

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

***HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM* BİTKİSİNİN  
ANTI KANSER ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Mustafa Orhan TUNÇEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU**

**ŞANLIURFA  
2019**

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

***HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM* BİTKİSİNİN  
ANTI KANSER ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa Orhan TUNÇEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19063 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA  
2019

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

**JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

Mustafa Orhan TUNÇEL' in hazırladığı "**Haplophyllum Ptilostylum** Bitkisinin Anti Kanser Özelliğinin İncelenmesi" başlıklı çalışması 18/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN**

**Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU**

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

**ÜYE**

**Dr. Öğr. Üyesi Ataman GONEL**

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

**ÜYE**

**Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Abdullah YILMAZ**

Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasotik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.06/2019 tarih ve 2019.11/24. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**  
**Enstitü Müdürü**



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım süresince bilimsel anlamda her türlü yol göstericim olan, maddi manevi desteğini esirgmeden yardımcı olan saygı değer hocam, danışmanım Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU' ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca;

Saygı değer hocalarım Biyokimya Anabilim dalı Başkanı Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR ve Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL' e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hem hocamız hem abimiz olarak desteklerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Evren GÜMÜŞ' e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anımda yanımda olan desteklerini, sevgilerini her an hissettiğim canım annem Emine TUNÇEL ve babam Ömer TUNÇEL' e kardeşlerim Hatice DEMİR, Nedime TAŞ, Hülya TUNÇEL ve abim İbrahim Halil TUNÇEL' e sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca varlığı ve sevgisiyle hayatıma anlam katan sevgili nişanlım Neslihan AÇANAL' a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın yapılması aşamasında laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Hasine YEL, Uzm. Özgür YÜKSEKDAĞ ve Öğr. Gör. Ebru TEMİZ' e teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım Adem İNCO, Öğr. Gör. Mehmet RAMAT, Öğr. Gör. Kadir EĞİ, Uzm. Mehmet ENEŞ, Uzm. Derya AKÇİÇEK' e teşekkür ederim.

Mustafa Orhan TUNÇEL

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	v
SİMGE VE KISALTMALAR .....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanserın Tanımı.....	3
2.2. Karaciğer Kanserı.....	5
2.2.1.Hepatoselüler karsinoma (HCC) .....	7
2.2.2.Hepatit B virüsü (HBV).....	8
2.2.3. Hepatit C virüsü (HCV).....	9
2.2.4. Aflatoksin.....	9
2.2.5. Alkol .....	10
2.3.Kanserın Tedavi Yöntemleri.....	10
2.3.1. Cerrahi yöntem .....	10
2.3.2. Kemoterapi.....	11
2.3.3. Radyoterapi .....	11
2.3.3.Bitkisel tedavi.....	12
2.4. <i>Haplophyllum Ptilostylum</i> (Tüylü Sedo).....	13
2.4.1. <i>Haplophyllum</i> üzerinde yapılan çalışmalar.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Bitki Ekstreerinin Hazırlanması.....	18
3.2. Hücre Kültürü ve Metotları .....	18
3.2.1. Hücrelerin bakımı.....	20
3.2.2. hücrelerin pasajlanması ve dondurulması.....	20
3.3. Bitki ekstrelerinin uygulanması ve apoptotik etkilerinin saptanması .....	20
3.3.1. Hücre sayımı .....	20
3.3.2. Bitki ekstrelerinin uygulanması .....	21
3.3.3. MTT yöntemi ile sitotoksik etkinin belirlenmesi.....	21
3.4. Apoptotik Etkinin Belirlenmesi .....	22
3.4.1. Acridine Orange /Ethidium Bromide floresan boyama metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi.....	22
3.4.2. Apoptotik etkinin Annexin V ile flow sitometrik incelenmesi .....	22
3.4.3. Apoptotik etkinin cell cycle (hücre döngüsü) ile flow sitometrik incelenmesi.....	23
3.4.4. Mitokondriyal membran potansiyeli (JC-I) ölçümü.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi .....	25

4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Metodu .....	26
4.3. Flow Sitometrik Annexin V PI Apoptoz/Nekroz Analizi .....	27
4.4. Cell Cycle (Hücre Döngüsü) kiti ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi .....	30
4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi .....	31
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>33</b>
<b>6.KAYNAKLAR</b> .....	<b>38</b>
<b>7. EKLER</b> .....	<b>45</b>
7.1. Etik Kurul .....	45
7.2. Orjinallik Beyan Raporu.....	46
7.3. Turnitin .....	47
7.4. Tez Veri Giriş Formu .....	48



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Kanser oluşum aşamaları.....	4
Şekil 2.2. Uluslararası kanser araştırma ajansı (IARC) tarafından yayınlanan globacan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen kanser türünün dağılımı .....	5
Şekil 2.3. Karaciğer organının insan vücudundaki yeri.....	5
Şekil 2.4. Kanser oluşum aşamaları.....	7
Şekil 2.5. <i>H. Ptilostylum</i> taksonunun a: Genel görünümü, b: Çiçek, c: Kapsül .....	14
Şekil 2.6. Şanlıurfa’da bulunan <i>H. Ptilostylum</i> bitkisi .....	16
Şekil 2.7. <i>Haplophyllum Ptilostylum</i> bitkisinin ülkemizdeki yayılışı .....	16
Şekil 4.1. <i>H. ptilostylum</i> diklorometan ekstresinin SNU-423 hücresi üzerindeki sitotoksite (MTT) sonucu.....	25
Şekil 4.2. <i>H. ptilostylum</i> diklorometan ekstresinin HUVEC hücresi üzerindeki sitotoksite (MTT) sonucu.....	26
Şekil 4.3. SNU-423 hücresinin acridine orange /ethidium bromide ve morfoloji görüntüleri .....	27
Şekil 4.4. HUVEC hücresinin acridine orange /ethidium bromide ve morfoloji görüntüleri .....	27
Şekil 4.5. SNU-423 hücresinin Annexin V analiz sonuçları.....	28
Şekil 4.6. HUVEC hücresinin Annexin V analiz sonuçları .....	29
Şekil 4.7. SNU-423 hücresinin cell cycle analiz sonuçları .....	30
Şekil 4.8. HUVEC hücresinin cell cycle analiz sonuçları .....	31
Şekil 4.9. SNU-423 hücresinin JC-1 analiz sonuçları .....	32
Şekil 4.10. HUVEC hücresinin JC-1 analiz sonuçları.....	32

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 4.1.</b> Hücrelerin IC <sub>50</sub> değerleri.....	<b>Sayfa No</b> 25
--	-----------------------





## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AFB</b>	: Aflotoksin B1
<b>CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub></b>	: Diklorometan
<b>DMEM F-12</b>	: Dulbeccos Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12
<b>DMSO</b>	: Dimetilsülfoksit
<b>DNMTs</b>	: Dna metiltransferaz
<b>HBV</b>	: Hepatit b virüsü
<b>HCC</b>	: Hepatoselüler karsinoma
<b>HCV</b>	: Hepatit c virüsü
<b>IARC</b>	: Uluslararası kanser araştırma ajansı
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Sitotoksik doz
<b>JC-1</b>	: Mitokondriyal membran potansiyeli
<b>MTT</b>	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PI</b>	: Propidium iodid
<b>Rb</b>	: Retinoblastoma
<b>WHO</b>	: Dünya sağlık örgütü

