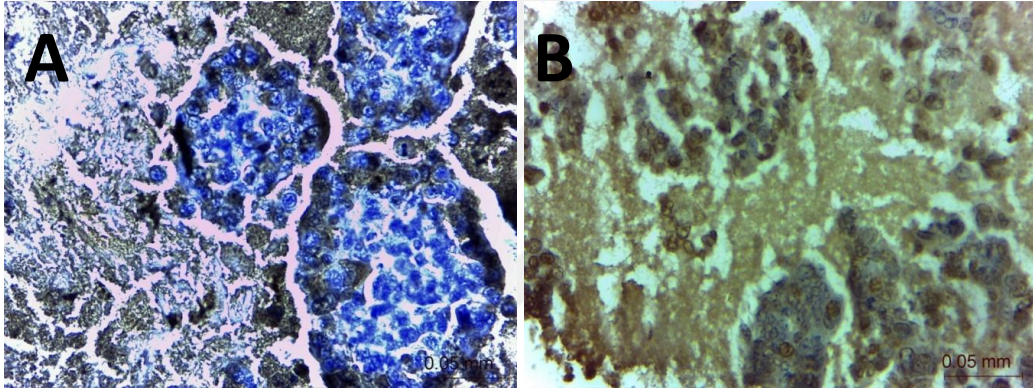
24. – 48. – 72. saatleri için verilen SDG gruplarında ise yine iki boyutlu ortamdaki hücrelerle uyumlu olarak kontrol grubuna kıyasla biraz daha fazla sayıda hücre AIF ile işaretlemiştir. Ancak bu boyanma kazpaz-3 teki kadar yoğun değildi. ($p < 0.05$), (Grafik 10) (Resim 37 B, 38 B, 39 B).



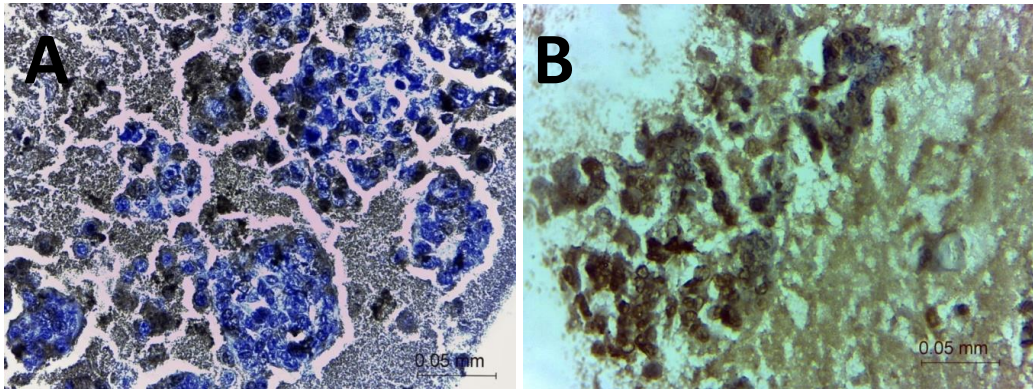
Grafik 10: Üç Boyutlu Kültürde AIF İle İşaretleme Grafiği



Resim 37: 24. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)



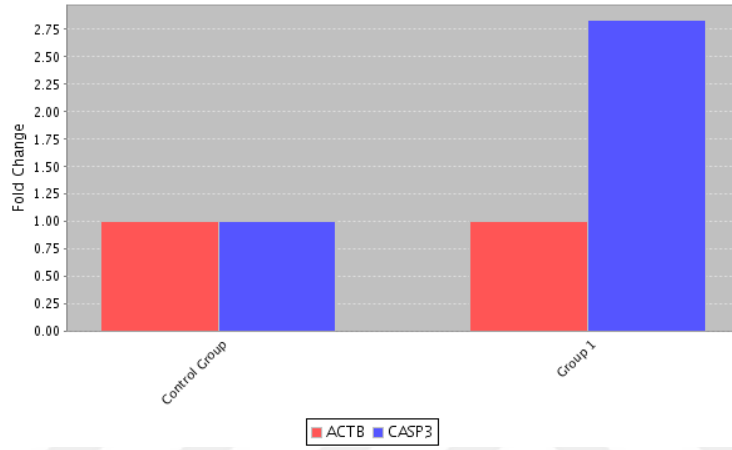
Resim 38: 48. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)



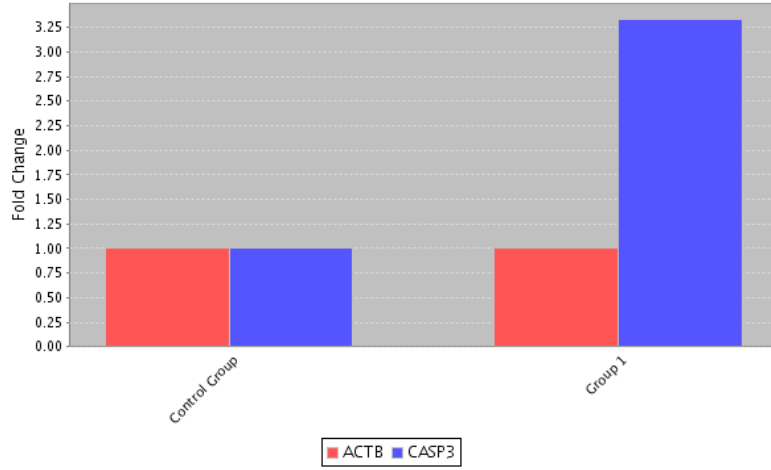
Resim 39: 72. Saat Kontrol ve SDG Grubu; AIF İle İşaretlenmiş Sferoidler, (A: Kontrol Grubu, B: SDG Grubu, 40x büyütme)

4.12. Gen Ekspresyon Tayini Bulguları

İki boyutlu kültürde gen ekspresyon tayini bulgularımıza göre 24. saatte kaspaz-3 gen ekspresyonunun oldukça arttığı görülmüştür (Grafik 11). Yine 3 boyutlu kültür ortamında da monolayer verilerine uygun olarak 24. saatte kaspaz-3 gen ekspresyonu artmıştır (Grafik 12).



Grafik 11: İki Boyutlu Kültürde 24. Saat Kontrol Grubu İle SDG Grubunun Kaspaz- 3 Gen Ekspresyonu



Grafik 12: Üç Boyutlu Kültürde 24. Saat Kontrol Grubu İle SDG Grubunun Kaspaz- 3 Gen Ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Kolon kanseri gastrointestinal sistemde meydana gelen, kanserin neden olduğu ölümlerde akciğer kanserinden sonra gelen ve etiyojisi hala net olarak anlaşılabilen kompleks bir kanser türüdür. Kötü beslenme, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara kullanımı gibi farklı çevresel etkenlerle tetiklendiği düşünülmektedir. Beslenme şekliyle yakından alakalı bulunan kolon kanserinin özellikle yağlı besinler tüketme ve tüketim miktarının fazlalığıyla paralel oranda arttığı bilinmektedir. Risk faktörü olarak bunların yanı sıra genetik etmenler de rol oynamaktadır (72, 73).

Sindirim sisteminde meydana gelen rahatsızlıkların daha çok beslenme şekillerinden kaynaklandığı bilinmekte ve sağlıklı, doğal beslenme ile bu problemlerden uzaklaşılacağı düşünülmektedir. Doğal beslenme anlamında da polifenoller olarak bilinen bitkilerde bulunan, bağırsak inflamasyonunda koruyucu rol oynayan ve renklemede görevli olan antioksidan özellikteki fenol grubu besinler ve lignan olarak bilinen bitkilerde bulunan fitoöstrojen içeren besinler tercih edilmelidir (36).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki, vejeteryan beslenme şekline sahip olan ve lignan içeren bitki yetiştiriciliği bakımından zengin olan ülkelerde yaşayan insanların kansere yakalanma riskleri daha azdır. Bu da lignanların birçok faydası olduğu düşüncesine özellikle kanser önleyici olduğu konusuna insanları daha da yakınlaştırmıştır (48, 74).

Son yıllarda lignanların önem kazanmasıyla yapılan çalışmaların sayısı da artmış ve yeni lignanlar bulunmuştur. Uzun yıllar boyunca, lignanlar arasında en çok üzerinde durulanları memeli lignanları olan EDL (Entereodiol) ve ENL (Enterolaktan)'ye dönüşen; matairesinol ve sekoisolarikiresinoldü. Ancak yeni yapılan çalışmalar ile memeli lignanlarına dönüşecek farklı öncüllerin de olduğu görülmüştür. Matairesinol ve sekoisolarikiresinole ek olarak; syringaresinol, larikiresinol ve özellikle pinoresinol, eklenmiş ve memeli lignan öncülleri oldukları bulunmuştur. Bunun yanı sıra artijenin ve 7-hidroksimatairesinolün de EDL ve ENL'ye dönüştüğü bilinmektedir. Çavdar ekmeğiyle yapılan çalışmada pinoresinol, larikiresinol ve syringaresinol miktarlarının sekoisolarikiresinol ve matairesinol miktarına kıyasla 10-50 kat fazla olduğu bulunmuştur (58, 75).