## ÖZET

### ***HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM* BİTKİSİNİN ANTI KANSER ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**MUSTAFA ORHAN TUNÇEL**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi**

Günümüzde ölüme neden olan kanserler içinde karaciğer kanseri erkeklerde 2. kadınlarda ise 6. sırada görülmektedir. Karaciğer kanserinin en yaygın tipi olan Hepatoselüler Karsinoma (HCC) etkin bir tedavisi bulunmamaktadır. HCC' da uygulanan kemoterapi tedavisi genellikle metastatik ve tekrarlayan hastalıklar için kullanılmakta iken verilen doksorubisin, platinum, floropirimidin ve gemsitabin gibi terapötik ajanlar tek başlarına kullanıldıkları takdirde %10'dan az yanıt sağlayabilirken bu ilaçlar kombine şekilde uygulandıkları zaman ise tedavi ancak %20 civarında yanıt verilmektedir. HCC tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının yan etkilerinden dolayı sınırlı düzeyde olmakta bu nedenle yeni alternatif tedavi yöntemleri üzerinde araştırmalar yapılmaktadır.

Alternatif tedavi yöntemleri arasında da yan etkilerinin az olması nedeniyle bitkisel tedavi yöntemleri ilk sırada yer aldığı ve kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olduğu gözlenmektedir. Kanser tedavisinde klasik olarak kullanılan ve yan etkileri oldukça fazla olan kemoteraplara alternatif olabilecek bitki kaynaklı yeni bileşiklerin tespiti için yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Bu çalışma Şanlıurfa'da endemik olarak yetişen *Haplophyllum ptilostylum* bitkisinden elde edilen ekstrenin karaciğer kanser hücresi (SNU-423) üzerindeki antikanser aktivitesini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada bitki ekstresinin normal ve kanser hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi MTT, apoptotik etkisi (flow sitometrik Annexin V ve acridin oranhe /ethidiumbormide boyama) hücre döngüsü üzerindeki etkisi flow sitometrik ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisi ise JC-1 yöntemiyle incelenmiştir.

Çalışma sonucunda bitki ekstresinin karaciğer kanser hücresi (SNU-423) üzerindeki sitotoksik dozunun (IC<sub>50</sub>: 3,55 µg/ml) normal hücreler üzerinde toksik etki göstermediği gözlenirken, SNU-423 hücrelerinde hücre döngüsünü SubGo aşamasında durdurduğu, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *Haplophyllum ptilostylum* bitkisinin antikanser potansiyeline sahip olduğu, bu nedenle bu bitki ekstresinin kanser tedavisinde kullanılacak yeni özgün etkin maddelerin tespitine yönelik yeni çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler;** Karaciğer kanseri, *Haplophyllum ptilostylum* L., apoptozis, antikanser

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTI CANCER PROPERTIES OF *HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM* PLANT

MUSTAFA ORHAN TUNÇEL

Medical Biochemistry Department, Master Thesis

Nowadays, among the cancers that cause death, liver cancer is the second in males and 6th in females. There is no effective treatment for hepatocellular carcinoma (HCC), the most common type of liver cancer. Chemotherapy treatment in HCC is generally used for metastatic and recurrent diseases, whereas therapeutic agents such as doxorubicin, platinum, fluoropyrimidine and gemcitabine can provide less than 10% response when used alone, but when these drugs are administered in combination, treatment is only responded to around 20%. Because of the side effects of chemotherapy and radiotherapy applications in HCC treatment is limited, therefore, new alternative treatment methods are being researched.

It is observed that herbal treatment methods take the first place among the alternative treatment methods due to the low side effects and have an important place in cancer treatment. Intensive research is being carried out for the detection of new plant-derived compounds that can be used as an alternative to chemotherapies which are used in cancer treatment and have high side effects. This study was conducted to investigate the anticancer activity of the extract obtained from *Haplophyllum ptilostylum* plant which is endemic in Şanlıurfa on liver cancer cell (SNU-423).

In this study, the cytotoxic effect of plant extract on normal and cancer cell MTT, apoptotic effect (flow cytometric Annexin V and acridin oranhe / ethidiumbormide staining) on the cell cycle effect on flow cytometric and mitochondrial membrane potential was investigated by JC-1 method.

As a result of the study, it was observed that the cytotoxic dose ( $IC_{50}$ : 3,55 g / ml) of plant extract on liver cancer cell (SNU-423) showed no toxic effect on normal cells. It was.

In this study, it has been concluded that *Haplophyllum ptilostylum* has anticancer potential and therefore new studies should be conducted to determine new specific active substances that can be used in cancer treatment of this plant extract.

**Keywords;** Liver cancer, *Haplophyllum ptilostylum* L., apoptosis, anticancer

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, Yunanca karkinos kelimesinden köken alan bir kelime olup dünya genelinde kardiyovasküler hastalıkların ardından ölüme sebebiyet veren ikinci hastalık olarak görülmektedir. Yapılan araştırmaların sonrasında Amerika'da yaşayan erkek bireylerin yarısının ve kadınların ise üçte birinin yaşamları boyunca bir defa kansere yakalandığı gözlemlenmiştir (1).

Normal hücrelerin büyümesi ve bu hücrelerin çoğalması belirli bir düzen içinde olurken kanser hücrelerinde durum farklıdır. Normal hücrelerde dokular ve organlar işlevlerini normal düzende yerine getirirken, meydana gelen bir hasar sonucu hücrelerin normalin üzerinde bir hızla büyümeye başlamakta ve düzensiz çoğalmaya göstermektedirler. Bu şekilde düzensiz büyüyen hücrelerin tümör adını verdiğimiz hücre kitlesinin oluşmasına neden olduğu görülmektedir.

Tümörler; benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) tümörler adını almaktadırlar. Benign tümörlerde, hücreler kontrolsüz olarak çoğalırken çevre dokulara yayılım gözlenmemektedir (2). Malign tümörlerde ise diğer dokulara metastaz (yayılma) eğilimi göstermektedirler. Malign hücreler, hızla çoğalma özelliklerinin yanında genetik yapılarında da bozulma meydana gelmiştir ve bu nedenle anormal proteinler üretmektedirler. Bu özellikleri ile diğer hücrelerden ayırt edilmektedirler (3).

Amerikan Kanser Derneğinin 2008 yılında yaptığı araştırmalar sonucunda kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en sık görülen hastalıklar arasında gösterilen karaciğer kanseri tanısı alan 21.370 kişinin olduğunu tahmin edilmektedir (4).

Karaciğer kanseri, dünyada erkekler arasında en çok görülen 5. Kanser tipi olup, kanser ölümlerinde 2. sırada yer almaktadır. Kadınlarda ise 7. sırada yer alırken ölüme sebebiyet veren kanser türleri arasında 6. sırada yer almaktadır (5).

Kanser tedavisinde tedaviyi kısıtlayan en önemli faktörlerden biri tedavi için kullanılan kemoterapötik ajanların kanserli dokuya özgün olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerine özgün yeni moleküllerin tespit edilmesine yönelik yapılan yeni çalışmalar her geçen gün artış göstermektedir.

Kanser tedavilerinde amaçlanan; bireyin kendi ailesinin yaşamını tehdit eden hastalığı ve bu hastalığın tedavisine bağlı olarak görülen etkilerini kontrol ederek, yan etkilerin risk oranını düşürmek ve bireyin hayat kalitesini arttırmaktır. Kanserde sıklıkla uygulanan tedavi yöntemleri cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapidir (6).

Organ nakli ve kemoterapi gibi kanser tedavilerinde başarının düşük olması, hastalığın çoğunlukla tekrar etmesi veya çeşitli yan etkilerinin ortaya çıkması dolayısı ile toksik etki göstermediği bilinen aynı zamanda etki mekanizmaları önceden belirlenmiş olan bitkilerden elde edilen maddeler kullanılarak kanser tedavisine yeni ve destek terapi yolları aranmaktadır (6,7).

Son zamanlarda şifalı bitkiler tedavi edici etkileri sebebiyle büyük ilgi görmektedirler. Özellikle son yıllarda kanser hastalığının tedavisinde tamamlayıcı rolü ve alternatif ilaç potansiyelinin bulunduğu tıbbi bitkiler üzerindeki araştırmalarda artış görülmektedir. Bu amaç ile son yapılan araştırmalarda farklı kanserlere karşı doğal, sentetik kökenli ve bitkisel kökenli ilaçların anti kanser etkileri incelenmeye başlanmıştır.

Haplophyllum ptilostylum (Tüylü sedo) çok yıllık bir bitki olup 15-45 cm boylarında, tabanda dallanmış birkaç gövdeden veya tek gövdeden oluşan bir bitki olarak endemik bir türdür. Haplophyllum ptilostylum içeriği üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli lignan türevleri (8,9), coumarinler, steroller, flavonoidler (10), ve çeşitli alkaloid türleri içerdiği tespit edilmiştir (8,11).

Bu tez çalışmasında ilk defa Haplophyllum ptilostylum bitkisinin diklorometan ektresinin karaciğer kanser hücresi SNU-423 üzerindeki kanser etki ve etki mekanizması incelenerek, kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyeli araştırılmıştır. Karaciğer hücrelerine Haplophyllum Ptilostylum bitkisinin diklorometan ektresini belirlenen dozlarda uygulayarak sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlendi. Sitotoksik etkisi belirlenen maddemizin apoptotik etkiliğinin morfolojik olarak da tespit edebilmek için hücreler Acridin orange/Ethidium bromide ile ikili boyamaya tabi tutularak apoptotik etki floresan mikroskopta incelendi. Ardından elde edilen IC<sub>50</sub> konsantrasyonları kullanılarak hücrelerin apoptotik etkinliği Annexin V testi, Cell cycle testi, JC-1 testi ile flowsitometrik yöntemlerle belirlendi.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanserin Tanımı

Kanser hastalığı, dünya genelinde kardiyovasküler hastalıkların ardından ölüme sebep olan hastalık olarak 2. sırada yer almaktadır. Yunanca kökenli olan karkinos kelimesinden türemiştir. Amerika'nın erkek bireylerinin neredeyse yarısının ve kadınlarının ise üçte birinin hayatları boyunca bir kere kansere yakalandığı gözlenmiştir (1).

Normal hücrelerin büyümesi, çoğalmasının belirli bir düzeni varken kanser hücrelerinde durum farklı olmaktadır. Normal hücrelerde organlar görevlerini doğal olarak yerine getirirken, meydana gelen bir hasar sonucu hücrelerin anormal bir büyüme ve çoğalmaya meyil ettiği görülmektedir. Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran önemli özellikleri bulunmaktadır. Kontakt inhibisyonundan kaçmak, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsız olmak, bölünebilmek için dış uyarılara gereksinim duymamak, apoptozisten kaçabilmek, anjiyogenezi uyarabilmek ve metastaz yapabilmek bu özellikler arasında yer almaktadır (12).

Bu şekilde düzensiz büyüyen hücreler tümör adı verilen kitle oluşumuna neden olmaktadır. Tümörler; iyi huylu tümörler (benign) ve kötü huylu tümörler (malign) olarak iki grupta incelenmektedir.

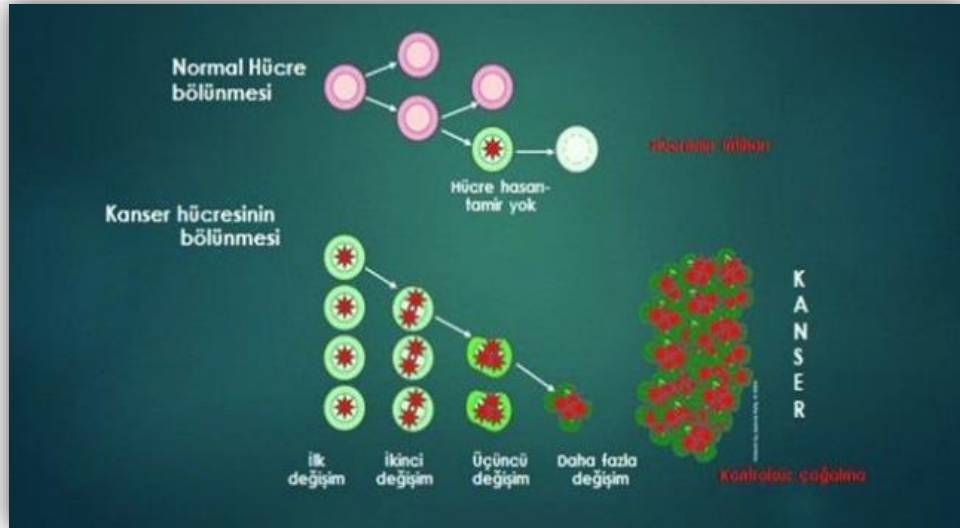
Benign tümör yapısında, hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı ancak farklı dokulara yayılmadığı görülmektedir. Malign tümör yapısında ise diğer dokulara yayılma olduğu ve diğer dokuların normal hücrelerinin yaşamını bozarak metastaz yapma eğiliminde olduğu görülmektedir. Malign hücreler normal hücrelere kıyasla daha hızlı bölünme özelliklerine sahiptirler, bakıldığında genetik yapılarının bozulmasına bağlı olarak anormal protein ürettikleri görülür. Bu özellikleri diğer hücrelerden ayırt edilebilmelerini sağlamaktadır (3).

Hücrelerin büyümesinde, farklılaşmasında aynı zamanda çoğalmasında rol alan protoonkogenlerde görülen mutasyonlar tümör oluşumuna neden olmaktadır. Aynı

zamanda tümör baskılayıcı genlerde mutasyon meydana gelmesi sonucunda hücre döngüsünün inhibisyonu engellenerek anormal hücre büyümesine görülmektedir (13).