Keten tohumu ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda; yüksek miktarlarda keten tohumu tüketen bireylerin idrar ve plazma örneklerinde, entereolignan dönüşümünü kanıtlayan yüksek miktarlarda ENL ve EDL bulunmuştur. ENL ve EDL, lignan tüketiminin 8-10 saat sürecinden sonra kan dolaşımında gözlemlenmekte, fakat buna zıt olarak diğer bazı lignanlar örneğin; pinorezinol genelde tüketimden 1 saat sonra plazma ve idrarda gözlemlenmektedir. Bu durum, bitki lignanlarının insan vücudunda hızlı bir şekilde emildiğini ve kullanıldığını kanıtlamaktadır. Bu çalışmalara rağmen hala, lignanların emilme oranlarındaki farklılık ve moleküler ölçümleri ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır (36).

Lignanların etki mekanizmaları ve kullandıkları yollar konusunda bilinmeyen birçok nokta olmasından dolayı yeni çalışmalar daha çok bu yönde ilerlemektedir (56). Bitkilerden izole edilen lignanlarla yapılan bir çalışmada da, lignanların bağırsak florasında metabolize edilerek NF-kB sinyal yolağı ile antiinflamatuvar etki gösterdiği gözlemlenmiştir (36). Lignanların antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve serbest radikallerden temizleyici işlevleri, sahip oldukları fitoöstrojenik özelliklerine dayandırılmaktadır (22–24). Fitoöstrojenlerle önceki yıllarda yapılan çalışmalarda letal fazda fitoöstrojenlerin estrodiole dönüşüm oranında ve uzunluğunda artma olduğu saptanmıştır. Bu durumun temel nedenleri lignanların sahip oldukları; östrojenik, anti östrojenik, anti tümörojenik ve antioksidan özelliklere dayandırılmıştır (48, 76). Epidemiyolojik çalışmalarda lignanların hormona bağlı; meme, prostat gibi birçok kanser türlerinde koruyucu etki gösterdikleri bulunmuştur (46, 77).

Keten tohumunun kanserden önleyici etkisinin, içerdiği linolenik asit ve liflerden ziyade lignan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Meme kanserli ratlar üzerinde, memeli lignanlarından ENL ile yapılan çalışmada; ENL' nin 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)- azaltarak kanser hücrelerinin büyümesini engellediği gözlemlenmiştir. Hem ENL, hem EDL ile yapılan *in vitro* çalışmalarda ise yine bu lignanların prostat kanseri ve meme kanseri hücrelerinde de büyümeyi engelleyici etki gösterdiği görülmüştür. ENL ve EDL majör memeli lignanları olmalarına ve kolonda üretilmelerine rağmen, kolondaki antikarsinojen etki mekanizmaları, sinyal yolları tam anlamıyla çözülememiştir (30, 76, 78). Biz de bu konudan yola çıkarak yaptığımız çalışmada SDG (Sekoiselarikiresinol

Diglukozid)'nin kolon kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik etkisini ve kullandığı yolağı görmeyi amaçladık.

Keten tohumundan elde edilen lignan ile ratlar üzerine yapılan çalışmalarda lignanlarla beslenen ratlarda tümör sayılarında önemli derecede azalma olduğu gözlemlenmiş ve dahası bu lignanların cinsiyet hormonları üzerinde ve menstrual döngünün uzunluğunda da etkili oldukları farkedilmiştir (48). %5' lik keten tohumuyla beslenen ratlarda SDG kaynaklı olarak ovaryum ağırlığında önemli ölçüde azalma ve puberte döneminde gecikme gözlemlenmiştir. Bu mekanizmanın nasıl olduğu ve keten tohumunun içerdiği lignanın ne şekilde etki göstererek bu sonuca sebep olduğu hala net olarak bilinmemektedir. Fakat bazı çalışmalar bu etkiyi lignanların östrojen reseptörüne doğrudan ya da dolaylı olarak bağlanmasıyla östrojen benzeri ya da antagonisti olarak aktivite göstermesine dayandırmaktadırlar (8). SDG' nin östrojen benzeri etkisi ile ovaryum gelişimini etkilediği, menopoz sonrası durumlarda östrojenik etki yaptığı, ovaryum ağırlığını etkilediği ve puberte dönemini ertelediği yapılan hayvan deneylerinde de gözlemlenmiştir (15). Menopoz sonrası dönemdeki sağlıklı bayanlar üzerinde 6 hafta boyunca günlük 500 mg SDG verilerek uygulanan bir çalışmada; endotelial fonksiyonlarında herhangi bir etki görülmemiş ve bu durum doz düşüklüğüne dayandırılmıştır. Fakat prostat hiperplazili hastalarda günlük 600 mg SDG uygulamasında üriner sistem hastalıklarına ait belirtilerde ve hasta şikâyetlerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir (15). Menopozdaki kadınlarla yapılan çalışmada keten tohumunun placebo etkisinin araştırılmasında günlük 46 mg keten tohumu ile beslenmede bayanlardaki sıcak basması gibi durumların azalmasının tamamen psikolojik olduğu kanıtlanmıştır. Bunun dışında bayanlarda polikistik over durumunda ise gözle görülür ölçüde koruyucu olduğu, osteoporozu azalttığı ve kanserden koruyucu rol oynadığı kanıtlanan keten tohumunun erkeklerde ise; testosteron dolaşımını azaltabileceği görülmüştür (24). Kardiyovasküler sistem hastalıklarının artmasına davetiye çıkaran ve östrojen dolaşımının azalmasından kaynaklanan menopoz durumunda keten tohumunun iyileştirici etkisi birçok çalışmayla gösterilmiştir. Keten tohumunda kardiyovasküler hastalıklarda iyileştirici rol oynaması içerdiği yüksek orandaki ALA miktarlarına dayandırılmıştır (24). Akciğer kanseri üzerine yapılan çalışmalarda ise lignan ile beslenen ratlarda kanser hücreleri azalmıştır. Bir

diğer çalışmada mesane kanseri üzerine keten tohumuyla beslenen ratlarda kanserin metastaz yapmadığı ve çoğalmasının önlendiği gözlemlenmiştir (48). Parasetomal ile yapılan hayvan deneyinde ise SDG 'nin karaciğer ve böbrek toksisitesinde önemli ölçüde koruyucu olduğu belirtilmiştir (79). Çalışmamızda ise SDG' nin kolon kanseri üzerinde koruyucu etkisini birçok çalışmadan farklı olarak iki boyutlu ve üç boyutlu kültür ortamında gözlemlenmiş bulunmaktayız.

Ratlar üzerinde; SDG metabolitleriyle, ENL ve EDL ile gerek ayrı gerekse beraber denenen çalışmalar mevcuttur. SDG metabolitleriyle yapılan bir çalışmada EDL ve ENL'nin hücre döngüsünün S fazını etkileyerek, çoğalmayı engelledikleri, kanser hücrelerini azalttıkları ve apoptozise neden oldukları görülmüştür (46). Bir diğer hayvan çalışmasında, C57BL/6 farelerinin günlük 73 - 293 µmol/kg SDG beslenmeleriyle melonam hücrelerinin metastazında azalma olduğu bulunmuştur. SDG'nin anlamlı derecede kandaki üre ve kreatini, bilirubin seviyesini, AST, ALT, ALP seviyelerini arttırdığı, bunun yanı sıra karaciğer toksisitesini de azalttığı çalışmalarla tespit edilmiştir (72). Biz ise çalışmamızda kolon kanseri hücre hattı üzerinde SDG'yi kullanarak, hücrelerin çoğalma hızına etkisini birçok çalışmadan farklı olarak iki- üç boyutlu kültür ortamında kanıtladık.

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda keten tohumu tüketimi ardından hem kanda hem idrarda EDL miktarı arttığı gözlemlenmiştir. Memeli lignanları olan EDL ve ENL ne kadar faydalı olduğuna ilişkin birçok çalışma mevcuttur ve EDL'e kıyasla ENL'nin daha etkili olduğu bilinmektedir. Örneğin ENL'nin aramataz enzimini daha fazla inhibe ettiği, özellikle kanser hücrelerinin büyümesinde ve proliferasyonunda daha fazla kontrol etkisine sahip olduğu düşünülmektedir (48). Keten tohumu tüketiminin menopoz sonrası EDL miktarını, menopoz öncesi ENL miktarını arttırdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (35). Bu farklılığın menopozdan bağımsız olarak sadece dönüşümde rol alan bakterilerden kaynaklandığı düşünülse de bunu kanıtlayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. SDG; kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellediği gibi ENL ve EDL'ye kıyasla birçok farklı metabolik özelliklere sahiptir. EDL ve ENL'nin kanserden koruyucu oldukları bilinmelerine rağmen, tek başına SDG uygulanarak yapılmış çok fazla çalışma yoktur (35, 80). Çalışmamızda ise tek başına SDG kullanarak, kolon kanseri hücrelerindeki büyüme ve çoğalma üzerine etkisini görmeyi planladık.

Lignanların kanserden önleyici etkilerinin bulunmasının yanı sıra, son dönemdeki çalışmalarda; lignanların ve keten tohumu yağının tümör büyümesini azalttığı da belirtilmiştir (14, 32). Bazı çalışmalar SDG' nin bu etkisini; lipid, glikoz seviyelerini, kan basıncını, oksidatif stresi ve inflamasyonu düşürmesine dayandırmaktadır. SDG' nin 5 α - redüktazı indirme etkisiyle mesane problemlerini ve prostatik hiperplazili hastalarındaki semptomları azalttığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. SDG' nin antioksidan özelliği ile oksidatif stresi azaltma özelliği bakımından inflamasyonlarda ve kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (58). Kardiyovasküler hastalık riski taşıyan bireylerde SDG' nin pozitif etkisinin gözlemlenmesi için 8 hafta boyunca günlük en az 500 mg SDG tüketimi gerektiği savunulmaktadır (25). Bunun yanısıra birçok çalışmada hala keten tohumunun tüketimi konusunda net bir sonuca ulaşamamıştır (33).