Kanserin oluşum sürecinde hasar gören DNA'nın onarım işlemi gerçekleşmediğinde hücreler hasarlı DNA ile çoğalmaya devam etmektedir ve oluşan yeni hücelere hasarlı DNA aktarılmaktadır (14). Başlangıçta hücrelerde orantılı hücre bölünmesi gerçekleşmektedir bu farklılaşmış yeni hücrelerin tersine birbirine benzeyen iki yavru hücre oluşumunu tetiklemektedir. Oluşan hücreler diğer hücreler tarafından baskılanabilirse tümör oluşu engellenmektedir. Ayrıca diğer hücrelerin baskılayıcı etkisini yok eden ajanlar tetiklendiğinde farklılaşmayan başlangıç hücreleri çoğalmaya başlayarak dokuda birikmektedir. Bu evre yükselme evresi olarak isimlendirilmektedir (15).

Başlangıç hücrelerinde ki genetik ve epigenetik farklılaşmaların meydana gelmesinin ardından başlangıç hücreleri birikerek diğer doku ve organlara metastaz yapabilmektedir. Bu aşamaya ilerleme aşaması adı verilmektedir (16). İlerleme aşamasında olan hücreler proliferasyon uyarısından bağımsız olmaktadır. Bu aşamada hücrelerin gelişim, invazyon, metastaz, anjiyogenez, morfolojik, biyokimyasal, metabolik özelliklerinde değişim meydana gelmektedir (17).



Şekil 2.1. Kanser oluşum aşamaları (17)

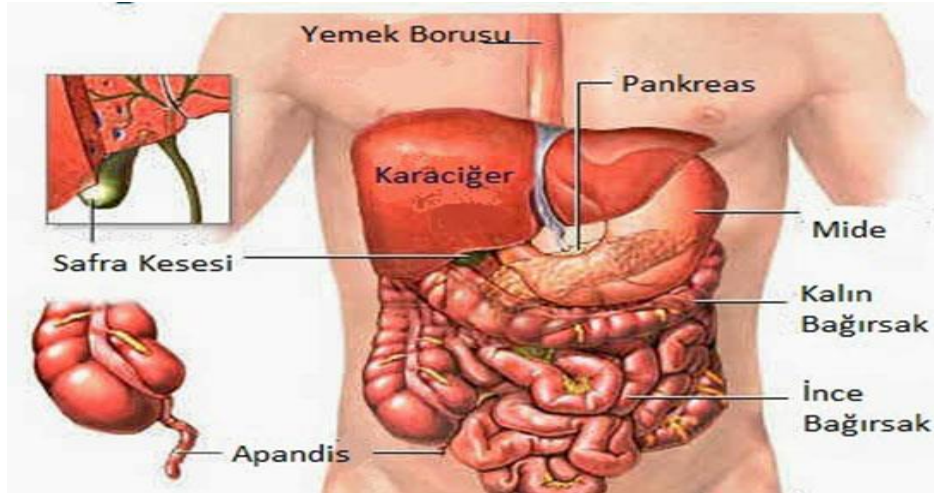
Türkiye Sağlık Bakanlığının yayınladığı 2015 Kanser İstatistik Verilerinde yer alan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IARC) yayınladığı GLOBOCAN 2012 verilerinde erkek bireylerde en çok görülen ilk beş kanser türünün dağılımına bakıldığında zaman; ülkemizde akciğer kanseri ilk sıralarda bulunmaktadır. Dünyada ise erkeklerde görülen kanser türleri arasında prostat kanseri ilk sırada yer alırken bu sıralamayı akciğer kanseri, kolorektal, mide, mesane ve karaciğer kanserleri takip etmektedir. Dünyada kadınlar arasında en fazla görülen kanser türleri arasında ise karaciğer kanseri 7. sırada yer almaktadır (18).

	Türkiye*	Dünya	IARC'a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

Şekil 2. 2. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan globocan 2012 verilerine göre erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı

## 2.2. Karaciğer Kanseri

Karaciğer organı; karın bölgesinin sağ üst köşesinde bulunan vücut için önemli fonksiyonları bulunan iç organımız olup kaburgaların altında yer almaktadır. Karaciğerin ağırlığı yaklaşık 1300-1600 gr kadardır. Kahverengi tonuna yakın kırmızı renkli bir organdır. Lastik kıvamındadır ve şekli nerdeyse piramit gibi görünmektedir. Sağlıklı olan bireylerde göğüs kafesinin boşluğunun altına dokunulduğunda hissedilebilmektedir (14).



Şekil 2. 3. Karaciğer organının insan vücudundaki yeri (20)



Karaciğer, dört bölümden oluşmaktadır. Karaciğere iki yönde kan akışı sağlanmaktadır. Portalven adında ki toplardamarın mideden ve dalaktan getirdiği temiz olmayan kanı sol loba taşırken, hepatic arter adında ki karaciğer atar damarı ile de temiz kanı sağ loba yönlendirmektedir. Karaciğere gelen temiz kan ve kirli kan burada bir araya gelerek karaciğere girmelerine rağmen karaciğerdeki loblar yardımı ile buradan karışmadan ayrılmaktadırlar (19).

Karaciğerde kan sıvısının depolanması sırasında, kan basıncında meydana gelen ufak artış yardımı ile 400 ml kadar kan sıvısı burada depolanmaktadır. Karaciğer kanı depolamasından dolayı kan deposu olarak da bilinmektedir. Safra kesesinin görevini yapmasında önemli rolü olan karaciğer bu kesede kanın depolama işlevini devam ettirmesine yardımcı olmaktadır (19).

Karaciğer kan şekeri seviyesinin normal olmasını sağlamak için vücutta bulunan fazla kan şekerinin depolamakta ve bu şekilde kan şekeri seviyesini ayarlamaktadır. Karaciğer aynı zamanda karbonhidrat ve proteinlerin yağa dönüştürülmesi, yağların yıkımı ile açığa çıkan enerjinin çıkmasına yardımcı olmaktadır (19).

İnsan karaciğeri her ne kadar kendini yenileyebilme özelliğine sahip ise de karaciğerde tümör oluşumu görülmektedir. Karaciğerde tümör oluşumu karaciğer kanseri olarak tanımlanmaktadır. Karaciğer kanseri belirtileri; en belirgin özelliği karın bölgesinde sağ kürek kemiğine yakın olan üst kısmında ve sırt bölgesinde meydana gelen şiddetli ağrılar olarak tanımlanmaktadır. Bu belirtiler arasında açıklanamayan kilo kaybı, halsizlik veya yorgunluk, vücudun sağ tarafında bulunan kaburgaların hemen altında meydana gelen sert yumrular şeklinde tanımlanmaktadır (19,21).

Karaciğerde görülen kötü huylu tümörler, temelde adenokarsinoma (metastaz özelliği olmayan) olup, en önemli iki türü hepatoselüler karsinoma ve kolanjiokarsinomalar olmaktadır. Karaciğer kanserlerinin histolojik açıdan sınıflandırılması aşağıdaki şekildedir.