Yıllarca süregelen çalışmalar sonucunda lignanların kanserde önleyici etkileri, sahip oldukları antioksidan özellikleri ve serbest radikalleri temizleme işlevlerine dayandırılmaktadır. ENL ile yapılan çalışmalarda, hücre büyümesini döngünün faz II detoksifikasyonda enzim aktivitesini azaltarak kanserden önlediği ve kanserin çoğalmasını ve metastazını engellediği, hücre göçünü baskıladığı, apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (64, 80). Çalışmamızda keten tohumundan izole edilen en büyük lignan kaynağı olan SDG 'nin apoptozisi tetiklediğini (SDG uygulanan grupta TUNEL, Kazpaz-3 ve AIF pozitif hücrelerin sayısında artış görülmüştür) ve hücre proliferasyonunu azalttığını (yine deney grubunda BrdU ile boyanan hücrelerin sayısının azaldığı gözlenmiştir), birçok çalışmadan farklı olarak kullandığımız immünohistokimyasal yöntemlerle; gerek iki boyutlu gerekse üç boyutlu sferoid modeller üzerinde gösterdik.

Kolon kanseri epidemiyolojisine ilişkin yapılan çalışmalarda n-6 çoklu doymamış yağ asiti (PUFA) ile beslenmenin kolon kanseri riskini arttırdığı, buna karşılık zengin n-3 PUFA ile beslenmenin kolon kanseri olma ihtimalini azalttığı belirtilmiştir. n-6 PUFAs kolon karsinoma hücrelerinin büyümesini ve metastazını sağlarken, n-3 PUFAs eikosapentaenoik asit ve dokosaheksaenoik asit ise anlamlı derecede azaltma etkisi göstermişlerdir (46). Kolon kanserinde yapılan çoğu çalışmada ENL ve EDL' nin hücre büyümesini, hücre döngüsünü durdurarak azalttığı ve apoptozise yol açtığı gözlemlenmiştir (81). 1996 yılında Jenap ve

arkadaşları, keten tohumunun kolon kanserinde glukuronidaz aktivitesini azaltarak etkili olduğunu ve bu etkide yağı alınmış ve alınmamış keten tohumları arasında bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir (82). Daha önce yapılan çalışmalarda SW 480 hücre hattının sahip olduğu özel genetik mutasyondan dolayı, fitokimyasal flavonlara karşı çok hassas olduğu bilinmektedir (35, 83). SW 480 kolon kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda, günlük alınan SDG' nin metabolize edilmesinden kaynaklanan farklı etkilerin gözlemlenebileceği düşünülmektedir. SW 480 kolon kanseri hücre hatlarına 0 - 200 µmol/L dozlarında ve 24. – 48. – 72. saatlerinde SDG uygulanarak, sonucunda kanser hücre hatlarında azalma görülmüş ve bu azalmanın SDG metabolitleri olan ENLve EDL aracılığıyla olduğu kanıtlanmıştır. Fakat hücre canlılığında uygulamadan sonra herhangi bir değişim olmadığı için hücre sayısındaki azalmanın toksisiteden kaynaklanmadığı düşünülmüştür. *İn vitro* çalışmaların genelinde doz aralığı en fazla 200 µmol/L' ye kadar çalışılmış ve etkin doz 40 - 150 µmol/L aralığında değişmiştir. (35, 46, 80). Biz ise çalışmamızda SDG' nin uygun doz aralığını; 24. saat için 100 µM, 48. ve 72. saatleri için 150 µM olarak saptadık. Bu dozlarda SDG verilen gruplarda kanser hücrelerinin çoğalmasının yavaşladığını, hücre sayısının apoptozun gerçekleşmesiyle azaldığını gözlemledik.

Sekoisolarikiresinol diglukozid ile yapılan kanser haricindeki çalışmalarda da SDG' nin antioksidan özelliği ile de sağlık açısından önemli bir yere sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra insan çalışmalarında SDG' nin kardiyovasküler hastalıklarda; total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, triaçilgliseridler ve glikoz metabolizması aracılığı ile koruyucu rol oynadığı görülmüştür (83). Bir diğer çalışmada C-reaktif protein aracılığı ile insülin direncinde rol alarak tip II diyabette de koruyucu olduğu bulunmuştur (78). Doza bağlı olmaksızın 300 mg ve 600 mg SDG verilmiş deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada ise her iki grupta da plazma kolesterol ve glikoz düzeylerinin, total LDL' nin azaldığı gözlemlenmiştir. Tüm bu çalışmalara rağmen SDG' nin çalışma mekanizması için kesin bilgilere ulaşamamıştır (43). Hipertansyon hastalıklarında keten tohumundan çok keten yağı ile daha fazla çalışma yapılmasına rağmen; keten tohumunun omega-3 yağ asit alımını arttırarak kan basıncını azaltıp tansiyonu düşürdüğünü kanıtlayan birkaç çalışma mevcuttur (78, 84).

Lignanların hangi mekanizma ile koruyucu rol oynadıkları hala bilinmeyen kısımdır. Memeli lignanlarının emilimi genelde zayıf olmakla birlikte idrarda ve plazmadaki lignan miktarları da çok düşüktür. Ancak lignan içeriği yüksek besinlerle beslenerek plazmadaki lignan miktarları arttırılabilir. Kolon içinde bulunan yüksek miktardaki lignanların önemi tanımlanmamış olmasına rağmen, dışardan alınan besinler aracılığı ile EDL-ENL öncülü olan SDG'nin kolondaki mukozal hücreleri etkileyebileceği düşünülmektedir (73). Özellikle kanser hastalıklarında koruyucu etkisi olduğu düşünülen SDG'nin farklı etkilerini öğrenmeye yönelik çalışmalar hala devam etmektedir. Yapılan çoğu çalışma tümör modeli daha net gözlemlenebildiği için ratlar üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışmamızda ise diğer çalışmalardan farklı olarak kanser modeline daha yakın olan sferoid modeller oluşturularak, oluşan sferoid modeller üzerinde SDG'nin etkisini inceledik. Bu açıdan çalışmamız bir ilktir.

Çalışmamızda SW 480 kolon kanseri hücre hattında SDG ekstraktı ile iki boyutlu (lamelli ekim) ve üç boyutlu (sferoid model) kültür ortamında çalışarak; hem oluşan sferoid modeller üzerinde hem de lamelli ekimde; BrdU, TUNEL, Kaspaz-3, AIF ile immünohistokimyasal işaretlemeler ve gen ekspresyonu yöntemleri kullanıp; apoptoz ve proliferasyon olan hücrelerin varlığını gösterdik.

Keten tohumu ile kolon kanseri üzerine yapılan birçok çalışmada kanserin yavaş geliştiği gözlemlenmiştir. Keten tohumunun oluşmuş meme kanser tümörlerine daha etkili olmasına karşılık SDG'nin gelişme aşamasındaki tümörler üzerinde inhibe edici etkisi olduğu yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Keten tohumunun antitümör etkisi üzerine SDG'nin yanı sıra içerdiği klorejinik, gallik, 4-hidroksi benzoik ve ferulik asitin de etkisi vardır. Bilindiği gibi bu fenolik maddeler kanser oluşumunda etkili ajanları inhibe etmektedirler (29, 46, 80, 85). 10 - 100 µM doz aralığında lignanlarla yapılan *in vitro* çalışmada lignanların; linoleik asit peroksidasyonunu azaltarak kanserden korumada etkili olduğu bulunmuştur (15).

Keten tohumun sağlık açısından faydalı olduğunu kanıtlar durumunda çalışmalar olmasına rağmen, doz konusundaki şüpheler keten tohumunun kısmen de olsa zararlı olabileceğini düşündürmektedir. Keten tohumundaki besinsel bileşenlerin olası negatif etkisi yüksek miktardaki çoklu doymamış yağ asidi miktarı ile ilgilidir. Çok sayıdaki çift bağlar bu yağ asitlerini oksidasyon ve serbest yağ asidi oluşumuna

uygun hale getirmektedir. Bu nedenle uzun süre diyetle alınan yüksek miktarda keten tohumu oksidatif stresi artırabilir ve antioksidan bileşiklerin azalmasına neden olabilir. Keten tohumunda bulunan fitik asit, çinko ve kalsiyum gibi pozitif yüklü minerallere bağlanarak bu minerallerin yetersizliğine neden olabilmekte ve kemik gelişimini etkileyebilmektedir. Keten tohumunda anti-besinsel bileşiklerden biri olan ve B6 vitaminine bağlandığı bilinen linatin'in sağlık üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle keten tohumunun diyetle fazla miktarda alınması B6 vitamin eksikliğine ve sonuçta da homosistein ve böbrek yetmezliğinin artmasına neden olabilmektedir. Keten tohumunun pişirilmeden tüketimi hayvan ve insanlar için fazla miktarda alındığında toksik olabilecek bir bileşik olan siyanojenik glukosidlerin (HCN) üretimine neden olabilir (44-47). Yapmış olduğumuz çalışmada hücre hatları kullandığımız için SDG'nin tüketilmesi gereken zaman uzunluğu ve zararlı etkisi hakkında çok net sonuçlar elde etme imkanımız olmasa da doz aralığının 150 µmol/L den fazla olduğu durumlarda toksik olabilme ihtimali düşüncesindeyiz. SDG ile yapılan çalışmaların genelinde herhangi bir yan etkinin olduğu belirtilmezken hamile ratlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda ise SDG'nin etkili olmadığı ve yeni doğan yavrularda da hiçbir etkinin olmadığı gözlemlenmiştir. Buna rağmen keten tohumunun zararlı olduğuna dair hiçbir kanıt olmadığı için insanların kullanımında herhangi bir sıkıntı olmadığı fakat hamile bayanların tüketim miktarlarına dikkat etmeleri gerektiği düşünülmektedir (61).