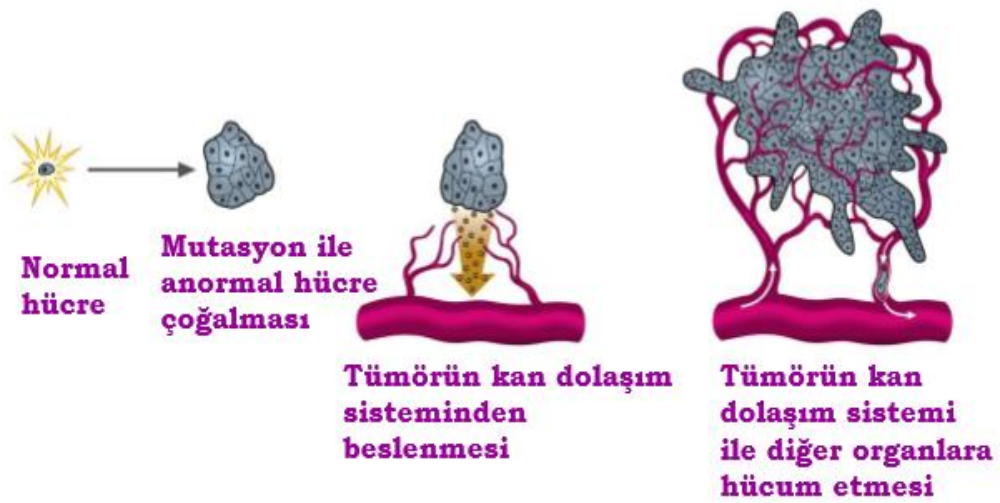
- ✓ Hepatoselüler Karsinom (karaciğer hücre karsinomu)
- ✓ Hepatoselüler Karsinom- Fibrolamellar tipi (Kadınlarda daha yaygındır)
- ✓ Kolanjiokarsinom (İntra ve ekstrahepatik safra kanalı karsinomu)

- ✓ Karışık Tipli Hepatoselüler Kolanjiokarsinom
- ✓ Farklılaşmanın Görülmediği Diğer Tipler
- ✓ Hepatofibrom (pek rastlanmamaktadır) (21).

### 2.2.1. Hepatoselüler Karsinoma (HCC)

Hepatoselüler Karsinoma (HCC), karaciğer kanserlerinde primer karaciğer kanserlerinin neredeyse %80-90'nını oluşturmaktadır. HCC dünya genelinde en yaygın altıncı kanser türü olarak görülürken, ölüme sebebiyet veren kanserler arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Gelişmiş ülkelerde, karaciğer kanserinin sebeplerinin %23'ünü HBV (Hepatit B Virüsü) enfeksiyonu oluşturmakta iken, %20'sini HCV (Hepatit C Virüsü) enfeksiyonları oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerinde toplam karaciğer kanseri vakalarının %60'ını HBV enfeksiyonları %33' lük kısmını ise HCV enfeksiyonları teşkil etmektedir. Kronik HBV enfeksiyonların da aflatoksin B1 (AFB) arasındaki etkileşimin de karaciğer kanserini arttırdığı gözlenmiştir (5).

Amerika ve diğer Batı ülkelerinde, alkole bağımlı sirozun ve alkolden bağımsız karaciğer yağlanması, karaciğer kanserinin en temel nedenleri olduğu düşünülmektedir. Obezite salgını ve enjeksiyonlu ilaç kullanıcıları arasındaki devam eden bulaşma nedeniyle artan hepatit-c virüsü enfeksiyonlarından dolayı karaciğer kanserinin görülme sıklığı Amerika ve Orta Avrupa da dahil olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde artmaktadır (5).



Şekil 2.4. Kanser oluşum aşamaları (12)

Kalıtsal ve metabolik bir hastalık olan HCC oluşumu hücrelerde genomik ve proteomik değişimlere sebebiyet vermekle birlikte çok az bir kısmı HCC' ye sebebiyet vermektedir. Kronik hepatit ve siroz olan karaciğerlerde DNA metiltransferazların (DNMTs) anlatımlarında artış meydana geldiği görülmektedir. Aflatoksinle çok fazla maruz kalan kişilerin p53 geninde spesifik mutasyonlar görülmekte ve bu mutasyonlar karaciğer kanserinde rol oynayan *Aspergillus flavus* türlerinin ürettiği aflatoksinlerle yakından ilişkilendirilmektedir (22).

Aynı zamanda HCC oluşumu gözlenen hastaların hücre döngüsü incelendiğinde %34' ünde siklin D1 gen ifadesindeki değişimler görülmektedir. Hastaların %30' unda ise Rb (retinoblastoma) geninde kayıplar olduğu gözlemlenmektedir (22).

Hepatositlerde apoptoz giden hücrelerde meydana gelen azalma, hücrelerin sağ kalımlarına ve böylelikle hücre içi moleküler anomaliler içeren hücrelerde artışa ve neoplastik değişimlere sebep olduğu görülmektedir. Anti apoptotik Bcl-XL geninin HCC' da predominant gen olduğu gözlenmektedir. Bcl-XL geni azalan hepatoblastoma hücrelerinin kemoterapik ilaçlara hassasiyetinde artışa sebep olmaktadır (22).

Hepatoselüler karsinoma da risk faktörleri; hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), alkol ve aflatoksindir.

### **2.2.2. Hepatit B Virüsü (HBV)**

Hepatit B virüsü dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişiyi enfekte edebilmektedir. HBV enfeksiyonu HCC' nin ana etmenlerinden olup, coğrafi dağılımı itibarıyla da HCC ile aynıdır (23). HBV' nin Asya, Afrika ve Batı Pasifiğin belirli bölgelerinde %8' e yakın olmasına rağmen Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya da %2' den düşük olduğu gözlenmiştir (24). HCV' nin aksine, HBV hepa dna virüs ailesinden olup tek zincirli DNA virüsüdür. Kendi DNA'sını konak DNA'sına entegre edebilmektedir.

HBV DNA'sının entegrasyonu proto-onkogenleri aktive edilebilmektedir ya da büyümeyi düzenleyen genleri baskılanabilmektedir (25). HBV X geni HCC oluşumu ve HBV enfeksiyonun da rol oynayan HBV X proteinini kodlamaktadır. Bu protein insan hepatositlerinde c-myc ve c-myb gibi onkogenler ve p21, APC ve p53 gibi tumor-

baskılayıcı genleri etkileyen bir transkripsiyon faktörüdür (26). Teşhisi konulan HCC'lerin %80'ninin HBV enfeksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir ancak kronik HBV taşıyıcılarının sadece küçük bir kısmında HCC görülmesi nedeniyle diğer faktörlerinde HCC oluşmasında ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (27).

### **2.2.3. Hepatit C Virüsü (HCV)**

Hepatit C virüsü çoğu batı ülkelerinde kronik karaciğer hastalıkları ve HCC' nin temel sebebi olarak görülmektedir. HCV enfeksiyonu, genellikle damar-içi uyuşturucu kullanımı, cinsel ilişki yoluyla gerçekleşmektedir. Amerika da ki HCV enfeksiyonlarının %85 kadarını oluşturmaktadır. Asya da ve Afrika da olguların sadece %20'si HCV enfeksiyonu ile ilişkilidir, çoğunlukla HBV zeminindeki kronik hepatit ve sirozdan kaynaklandığı gözlenmiştir (28).