Hücre kültürü ve hayvan modeli çalışmalarında, keten tohumunun kolon karsinoma oluşumunu azaltabildiği görülmüş ve bu etki sahip olduğu yüksek dozdaki liflere, lignanlara, yağ asitlerine dayandırılmıştır (61). Bu çalışmalara rağmen hala koruyucu etkinin kaynağı net bir şekilde bilinmemekte, yolaklar konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. Keten tohumunun dozuna bağlı olarak kolon kanserinde koruyucu rol oynayan; p53, p21, rb, bax ve kaspaz - 3 gibi genlerin ekspresyonunun azalıp azalmayacağı konusunda yani keten tohumu miktarına bağlı olarak kanserin önlenip önlenmeyeceği konusunda çalışmalar hala devam etmektedir (31). Çalışmamızda SDG'nin apoptoz ile hücre ölümünü gerçekleştirdiğini gözlemledikten sonra, bu etkiyi hangi yolakları kullanarak sağladığını görmek için iki, üç boyutlu kültür ve gen ekspresyon tayinlerini kullandık ve sonuç olarak

SDG'nin apoptozu daha çok kaspaz yolağını kullanarak gerçekleştirdiğini gözlemledik.

Çalışmamızda yaptığımız tüm araştırmalar hem iki boyutlu (monolayer hücre kültürü) hem üç boyutlu kültür (multiselüler sferoid model) ortamında gerçekleştirilmiş hem de gen ekspresyon yöntemleri uygulanmış ve tüm bu yöntemler arasındaki sonuçlar karşılaştırılmıştır. SDG'nin kolon kanseri hücre hattı üzerine etkisinin üç boyutlu kültür ortamında (*in vivo* uyumlu ve *in vivo* mikroçevre özelliklerini sağlayan en iyi *in vitro* model olarak kullanılan multiselüler sferoidler) çalışılması ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu açıdan araştırmamız bir ilk olmaktadır.

İki boyutlu lamelli ekim çalışmasında hücre ekiminden sonra kontrol ve deney grubu şeklinde gruplandırma yaparak deney grubuna belirli doz aralıklarında SDG verdik. Proliferasyon etkisinin gösterimi için BrdU boyaması uyguladık. Apoptotik etki için TUNEL boyama yöntemi, hangi yolak üzerinden gerçekleştiğini görmek için ise kaspaz - 3, AIF boyama yöntemi uyguladık. BrdU ile yapılan immünohistokimyasal boyamada SDG grubunda işaretleme indeksinde, kontrol grubu işaretlenme indeksine oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemledik ($p < 0.05$). Kontrol grubuna kıyasla SDG verilen hücrelerde TUNEL, kaspaz - 3, AIF ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda her üç saat aralığında da (24.- 48.-72.) çok sayıda hücre TUNEL, Kaspaz-3 ve AIF ile boyandı ($p < 0.05$). Kaspaz - 3 ile AIF boyamaları karşılaştırdığımızda kaspaz - 3 ile çok daha fazla sayıda hücrenin pozitif olarak boyandığını gördük ve bu sonuç bize apoptozisin kaspaz yolağı ile gerçekleştiği düşüncesine yakınlaştırdı.

Üç boyutlu kültür çalışmalarında sferoidler oluştuktan sonra iki boyutlu lamelli ekimde olduğu gibi aynı amaç ile sırasıyla BrdU, TUNEL, Kaspaz - 3, AIF boyamaları yaparak sonuçları iki boyutlu sonuçlarla karşılaştırdık. İki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin boyanmasına kıyasla sferoidlerin kenar kısmındaki hücrelerde daha fazla boyanma gözlemledik. Bu sonuç bize vücuttaki tümörlere benzer şekilde sferoidlerde de perifer kısımdaki hücrelerin daha çabuk öldüğü, orta kısımdaki hücrelerin daha fazla oksijen ve daha fazla beslenmeden dolayı geç öldüğü ihtimalini düşündürdü. BrdU ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda ise

işaretlenmiş sentez fazındaki hücreleri sayıp, yüzdeleri alarak BrdU işaretlenme indeksini hesapladık. Yapılan değerlendirmeye göre sferoidlere uygulanan SDG grubunda; işaretleme indeksinde, kontrol grubu işaretlenme indeksine oranla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.05$). Kontrol grubuna kıyasla SDG verilen sferoidlerde TUNEL, Kaspaz - 3, AIF ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda her üç saat aralığında da (24. – 48. - 72.) çok sayıda hücrenin TUNEL, Kaspaz - 3 ve AIF ile boyandığını gözlemledik ($p < 0.05$). Sferoidlerde gördüğümüz bu sonuçlarla iki boyutlu sonuçlar arasında paralellik olduğunu tespit ettik. Kaspaz - 3 ile AIF boyamalarını karşılaştırdığımızda ise yine lamelli ekimde elde ettiğimiz sonuçlarla aynı doğrultuda kaspaz - 3 ile çok daha fazla sayıda hücrenin pozitif olarak boyandığını gözlemledik ($p < 0.05$).

Klinik ve laboratuvar çalışmaları da; keten tohumun lignanlarından SDG' nin sahip olduğu sayısız biyolojik özellikleriyle eşsiz ve kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır. Yeni yapılacak çalışmalarda SDG' nin oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiğinin ve özellikle sinyal yollarının belirtilmesine ihtiyaç vardır. Çalışmalar laboratuvar ve hayvan deneylerinin yanı sıra insan çalışmalarıyla da desteklenmelidir (15). Araştırmacılar omega-3 yağ asidi içeren keten tohumunun belirli enfeksiyon hastalıklarında, ülser, migren, baş ağrısı, besin zehirlenmeleri hatta panik atak durumlarında bile koruyucu olup olmadığına yönelik çalışmalar da yapmaktadırlar (24). Bunun yanı sıra tüketilen keten tohumu miktarının da ortaya çıkacak etkide önemli rol oynadığı bilinmekte ve standard olarak tüketilecek keten tohumu miktarına yönelik daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (48).

Çalışmamızın gen ekspresyon verilerine göre özellikle 24. saatte kaspaz-3 gen ekspresyonunun oldukça fazla olduğu görüldü ($p < 0.05$). Bu durum immünohistokimyasal bulgularımızı da desteklemektedir. Elde ettiğimiz tüm sonuçlar eşliğinde gerek iki boyutlu gerekse üç boyutlu kültür sonuçlarımız SDG' nin SW 480 kolon kanseri hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisini kaspaz yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Yaptığımız literatür taramalarında SDG ile yapılmış çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma mevcuttur, fakat hiçbirinde immünohistokimyasal analiz ve üç boyutlu kültür eldesi yapılmamıştır. Üç boyutlu sferoid model vücuttaki tümör yapısını daha

iyi gösterdiğinden dolayı çalışmamızın *in vitro* ortamda yapılan kolon kanseri çalışmalarına destek olacağı düşüncesindeyiz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser, erken tanı ve tedavi edilmediği takdirde çoğunlukla ölüme yol açan ciddi bir sağlık sorunudur. Özellikle gelişmiş ülkelerdeki ölümlerin % 25' ini kanser oluşturmakta ve tüm ölüm nedenleri arasında iskemik kalp hastalığından sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Kolon kanseri gelişmiş batı ülkelerinde kadında ve erkekte üçüncü en sık görülen kanserdir. Son yıllarda tarama testleri sayesinde erken tanı ve daha iyi tedavi olanakları kolon kanserinden mortaliteyi azaltmıştır.

Modern hayat biçimi ve yanlış beslenme kanda yüksek lipid ve kolesterol seviyesi, yüksek tansiyon, şişmanlık, kalp ve sinir sistemi hastalıklarına neden olmakta ve kansere davetiye çıkarmaktadır. Kanser tedavisinde birçok kemoterapi yöntemi, ilaçlar ve cerrahi müdahaleler kullanılmakta, fakat henüz beklenen oranda tedaviye cevap alınmamaktadır. Bu nedenle geleneksel tedavilerde kullanılan bitkisel veya diğer doğal kaynaklı ürünlerin bilimsel tedavilerin yanında kullanılışı hakkında yoğun olarak çalışmalar yapılmaktadır.

Sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından potansiyel toksik olabileceğinin varsayımı, özellikle günümüzde tüketici tercihlerini doğal tarımsal ürünlere yöneltmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön plana çıkarmıştır. Keten tohumu sahip olduğu biyoaktif fonksiyonlardan; antioksidan, antimikrobiyal ve anti-kanser özelliklerinden dolayı son yıllarda daha çok tercih edilen doğal ürünlerden olmuştur.

Çalışmamızda keten tohumunun kanserden koruyucu özelliğini göz önünde bulundurarak SW 480 kolon kanseri hücre hatları üzerine etkisini iki ve üç boyutlu kültür ortamlarında araştırdık. Keten tohumunun kanser hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisini, hem immünohistokimyasal işaretlemelerle hem de gen ekspresyon yöntemleriyle gösterdik. Daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak, SDG'nin apoptotik etkisini vücuttaki tümör yapısını en iyi yansıtan sferoid model üzerinde kanıtladık. Bu açıdan çalışmamız bir ilki oluşturmaktadır.

Sonuç olarak keten tohumunun kolon kanseri hücre hattındaki apoptotik etkisini, hem monolayer hem de sferoid modellerde göstererek kanserde etkili olabildiğini daha somut bir şekilde göstermiş bulunmaktayız. Bundan sonra

yapılacak çalışmalarda SDG'nin apopitotik yolaklarında hangi genlerin eksprese olmasına neden olduğunun daha detaylı araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz, çalışmamızın bu anlamda, planlanacak hücre kültürü deneylerine kaynak oluşturacağına ve ışık tutacağına inanmaktayız.



7.ÖZET

Linum Usitatissimum Bitkisinden Elde Edilen Sekoisolarikiresinol Diglukosid Maddesinin Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkisi

Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından tüm kanser türleri arasında meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4. sırada yer almaktadır. Kolon kanseri nedenleri arasında, kalıtım, çevresel, beslenme kaynaklı, radyasyon, adenometanoz polip, inflamatuvar bağırsak hastalığı, kolonda daha önceden karsinom varlığı gibi durumlar bulunmaktadır.

Keten tohumu (*Linum usitatissimum*), 30- 100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Günümüzde bitkisel ürünlere dayalı beslenmenin kronik hastalık, özellikle kanser riskini azaltabildiğine dair çok sayıda *in vivo* - *in vitro* ve klinik deneme verileri vardır. Keten tohumu bu açıdan incelendiğinde, α -linolenik asit ve iyi kaliteli protein bakımından zengin olmasının yanı sıra, flavonoid, lignan ve fenolik asitler gibi fitokimyasalların da doğal kaynağı durumundadır.

Keten tohumu memeli lignan ön maddesi olan sekoisolarikiresinol diglukozit (SDG) açısından en zengin kaynaktır (0.2-3.7 mg/g tohum). Keten tohumunda bulunan SDG lignan sadece anti-kanser ve anti-oksidan özelliğe sahip değil, antiviral antibakteriyal ve antifungal özelliğe de sahiptir.

Çalışmamızda keten tohumunda bulunan sekoisolarikiresinol diglukozitin anti- kanser özelliği göz önüne alınarak, kolon kanseri hücre hatları üzerinde, apoptotik etkilerini iki boyutlu, üç boyutlu kültür ortamında ve gen ekspresyon düzeyinde incelemeyi planladık. DSMZ' den sağladığımız CCL-228-SW 480 kolon karsinoma hücre hatları üzerine, *in vitro* ortamda SDG uygulayarak etkisini; proliferasyon, canlılık ve tutunma deneyi, imünohistokimyasal olarak aktif Kaspaz – 3 ve AIF tayini, Bromodeoksiüridin (BrdU) işaretleme indeksi, TUNEL, RT PCR ile kaspaz - 3 mRNA ekspresyon düzeylerinin saptanması metodlarını kullanarak belirledik.

Çalışmamızın sonunda kolon kanseri hücre hattına etkin dozlarda (etkin dozlar: 24. – 48. – 72. saatleri için sırasıyla 100 μ M – 150 μ M – 150 μ M) verilen SDG'nin, hücre proliferasyonunu azalttığı, apoptotik hücre sayısını arttırdığı hem iki

boyutlu, hem üç boyutlu kültür ortamında, hem de gen ekspresyon düzeyinde göstermiş bulunmaktayız. SDG'nin SW 480 kolon kanseri üzerine apopitotik etkisi daha önce sferoid modelde gösterilmemiştir, bu açıdan çalışmamız bir ilktir. Bunun yanı sıra bizler elde ettiğimiz iki ve üç boyutlu kültür sonuçlarımızın daha sonra yapılacak SDG ve kanser çalışmalarına ışık tutacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: *Linum Usitatissimum*, kolon, karsinoma, in-vitro



ABSTRACT

Effect Of Diglukosid Sekoisolarikiresinol Obtained From Plant Of *Linum usitatissimum* On Colon Cancer Cell Lines

The incidence of colorectal carcinoma is ranked 4th after breast, prostate and lung carcinomas. Most of colon tumors are consisted of adenocarcinomas. Etiology of column carcinomas includes heredity, nutrition, radiation, adenomatous polypes, inflammatory bowel disease and earlier colon carcinomas.

Linum Usitatissimum is a 30-100 cm in length and blue flowered annual cultivated plant. There are so many *in vivo*, *in vitro* and clinical research results proving herbal nutrition can reduce the incidence of chronic diseases and the risk of cancer. *Linum Usitatissimum* contains so much good quality protein and α - linolenic acid and also it is the natural source of flavonoids, lignin and fenolic acid. It is also the main source of sekoisolarikiresinol diglukocid (SDG) – the precursor of mammal lignin- (0.2-3.7 mg/g). Beside anti-carcinogenic and anti-oxidant properties the sekoisolarikiresinol diglukocid of *Linum Usitatissimum* have also antiviral, antibacterial and antifungal properties.

We planed to investigate the apoptotic effects of sekoisolarikiresinol diglikozit which is the extract of *Linum Usitatissimum* on the human colon carcinoma cell lines CCL-228-SW 480 in both two and three dimensional culture conditions. In this context we planned to investigate cell proliferation, vitality and adhesion by immunohistochemically determination of active caspase-3 and AIF, bromodeoxyuridine (BrdU) labeling index, determination of expression levels of caspase-3 and AIF mRNAs with RT-PCR and TUNEL method by using the plant extract to the cell line CCL228-SW 480 provided from DMSZ *in vitro* conditions.

We proved that the extract of *Linum Usitatissimum* causes apoptosis on effective dose (effective doses: 100 μ M – 150 μ M – 150 μ M for 24. – 48. – 72. hours) with BrdU, Tunnel, Caspas-3, AIF and mRNA on cells of human colon carcinoma cell lines. Because of two and three dimensional culture our study is more comprehensive than other studies. And three dimesional culture is closer to cancer forms. It's clearly understood that *Linum Usitatissimum*'s extract, SDG, is beneficial

for many of cancers especially colon cancer. We think that our two and three dimensional studies are helpful for further cancer studies. A new treatment alternative for colon carcinoma will be improved. Also, it will be beneficial for both patients health and treatment costs.

Keywords: *Linum Usitatissimum*, colon, carcinoma, in-vitro



KAYNAKLAR

1. Pfister DG, Rubin DM, Elkin EB, Neill US, Duck E, Radzyner M, Et Al. Risk Adjusting Survival Outcomes In Hospitals That Treat Patients With Cancer Without Information On Cancer Stage. JAMA Oncology. 2015;1(9):1303-10.
2. Başpınar M. Kanserli Kolon Hücre Dizisinde Seranib-2 Maddesinin Apoptoz Oluşumuna Ve Hücre Yaşamına Olası Etkileri (tıpta Uzamlık Tezi) Osmangazi Üniversitesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı; 2015:7-10.
3. <http://www.Kanser.Org/Toplum/Pdf/Knedir.Pdf> 2016. (Erişim Tarihi: 7 Temmuz 2016).
4. Chen J, Saggar JK, Corey P, Thompson LU. Flaxseed And Pure Secoisolariciresinol Diglucoside, But Not Flaxseed Hull, Reduce Human Breast Tumor Growth (MCF-7) In Athymic Mice. The Journal Of Nutrition. 2009;139(11):2061-6.
5. Güran Ş. Kanserden Korunma. Gülhane Tıp Dergisi. 2005;47:324-6.
6. Kanser Nedir? <Http://www.Kanser.Org/Toplum/Pdf/Knedir.Pdf> 2016, (Erişim Tarihi: 7 Temmuz 2016).
7. Koç LY. Bazı Bitki Ektrelerinin Antimikrobiyal, Antioksidan Ve Sitotoksik Etkileriyle, Kanserli Dokularda Adenozin Deaminaz Enzimi Üzerine Etkisi (Doktora Tezi) Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü; 2012:10-30.
8. Webb AL, McCullough ML. Dietary Lignans: Potential Role In Cancer Prevention. Nutrition And Cancer. 2005;51(2):117-31.
9. Sevim G. Melatoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun Ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi Ve İmmunohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması (Doktora Tezi) Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2013:15-27.
10. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/>, (Erişim Tarihi:15 Temmuz 2016).
11. <https://kokhucregentr.files.wordpress.com/2015/07/cell-division.jpg>, (Erişim Tarihi:15 Temmuz 2016).