HCV flaviviridae ailesinden bir RNA virüsü olup, reverse transkriptaz aktivesi bulunmamaktadır ve konak genoma kendisini entegre edememektedir (29.30). HCV' nin çekirdek proteininin (HCV core protein), proto-onkogen olan c-myc proteini dahil farklı genler üzerinde transkripsiyonel kontrole sahip olduğu düşünüldüğü gibi normal hücre gelişiminin bozulmasında da etkisi olduğu düşünülmektedir. HCV çekirdek proteininin karsinojenik etkisinin apoptoz indükleyicisi olan Fas, tümör nekrosis faktör-alfa'yı (TNF- $\alpha$ ) inhibe edebilme yeteneğinden ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (31).

### **2.2.4. Aflatoksin**

Doğal karsinojen olarak kabul edilen aflatoksin *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilmektedir (23). Sıcak ve nemli koşullarda saklanan tahılların küf oluşturması sonucu görülmektedir ve zehirlidirler.

Aflatoksin B1'in p53 mutasyonuna ve HRAS gibi onkogenlerin mutasyonel aktivasyonun da etkili oldukları gözlemlenmiştir (32). Aflatoksin B1 ve HBV enfeksiyonunda etkili olmaktadır. Bu ajanlara maruz kalan bireylerde sadece bir ajana maruz kalan bireylere oranla HCC gelişme riski 5-10 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (33). Aflatoksine maruz kalan Çin, Senegal ve Afrika ülkelerinde yaşayan HCC

hastalarının %20-75' i p53 geninde spesifik bir mutasyonuna sahip oldukları görülmektedir (34).

### **2.2.5. Alkol**

HCC' nin risk faktörleri arasında yer alan kronik ve aşırı alkol tüketimi arasındaki güçlü korelasyon yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Aşırı alkol tüketimi karaciğere oksidatif stres mekanizması ile zarar vermektedir (35). Kronik ve aşırı alkol tüketimi inflamatuvar sitokinlerin üretimi aracılığıyla monosit aktivasyonuna sebep olarak hepatositlerin sağ kalımı üzerinde etkili olan endotoksin ve aktif kupffer hücrelerinin çoğalmasını uyarmaktadırlar. Bu olay sonucunda hepatositler üzerinde sitotoksik etki meydana gelirken stellate hücre aktivasyonu, karaciğer sirozunu ve HCC' ye sebebiyet vermektedir (36).

### **2.3. Kanserin Tedavi Yöntemleri**

Kanser tedavisi; kanserli bireyin ve ailesinin yaşamını tehdit eden hastalığı ve hastada tedaviye sürecinde ortaya çıkan belirtileri kontrol altına almak, ortaya çıkan belirtilerin kötü etkilerini en aza indirmek ve hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır (37).

Kanser hastaları için zorlu, masraflı ve uzun süren kanser tedavisi klinik olarak cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi 3 tip yaklaşımdan oluşmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde; gen tedavisi, immünoterapi, antikor tedavisi ve kanser aşılı gibi yeni tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır (37).

#### **2.3.1. Cerrahi Yöntem**

Kanser tedavi yöntemlerinden birincisi cerrahi yöntemdir. Cerrahi yöntem kanser tedavilerinde tümörlü bölgenin cerrahi müdahale ile çıkarılması şeklinde gerçekleştirilen bir yöntemdir. Genellikle cerrahi müdahalenin mümkün olduğu kanserli hastalarda başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Fakat cerrahi müdahale işlemindeki başarısızlık sonucu tümörlerin tekrar oluşumunun yanı sıra metastatik yayılımları gözlenmektedir (21).

Karaciğerin bir bölgesinin cerrahi operasyon ile kaldırılması işlemini "hepatektomi" olarak tanımlanmaktadır. Hepatektomi işlemi; kanserin karaciğerin bir kısmında görülmesi ve karaciğerin işlevini iyi bir şekilde yerine getirebiliyor olması

durumunda başvuru bir operasyondur. Karaciğerin geri kalan kısmı tüm fonksiyonları devralmaktadır. Karaciğer birkaç hafta içerisinde normal boyutuna gelebilmektedir. Fakat hastada siroz gelişmiş ise, tümör küçük bile olsa hepatektomi yeterli ve mümkün olmayabilmektedir. Karaciğer hastalarına aynı zamanda karaciğer nakli de yapılabilmektedir. Karaciğer transplantasyonu olarak adlandırılan nakil işlemi bazı durumlarda gerekli olabilmektedir. Bu tedavide prosedür kanserin karaciğerin dışına yayılmamış olması durumunda mümkün olabilmektedir (19,21).

### **2.3.2. Kemoterapi**

Bir diğer tedavi şekli ise kemoterapi olarak adlandırılan; kanser tedavisine uygun olarak belli dozlarda hastaya kan dolaşımı aracılığıyla verilerek vücudunun tüm bölgelerine yayılan, vücuttaki tüm dokuları etkileyen ilaçla tedavi yöntemidir. Kemoterapi yöntemi cerrahi müdahale ve radyoterapi gibi yerel tedavi amaçlayan tedavilerden farklı olan kemoterapide amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek sitotoksik etki sağlamaktır.

Genellikle hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını sağlayan metabolik olayların durdurulması ve böylece kanserli hücrelerde ki artışın önlenmesi amaçlanmaktadır (38). Bu kemoterapik ilaçlarda hedef sadece malign hücrelerin bölünme ve çoğalmasını önlemektir. Günümüzde kullanılan birçok kemoterapik ilaçların istenildiği gibi sadece kanserli hücreye spesifik etki etmediği aynı zamanda bölünmekte olan bütün normal hücreleri etkilediği bilinmektedir (38,39).

### **2.3.3. Radyoterapi**

Kanser tedavi yöntemlerinden olan radyoterapi, tümörün bulunduğu bölgedeki kanserli hücrelerin yüksek radyasyon kullanılarak öldürülmeye çalışıldığı tedavi yöntemlerindedir. Şiddetli radyasyon verilen radyoterapi yönteminde sağlıklı dokular mümkün olduğunca korunmaya çalışılsa da radyasyon tümöre ulaşırken tümörlü dokunun çevresinde bulunan sağlıklı dokulara temas edebilmektedir. Vücutta bulunan sağlıklı hücreler X ışınlarını daha rahat tolere edebilirken diğer hücrelerin toleransı derecesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Vücuttaki normal hücrelerde DNA tamir mekanizması daha aktif çalışmaktadır ve hücrelerde ki çoğalma mekanizmaları normal çalışmaktadır

(38, 40). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan yeni yöntemlerden olan gen tedavisi, immünoterapi, antikor tedavisi ve kanser aşısı gibi yöntemlerde kanser tedavisinde umut verici tedavi yöntemleri olarak görülmektedirler (38,40).