12. <http://www.kocintok.com.tr/lam-thoma-d-194.html>, (Erişim Tarihi: 5 haziran 2016)
13. Özçelik H, Fadiloğlu Ç. Kanser Hastalarının Tamamlayıcı Ve Alternatif Tedavi Kullanım Nedenleri. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2009;24(1):48-52.
14. Rafferty AP, Mcgee HB, Miller CE, Reyes M. Prevalence Of Complementary And Alternative Medicine Use: State-Specific Estimates From The 2001 Behavioral Risk Factor Surveillance System. *American Journal Of Public Health*. 2002;92(10):1598-600.
15. Imran M, Ahmad N, Anjum FM, Khan MK, Mushtaq Z, Nadeem M, Et Al. Potential Protective Properties Of Flax Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside. *Nutrition Journal*. 2015;14(1):1.
16. Yavuz M, İlçe Aö, Kaymakçı Ş, Bildik G, Diramali A. Meme Kanseri Hastaların Tamamlayıcı Ve Alternatif Tedavi Yöntemlerini Kullanma Durumlarının İncelenmesi. *Turkiye Klinikleri Journal Of Medical Sciences*. 2007;27 (5):680-6.
17. Algier LA, Hanoglu Z, Özden G, Kara F. The Use Of Complementary And Alternative (Non-Conventional) Medicine In Cancer Patients In Turkey. *European Journal Of Oncology Nursing*. 2005;9 (2):138-46.
18. Tomida C, Aibara K, Yamagishi N, Yano C, Nagano H, Abe T, Et Al. The Malignant Progression Effects of Regorafenib In Human Colon Cancer Cells. *The Journal Of Medical Investigation*. 2015;62 (3.4):195-8.
19. Bos JL. Ras Oncogenes In Human Cancer: A Review. *Cancer Research*. 1989;49(17):4682-9.
20. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/>, (Erişim Tarihi: 5 haziran 2016).
21. Telkoparan P. Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal Of Biochemistry–Turk J Biochem]*. 2011;36(4):367-73.
22. <http://kolonkanseri.blogspot.com.tr/2014/09/kolon-kanserinde-ras-sinyal-iletimi.html>, (Erişim Tarihi: 11 Ekim 2016).
23. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/>, (Erişim Tarihi: 11 Ekim 2016).

24. Bernacchia R, Preti R, Vinci G. Chemical Composition And Health Benefits Of Flaxseed. *Austin J Nutri Food Sci.* 2014;2 (8):1045.
25. Borlu Mh. Lavaş Ekmeğine Farklı Seviyelerde Keten (*Linum Usitatissimum*) Tohumu Unu Katkılanmasının Hamur Ve Ekmek Özellikleri Üzerine Etkisi, Omega 3, Omega 6 Yağ Asitleri Ve Lignan Açısından Değişimin Belirlenmesi, (Yüksek Lisans tezi), Pamukkale Üniversitesi: 2009:35-48.
26. Witalison EE, Cui X, Causey CP, Thompson PR, Hofseth LJ. Molecular Targeting Of Protein Arginine Deiminases To Suppress Colitis And Prevent Colon Cancer, 2015; 3;6(34):36053-62.
27. Büyüktuncer Z, Başaran AA. Fitoöstrojenler Ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2005; 25 (2): 79-94.
28. <http://www.helalvedogal.com/wpcontent/uploads/2010/07/fonk.nutrasotic.pdf> (Erişim Tarihi: 9 haziran 2016).
29. Konuklugil B, Bahadır Ö. *Linum Usitatissimum L.*'Nin Kimyasal Bileşikleri Ve Biyolojik Aktiviteleri. *Ankara Ecz Fak Dergisi.* 2004;33(1):63-84.
30. Moree SS, Rajesha J. Secoisolariciresinol Diglucoside: A Potent Multifarious Bioactive Phytoestrogen of Flaxseed. *Research And Reviews In Biomedicine And Biotechnology.* 2011;(2):1-24.
31. Hernández-Salazar M, Guevara-González RG, Cruz-Hernández A, Guevara-Olvera L, Bello-Pérez LA, Castaño-Tostado E, Et Al. Flaxseed (*Linum Usitatissimum L.*) And Its Total Non-Digestible Fraction Influence The Expression Of Genes Involved In Azoxymethane-Induced Colon Cancer In Rats. *Plant Foods For Human Nutrition.* 2013;68(3):259-67.
32. Abadoğlu Ö. Keten Tohumu Ve Allerjik Reaksiyonlar: Bir Olgu Sunumu. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Allerjik Hastalıklar Bilim Dalı.* 2006:024-5.
33. Besin, Faktür ve Bileşenleri, Yağ Asitleri Ve Mineral *Journal of Food and Health Science.* 2015;1(3):124-34.
34. Doğmuş D, Durucasu İ. Keten Tohumu Çeşitlerinin N-Bütanol Fraksiyonlarının Fenolik Bileşenlerinin Antioksidan Aktivitesi. *Celal Bayar University Journal Of Science.* 2013;9(1):47-56.

35. Ayella A, Lim S, Jiang Y, Iwamoto T, Lin D, Tomich J, Et Al. Cytostatic Inhibition Of Cancer Cell Growth By Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside. *Nutrition Research*. 2010;30(11):762-9.
36. During A, Debouche C, Raas T, Larondelle Y. Among Plant Lignans, Pinoresinol Has The Strongest Antiinflammatory Properties In Human Intestinal Caco-2 Cells. *The Journal Of Nutrition*. 2012;142(10):1798-805.
37. Saggar JK, Chen J, Corey P, Thompson LU. Dietary Flaxseed Lignan Or Oil Combined With Tamoxifen Treatment Affects MCF-7 Tumor Growth Through Estrogen Receptor-And Growth Factor-Signaling Pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2010;54(3):415-25.
38. Van Kranen HJ, Mortensen A, Sorensen IK, Van Den Berg-Wijnands J, Beems R, Nurmi T, Et Al. Lignan Precursors From Flaxseed Or Rye Bran Do Not Protect Against The Development Of Intestinal Neoplasia In Apcmin Mice. *Nutrition And Cancer*. 2003;45(2):203-10.
39. Ölgen S, Biçak I, Nebioğlu D. Angiogenesis Ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *J Fac Pharm*. 2002;31(3):193-214.
40. Patel D, Vaghasiya J, Pancholi S, Paul A. Therapeutic Potential Of Secoisolariciresinol Diglucoside: A Plant Lignan. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Drug Research*. 2012;4(1):15-8.
41. Schmidt TJ, Klaes M, Sendker J. Lignans In Seeds Of Linum Species. *Phytochemistry*. 2012;82:89-99.
42. Rickard SE. Dose-Dependent Production Of Mammalian Lignans In Rats And In Vitro From The Purified Precursor Secoisolariciresinol Diglycoside In Flaxseed. *The Journal Of Nutrition*. 1996;126(8):2012.
43. Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BH, Thorpe LU, Alcorn J. Health Effects With Consumption Of The Flax Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside. *British Journal Of Nutrition*. 2010;103(07):929-38.
44. Williams D, Verghese M, Walker L, Boateng J, Shackelford L, Chawan C. Flax Seed Oil And Flax Seed Meal Reduce The Formation Of Aberrant Crypt Foci (ACF) In Azoxymethane-Induced Colon Cancer In Fisher 344 Male Rats. *Food And Chemical Toxicology*. 2007;45(1):153-9.

45. Niemeier HB, Honig DM, Kulling SE, Metzler M. Studies On The Metabolism Of The Plant Lignans Secoisolariciresinol And Matairesinol. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2003;51(21):6317-25.
46. Danbara N, Yuri T, Tsujita-Kyutoku M, Tsukamoto R, Uehara N, Tsubura A. Enterolactone Induces Apoptosis And Inhibits Growth Of Colo 201 Human Colon Cancer Cells Both In Vitro And In Vivo. *Anticancer Research*. 2005;25(3B):2269-76.
47. Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed And Cardiovascular Risk. *Nutrition Reviews*. 2004;62(1):18-27.
48. Nesbitt PD, Lam Y, Thompson LU. Human Metabolism Of Mammalian Lignan Precursors In Raw And Processed Flaxseed. *The American Journal Of Clinical Nutrition*. 1999;69(3):549-55.
49. Hausott B, Greger H, Marian B. Naturally Occurring Lignans Efficiently Induce Apoptosis In Colorectal Tumor Cells. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology*. 2003;129(10):569-76.
50. İşleroğlu H, Yildirim ZYM. Fonksiyonel Bir Gıda Olarak Keten Tohumu. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 2005;2005(2):22-30.
51. Oomah BD, Der TJ, Godfrey DV. Thermal Characteristics Of Flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.) Proteins. *Food Chemistry*. 2006;98(4):733-41.
52. Chung M, Lei B, Li-Chan E. Isolation And Structural Characterization Of The Major Protein Fraction From Norman Flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.). *Food Chemistry*. 2005;90(1):271-9.
53. Vincent A, Fitzpatrick LA, editors. Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clinic Proceedings*; 2000; (75)11:1174–1184.
54. Roncaglia L, Amaretti A, Raimondi S, Leonardi A, Rossi M. Role Of Bifidobacteria In The Activation Of The Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside. *Applied Microbiology And Biotechnology*. 2011;92(1):159-68.
55. Hallmans G, Zhang J-X, Lundin E, Stattin P, Johansson A, Johansson I, Et Al. Rye, Lignans And Human Health. *Proceedings Of The Nutrition Society*. 2003;62(01):193-9.
56. Fuentealba C, Figuerola F, Estévez AM, Bastías JM, Muñoz O. Bioaccessibility Of Lignans From Flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.)

- Determined By Single-Batch In Vitro Simulation Of The Digestive Process. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*. 2014;94(9):1729-38.
57. Kitts D, Yuan Y, Wijewickreme A, Thompson L. Antioxidant Activity Of The Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglycoside And Its Mammalian Lignan Metabolites Enterodiol And Enterolactone. *Molecular And Cellular Biochemistry*. 1999;202(1-2):91-100.
58. Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wähälä K, Deyama T, Et Al. In Vitro Metabolism Of Plant Lignans: New Precursors Of Mammalian Lignans Enterolactone And Enterodiol. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2001;49(7):3178-86.
59. Clavel T, Henderson G, Engst W, Doré J, Blaut M. Phylogeny Of Human Intestinal Bacteria That Activate The Dietary Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006;55(3):471-8.
60. Mazur W, Fotsis T, Wähälä K, Ojala S, Salakka A, Adlercreutz H. Isotope Dilution Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Method For The Determination Of Isoflavonoids, Coumestrol, And Lignans In Food Samples. *Analytical Biochemistry*. 1996;233(2):169-80.
61. Hosseinian FS, Muir AD, Westcott ND, Krol ES. AAPH-Mediated Antioxidant Reactions Of Secoisolariciresinol And SDG. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2007;5(4):644-54.
62. Penumathsa SV, Koneru S, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Prasad K, Maulik N. Secoisolariciresinol Diglucoside: Relevance To Angiogenesis And Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 2007;320(2):951-9.
63. Çoğulu Ö, Alpman A, Durmaz B, Özkinay F. Mitoz ve Mayozun Moleküler Temelleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2007;27(5):725-37.
64. http://www.biyodoc.com/hucre-bolunmesi-hucrenin-yasam_dongusu.html, (Erişim Tarihi: 10 haziran 2016).
65. Burbidge C. Cell Culture Method. Patent No 4, 144, 126, 1979.
66. Ay Me, Terzioğlu O, Terzi C, Özlem İ. Kolorektal kanserlerde, p21, p27, p57 siklin bağımlı kinaz inhibitör geni (CDKI) ekspresyonlarının değerlendirilmesi*. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*. 2006;5(1): 40-7.

67. Oktar N. K562 Hücre Dizisinde Fosfin Bileşiklerinin Sitotoksik Etkisinin MTT (3-(4, 5-Dimethyliazole-2-Yl)-2, 5-Diphenyltetrazoliumbromide; Thiazolyl Blue) Ile Araştırılması (Tez). Adana: Çukurova Üni Sağlık Bil Enst. 2009: 22-37.
68. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araş Derg 6.2 (2008): 93-104.
69. Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. Henrietta Lacks, Hela Cells, And Cell Culture Contamination. Archives Of Pathology & Laboratory Medicine. 2009;133(9):1463-7.
70. Li F, Vijayasankaran N, Shen A, Kiss R, Amanullah A, editors. Cell culture processes for monoclonal antibody production. MAbs, Taylor & Francis.; 2010;(2)5:466-479.
71. Summers MD, Smith GE. A Manual Of Methods For Baculovirus Vectors And Insect Cell Culture Procedures. 1987:1-60.
72. Erarslan E, Yüksel İ. Obezite Ve Gastrointestinal Kanseri İlişkisi. Yeni Tıp Dergisi. 2011;28(4):203-6.
73. Sezgin C. Kanserde Bitkilerle Tedavide Örnek Uygulamalar. Bitkilerle Tedavi. 2011:1-172.
74. Coulman KD, Liu Z, Hum WQ, Michaelides J, Thompson LU. Whole Sesame Seed Is As Rich A Source Of Mammalian Lignan Precursors As Whole Flaxseed. Nutrition And Cancer. 2005;52(2):156-65.
75. Ho SM. Estrogens And Anti-Estrogens: Key Mediators Of Prostate Carcinogenesis And New Therapeutic Candidates. Journal Of Cellular Biochemistry. 2004;91(3):491-503.
76. Nesbitt PD. Mammalian Lignan Production From Flaxseed, Studies In Vitro And In Humans. Nutr Cancer. 1997;29(3):222-7.
77. Dedeli Ö, Fadiloğlu Ç, Rüşhan U. Kanserli bireylerin fonksiyonel durumları ve algıladıkları sosyal desteğin incelenmesi. Türk onkoloji dergisi. 2008;23(3):132-9.
78. Godugu C, Patel AR, Desai U, Andey T, Sams A, Singh M. Algimatrix™ Based 3D Cell Culture System As An In-Vitro Tumor Model For Anticancer Studies. Plos One. 2013;8(1):1-13.

79. Qu H, Madl RL, Takemoto DJ, Baybutt RC, Wang W. Lignans Are Involved In The Antitumor Activity Of Wheat Bran In Colon Cancer SW480 Cells. *The Journal Of Nutrition*. 2005;135(3):598-602.
80. Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, Mccullough ML. Dietary Lignans: Physiology And Potential For Cardiovascular Disease Risk Reduction. *Nutrition Reviews*. 2010;68(10):571-603.
81. Jenab M, Thompson LU. The Influence Of Flaxseed And Lignans On Colon Carcinogenesis And B-Glucuronidase Activity. *Carcinogenesis*. 1996;17(6):1343-8.
82. Muir AD, Westcott ND. Quantitation Of The Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside In Baked Goods Containing Flax Seed Or Flax Meal. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2000;48(9):4048-52.
83. Haydaroğlu A, Bölükbaşı Y, Özsaran Z. Ege Üniversitesi'nde Kanser Kayıt Analizleri: 34134 Olgunun Değerlendirmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2007;22(1):22-8.
84. Ayella A, Lim S, Jiang Y, Iwamoto T, Lin D, Tomich J, et al. Cytostatic inhibition of cancer cell growth by lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Nutrition research (New York, NY)*. 2010 Nov;30(11):762-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Meltem	Soyadı	ÖZGÖÇMEN
Doğum Yeri	Ankara	Doğum Tarihi	21.0.1984
Uyruğu	T.C	Tel	05320554104
e- mail	meltemozmeltem@hotmail.com	Adres	Modernevler mah. 131. Cad. no:B7 merkez /ISPARTA

Eğitim düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora	SDÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.	2016
Yüksek lisans	SDÜ Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD.	2011
Lisans	SDÜ Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl)
Araştırma Görevlisi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2010-2016

Yabancı Dilleri	KPDS / ÜDS Puanı	Diğer Puanı
İngilizce	70	Yok

YAYINLAR MAKALELER

SCI Tarafından Taranan Dergilerdeki Makaleler

Nurcan Dogan, Mustafa Akçam, Tuğba Koca, Duygu Kumbul Doguç, Meltem Özgöçmen, The protective effect of Caparis ovata in acute hepatotoxicity induced by paracetamol, Turk J Med Sci,(2015)45

Mermut Gokce S, Karacayli U, Nalcaci R, Avunduk MC, Ozgocmen M, Karasahin E, Gokce HS. The Effect of Human Amniotic Fluid on Mandibular Distraction Osteogenesis. Int J Oral Max Surg. 2015 Mar;44(3)404-11

D Bayram, ES Çetin, M Kara, M Özgöçmen, IA Candan "The apoptotic effects of silibinin on MDA-MB-231 and MCF-7 human breast carcinoma cells" Hum Exp Toxicol 0960327116658105, first published on July 10, 2016 as doi:10.1177/0960327116658105

Pinar Karabacak, Filiz Alkaya Solmaz, Fatih Gultekin, Meral Oncu, Ozlem Yuksel, Meltem Ozgoçmen, Ilter Ilhan. The effectiveness of kefir in acute renal failure due to glycerol-induced rhabdomyolysis. Int J Clin Exp Med 2016;9(9):17919-17925 www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0027784

SCI Dışındaki İndeks Ve Özler Tarafından Taranan Dergilerdeki Makaleler

Meltem Özgöçmen, Meral Öncü, "Alkolik olmayan farelerde karaciğer yağlanması visfatin ve interlekin-6'nın etkisinin incelenmesi" (Effect of visfatin and Il-6 on nonalcoholic fatty liver disease in mouse), S.D.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,2013;4(3),140-141.

Dilek Bayram, Meral Öncü, Nurten Özçelik, Hacı Ramazan Yılmaz, Efan Uz, Alpaslan Gökçimen, Meltem Özgöçmen "Sıçan Karaciğeri Üzerine Tiyopental Sodyum ve Propofolün Etkileri" SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi. 2014, 5(2); 26-44

Ahmet Koyu, Nurhan Gümral, Halil Aşçı, Alpaslan Gökçimen, Meltem Özgöçmen, Nilüfer Özdamar. 2450 MHz elektromanyetik alanın sıçan tiroid dokusuna etkisi; Selenyum ve LKarnitinin koruyucu rolü. Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg 2014;21(4):133-141

Dilek Bayram, Alpaslan Gökçimen, Meral Öncü, İbrahim Aydın Candan, Meltem Özgöçmen, "Silybum marianum bitkisinin in vitro ortamda karaciğer kanseri hcre hatları üzerine etkisi", Med. J. SDÜ/ SDÜ Tıp Fak. Derg;2015;22(4):87-96

Ahmet Koyu¹, Nurhan Gümrall¹, Mustafa Saygın¹, Alpaslan Gökçimen², Meltem Özgöçmen³, Fatma Kılınç¹, Hüseyin Yavuz⁴, Effect of Electromagnetic Field(Wi-Fi) on the Pancreas: Role of Selenium and L-Carnitine Journal of Clinical and Analytical Medicine,2015

POSTERLER

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Ve Özet Metin Olarak Yayımlanan Bildiriler

Gokcimen A, Birden B, Ozgocmen M, Doguc K. D, Gumral N, Kocak A, "Effect pf Silybum Marianum on sucrose induced liver steatosis on rats" Baltic Morphology, 27-28 August 2009; Kaunas, Lithuania

Bayram D, Karatopuk D, Kocak A, Candan A, Gokcimen A, Ozgocmen M, "Determination of Lethal Dose of Tenoxicam: A Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug" 2nd International Liver Symposium p.44 20-22 May 2009, ISPARTA

Koyu A, Gumral N, Gokcimen A, Saygın M, Vural H, Ozgocmen M, "Protective effects of Lcarnitine and Selenium on 2450 MHz Electromagnetic radiation exposed Pancreas Tissue " 3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress, June 2010, ISPARTA