#### **2.3.4. Bitkisel Tedavi**

Bitkilerle tedavi (Fitoterapi); çeşitli hastalıklarda tedavi edici etkiye sahip olan bitkilerin taze halleri, kurutulmuş hallerini veya bu bitkilerden elde edilen ekstraksiyonların kullanılması ile üretilen çayların, drajelerin, kapsüllerin, tabletlerin hastalık tedavisinde kullanılması işlemi olarak adlandırılmaktadır. Yapılan birçok araştırma insan, doğa ve çevre sağlığı için fitoterapinin gerekli bir yöntem olduğunu göstermektedir. İnsanlık için bitkiler yıllardan beridir en seçkin ilaç kaynakları arasında yer almaktadır. Ancak son yıllarda bitkilerle tedavi yöntemleri geleneksel yöntemlere oranla daha fazla önem kazanmasına bitkilerin yeni formlarla sunulmasının da rolü bulunmaktadır (41).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaptığı bir çalışmada dünya nüfusunun nerdeyse %60'nın sentetik ilaçlardan çok geleneksel kültürlerinde yer alan bitkisel özüt içeren ilaçlara daha çok güvendiğini, bu nedenle sentetik ilaçlardan çok bu bitkisel ilaçları kullanmaya devam ettiklerini belirlemiştir (41).

Bitki tedavileri bitki ekstraktlarının ya da onların aktif bileşenlerinin kullanımına dayanmaktadır. Tıbbi bitkilerle yapılan birçok çalışmada bu bitkilerdeki etken maddelerin yeni kullanım yerlerinin bulunması bu bitkilerin değerini arttırmıştır. Tıbbi bitkilerin tedavide kullanım amaçları;

- ✓ Hastanın kanını temizlemek,
- ✓ Sinirleri teskin etmek,
- ✓ Hazmı kolaylaştırmak,
- ✓ İdrar ve ter söktürmek,
- ✓ İştah açmak,
- ✓ Gaz gidermek
- ✓ Balgam söktürmek,
- ✓ Ateş ve parazit düşürmek,

- ✓ Nefes açmak,
- ✓ Mikrop öldürmek,
- ✓ Astım, felç, dizanteri, sara, sıtma, şeker ve deri hastalıkları vb. giderilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadırlar (41).

Kanser tedavisinde yıllar içerisinde umut verici gelişmeler yaşanmış olsa da, hastalığın farklı tiplerinin bulunması ve tedavi yöntemlerinin başarı yüzdelerinin düşük olması insanları tedavi yöntemi olarak değişik yöntemlere başvurmaya zorlamaktadır. Bu yöntemlerin başında bitkilerle tedavi yöntemi olan fitoterapi gelmektedir (38,40).

#### **2.4. *Haplophyllum Ptilostylum* (Tüylü Sedo)**

*Haplophyllum* bitkisinin Uluslararası Botanik Adlandırma Koduna (2001) göre bitkiler aleminde ki sınıflandırması aşağıda ki gibidir.

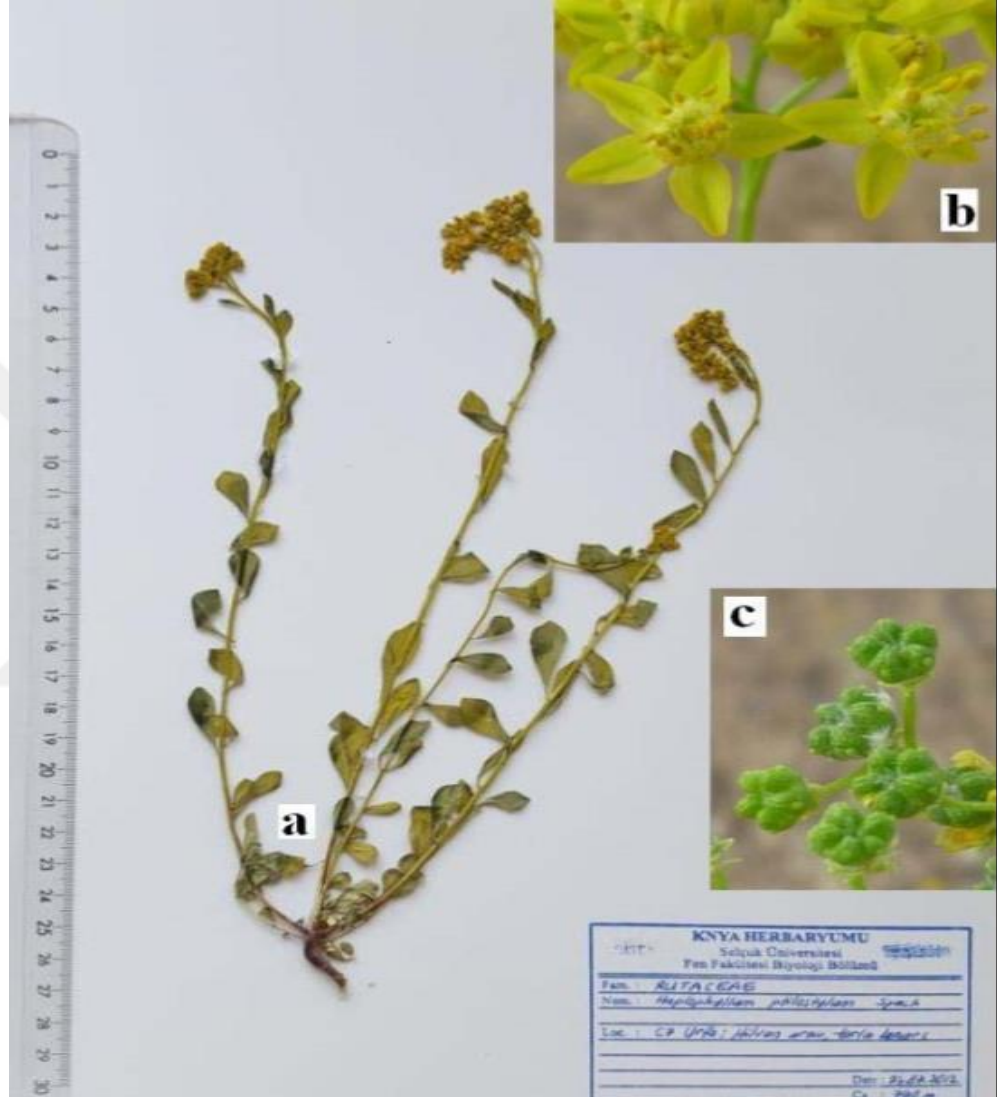
- Alemi: (Regnum) Vegetabile
- Bölümü: (Divisio) Spermatophyta
- Sınıfı: (Classis) Dicotyledoneae
- Takımı: (Ordo) Sapindales
- Ailesi: (Familia) Rutaceae
- Cinsi: (Genus) *Haplophyllum*

*Haplophyllum ptilostylum*; çok yıllık bir bitki olup 15-45 cm boylarında, tabanda dallanmış birkaç gövdeden veya tek gövdeden oluşan bir bitkidir. Nadiren verimsiz sürgünlü de olabilmektedir, beyaz soluk sarımsı ya da beyazımsı yeşil, tüysüz belli belirsiz punktat glandlı çiçekleri bulunmaktadır. Genellikle üç parçalı yapraklardan oluşur. Çiçeklenme durumu geniş, gevşek, çok çiçekli, 8-25 cm çapında, tüysüz, belli belirsiz küçük sarımsı glandlı; brakte çok sayıda, linear veya yapraksı şeklindedir. Sepaller deltoid-ovat veya lanseolat 1-0.75 mm serbest, obtus-subakut uçlu, kenarları genellikle düz, tüysüz, küçük glandlıdır ve meyvede kalıcıdır (42,43).