S. Mermut Gökçe, Ü Karacaylı, R. Nalçacı, M.C. Avunduk, M. Özgöçmen, " İnsan Amniyotik Sıvısının Mandibular Distraksiyon Osteogenesisi Üzerine Etkisi " 13th International Congress Of The Turkish Orthodontic Society, 30 Eylül-4 Ekim 2012, Antalya

M. Ozgocmen¹, A. Gokcimen², H. Darici¹, I.A. Candan¹, M. Oncu¹, "Effect of High Fructose Diet on Visfatin and IL-6 Levels in Liver and Fat Tissues", 4th International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signalling and TRP Channels. 26-29 June 2012. Published as abstract in Cell Membranes and Free Radical Research Volume 4, No:1, p 6667. 2012

D. Bayram, A.Gökçimen, M. Öncü, İ.A. Candan, M. Özgöçmen "Slybum marianum bitkisinin in vitro ortamda karaciğer kanseri hücre hatları üzerine etkisi" 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Mersin; 28-31 Mayıs 2013.(Özet)

Yesilot S, Asci H, Cankara NF, Ozgocmen M, Saygın M, Cicek E, Aspirin and vitamin C Prevent corn syrup induce renal damage in rats, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:94

Cetin SE, Bayram D, Kara M, Candan İA, Ozgocmen M, The Viscum Album L. Extracts induce Apoptosis of human breast cancer MDA- MB-231 Cells, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey. p:129

Cetin SE, Bayram D, Kara M, Ozgocmen M, Candan İA, Conformation of apoptotic effect of the Viscum Album L. extract on human breast cancer MCF-7 cells with Tunel assay, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:155

Cetin SE, Bayram D, Kara M, Candan IA, To examine the effects of the tymoquinone on human berast cancer MDA-MB-231 Cells, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:153

Bayram D, Cetin SE, Kara M, Ozgocmen M, Candan IA, To examine the effects of the silibinin on human breast cancer MDA- MB-231 Cells, 5th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. 9-12 September 2014, Isparta/ Turkey.p:154

Duygu Ersoy Çalışkan, Mustafa Akçam, Tuğba Koca, Duygu Kumbul Doğuç, Meltem Ozgöçmen. Protective effect of punica granatum juice in acute hepatotoxicity induced by paracetamol. Copedia, world congress on controversies in pediatrics. P02, s 68, Prague, czech republic, april 24-27, 2014

Armagan I, Bayram D, Candan I.A, Armagan H.H, Ozgocmen M, Effect of Alpha Lipoic Acid on Methotrexate- Induced Testicular Damage,2. International medical student congress, Isparta, 9-11 may 2014,pp:5

Candan İA, Bayram D, Özgöçmen M, Effect of Selenium and Melatonin on cadmium induced damage in rat lungs, XXIV International Symposium on Morphological Sciences, september 25,2015

İ. Aydın Candan, Dilek Bayram, Meltem Özgöçmen, İlkey Armagan, Effect of Selenium and Melatonin on cadmium induced damage in rat liver and kidney 12th Multinational Congress on Microscopy, August 23-28,2015,Eger, Hungary

Senay Topsakal, Ozlem Ozmen, Meltem Ozgocmen, Effect of alpha lipoic acid on high fructose corn syrup induced hepatic pathology,18th European Congress of Endocrinology, 28-31 may,2016, Munich, Germany

Dilek Bayram, Meltem Özgöçmen, İlkey Armağan, Mustafa Güneş The Apoptotic Effect of Silininin on TCC- SUB and RT - 4 Human Bladder Cancer Cells, , 2nd International Congress of Forensic Toxicology Industrial and Environmental Toxicology, Ankara, Turkey, May 26-30,2016 (sözlü bidiri)

Ulusal Kongrelerde Sunulan ve Özet Metin Olarak Yayınlanan Bildiriler

İ. Aydın Candan, Meltem Özgöçmen, Ayça Aksoy, Orhan Özatik , Meral Öncü, Erdal Karaöz, "Valproik Asitin Rat Mezenkimal Kök Hücrelerde Hücre Morfolojisi ve MMP-9 Ekspresyonu Üzerine Etkisi",28 Eylül- 2 Ekim 2011, KOCAELİ

Darici H. Candan İA. Özgöçmen M. Oncu M. "Erken Embriyonal Dönem Gelişim Aşamaları ve Etkili Sinyal Yolakları" 11th National Histology and Embryology Congress May 2012. Published as abstract in Cell and Tissue Biology Research Volume 3Supplement. p 115. 2012

Meltem Özgöçmen, Alpaslan Gökçimen, Meral Öncü, Mehmet Akdoğan, "Alkolik olmayan fare karaciğer yağlanmasında visfatin ve interlökin-6'nın etkisinin incelenmesi",11th National Histology and Embryology Congress May 2012. Published as abstract in Cell and Tissue Biology Research Volume 3Supplement. p 115. 2012

Candan İ.A, Oncu M. Özgöçmen M. Darici H.“Effects of Non-Steroid Antiinflammatory Drugs on Adhesion Molecules of Smooth Muscle Cells (Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Çizgili Kas Dokusundaki Adhezyon molekülleri Üzerine Etkisi)” 11th National Histology and Embryology Congress May 2012. Published as abstract in Cell and Tissue Biology Research Volume 3Supplement. p 115. 2012

D. Bayram, A.Gökçimen, M. Öncü, İ.A. Candan, M. Özgöçmen "Slybum marianum bitkisinin in vitro ortamda karaciğer kanseri hücre hatları üzerine etkisi" 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı). Mersin; 28-31 Mayıs 2013.

Armagan I, Bayram D, Candan IA, Armagan HH, Ozgocmen M, Metotreksat ile oluşturulan testis hasarı üzerine pentoksifilinin etkisinin incelenmesi, 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 mayıs 2014,Ankara, p: 096

Bayram D, Cetin SE, Kara M, Ozgocmen M, Candan IA, , Ozgocmen M,MCF-7 İnsan meme kanseri hücre hattı üzerine Silibinin etkisinin in vitro ortamda incelenmesi, 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 mayıs 2014,Ankara, p: 074

Dogan N, Akcam M, Koca T, Doguc KD, Ozgocmen M, Ratlarda parasetamole bağlı akut karaciğer toksisitesinde Capparis Ovata'nın koruyucu etkisi, 10. Ulusal Çocuk Gastroentereoloji Hepatoloji ve Beslenme Kongresi,30 Nisan- 3 Mayıs 2014, Malatya

Duygu Çalışkan, Tuğba Koca, Duygu Kumbul Doğuç, Meltem Özgöçmen, Mustafa Akçam, Ratlarda parasetamole bağlı akut karaciğer toksitesinde nar suyunun koryucu etkisi, Türk Pediatri Arşivi, 25.02.2016

ÖDÜLLER

11th National Histology & Embryology Congress, The Best Turkish Science Award, 2012. Meltem Özgöçmen, Alpaslan Gökçimen, Meral Öncü, Mehmet Akdoğan, "Alkolik olmayan fare karaciğer yağlanmasında visfatin ve interlökin-6'nın etkisinin incelenmesi"

Prof. Dr. Sezai Bedrettin Tümay Ödülleri Üçüncülük Ödülü. Nurcan Dogan, Mustafa Akçam, Tuğba Koca, Duygu Kumbul Doguç, Meltem Özgöçmen “Ratlarda Parasetamole Bağlı Akut Karaciğer Toksisitesinde Capparis Ovata'nın Koruyucu Etkisi”

ALINAN KURSLAR

Biyostatistik kursu, 2009, ISPARTA

Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Programı – Şubat 2010

XVI. Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Kasım 2011.

XVI. Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Flow sitometri sertifikası, KASIM,2011

KATILINAN KONGRELER, SEMPOZYUMLAR VE ORGANİZASYONLAR

2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Haziran 2008, ISPARTA

3rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Haziran 2010, ISPARTA

10.Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Mayıs, 2010, ÇEŞME /İZMİR
□ Kök Hücre Araştırmaları Kongresi. Ekim 2011, KOCAELİ

4rd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels. Haziran 2012, ISPARTA

11.Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Mayıs, 2012, DENİZLİ

Dünya Uyku Günü Sempozyumu (World Sleep Day Symposium), Mart 2014, ISPARTA

12. Ulusal Histoloji Ve Embriyoloji Kongresi, Mayıs, 2014, ANKARA

5th International Congress On Cell Membranes And Oxidative Stress: Focus On Calcium Signaling And TRP Channels, Mayıs2014, ISPARTA

2nd International medical student congress, May, 2014, ISPARTA

12th Multinational Congress on Microscopy, August, 2015, EGER/
HUNGARY

XXIV International Symposium on Morphological Sciences, September,
2015, ISTANBUL

13th National Histology & Embryology Congress. May 2016, ÇEŞME/
İZMİR

2nd International Congress of Forensic Toxicology May, 2016, ANKARA

BİLİMSEL ORGANİZASYONLAR

Uluslararası Kongre Organizasyonu: “2nd International Liver Symposium”.
Mayıs 2009.

Deney hayvanları kullanımı eğitim programı - Ocak, 2012/ ISPARTA

Deney hayvanları kullanımı eğitim programı – Kasım, 2013/ISPARTA

ÜYELİKLER

Türk Histoloji Ve Embriyoloji Derneği (THED)

KİŞİSEL İLGİ ALANLARI

Doğa sporları; bisiklet sürme, zumba