Townsend 1967 yılında yaptığı araştırmalarda *H. ptilostylum* taksonunun *H. buxbaumii* ve *H. cappadocicum*'un bir varyantı olabileceğini belirtmiştir ardından. 1986



yılında yaptığı çalışmada ise *H. ptilostylum*'un *H. buxbaumii*'den farklı olduğunu, bazı *H. cappadocicum* örneklerinin ise benzerlik gösterdiğini belirtmiş ve taksonun *H. ptilostylum* içinde kalmasının sadece infloresens dallarındaki tüysüzlük ve çok az tüylülüğe bağlı olduğunu belirtmiştir (42).

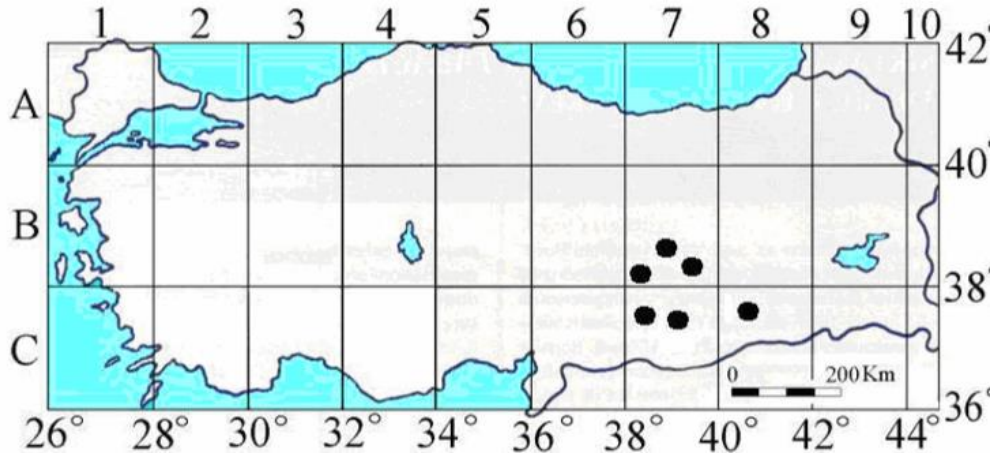


Şekil 2.5. *H. ptilostylum* taksonunun a: Genel Görünüm, b: Çiçek, c: Kapsül (44)



Şekil 2.6. Şanlıurfa' da bulunan *H. Ptilostylum* bitkisi (44)

*H. ptilostylum*; genellikle kumlu, ruderal alanlarda 750-1200 m yükseklikte yetişir. Mayıs ve haziran aylarında çiçek açar. Genellikle Suriye'nin Kuzey Doğusunda, Türkiye'nin Güney Doğu Bölgesi civarında yayılış gösterir. Ülkemizde Tunceli (Ovacık, Munzur, Şihenk civarı), Şanlıurfa (Hilvan civarı), Siirt (Silvan-Kurtalan civarı) illerinde yayılış göstermektedir (42).



Şekil 2.7. *Haplophyllum ptilostylum* bitkisinin ülkemizdeki yayılışı (44)

#### 2.4.1. *Haplophyllum* Üzerinde Yapılan Çalışmalar

*Haplophyllum* (Rutaceae) cinsi, Avrasya'nın sıcak ılıman ve subtropikal bölgeleri ve doğu Afrika'nın kuzey tropik bölgesi boyunca dağılmış yaklaşık 70 türe sahiptir. 13'ü endemik olan 25 *Haplophyllum* türü ile İran en fazla *Haplophyllum* türüne sahiptir ve bu cinsin bir türleşme merkezi olarak adlandırılmaktadır. Literatür taraması yapıldığında, kimyasal içeriğinde farklı yapıdaki ligandların varlığı tespit edilmiştir (45,46). Kumarinler, steroller, flavonoidler ve birkaç sınıf alkaloid *Haplophyllum* cinsinin farklı türlerinde tespit edilmiştir (45,48). Çeşitli *Haplophyllum* türlerinden birçok biyolojik aktivite bildirilmiştir ve *H. dauricum* L. G. Don'un antitümör etkilerini ve *H. patavinum* L. G. Don'un beş liginin sitotoksitesini içerdiği belirlenmiştir. İnsan kolon karsinomu hücreleri ve *H. tuberculatum*'un *Plasmodium falciparum*'un çeşitli suşları üzerinde HeLa ve HCT-116 hücre hatlarında farklı *Haplophyllum* türlerinden beş alkaloidin sitotoksik özellikleri hakkında da raporlar bulunmaktadır (49).

*Haplophyllum* cinsinin farklı türlerinde farklı ligand ve alkaloid sınıflarının varlığı ve patatin, justicidin ve skimmianine gibi bu bileşiklerin bazılarının sitotoksitesi hakkında raporlar verilmiştir. İran'da yetişen dört *Haplophyllum* türünün, farklı kökenlerden çeşitli tümör hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini in vitro koşullar da araştırmak istenmiştir. Bu türler arasında *H. tuberculatum*, *H. acutifolium* G. Don, *H. stapfianum* Hand.-Mazz. Ve İran'da endemik olan *H. viridulum* Sojak bulunmaktadır. Ek olarak, *Ruta graveolens* L., cinsi taksonomik olarak *Haplophyllum* cinsine en yakın olan cinsi olan sitotoksik bileşiklerle sitotoksik olarak değerlendirildi (49).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Gereçler

- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Thermo)
- İnvörted ışık mikroskobu (Olympus CKX 41)
- Flouresans mikroskop ve görüntüleme sistemi (Olympus CKX 51, DP73)
- Flow sitometri (BD facs via)
- Mikroplayt reader (Spectramax M5, Thermo supergo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich R 320)
- pH metre (Toledo)
- 75 cm'lik hücre kültür kapları
- 25 cm'lik hücre kültür kapları
- 96 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
- 6 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
- 12 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
- 5- 10 ml hacimli steril pipetler (Corning)
- 10, 100, 200, 1 000 µl' lik otomatik pipetler (Eppendorf)
- Cam pastör pipetleri
- 15 ve 50 ml' lik falkon tüp (Corning)
- Eppendorf tüpler
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- Hücre ortamı; DMEM F-12 (Sigma)
- Fötal bovine serumu (FBS) (Gibco)
- Penisilin/streptomisin (Sigma)
- L- Glutamine (Sigma)
- Tripan mavisi solüsyonu (Sigma)
- Thoma lamı
- Fosfat tamponu (PBS/Phosphate Buffered Saline)
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

- Acridine orange /Ethidium bromide
- Annexin V kiti (BD)
- JC-1 kiti (Abcam red)

Cell cycle kiti (Sigma)

### 3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan Haplophyllum Ptilostylum bitkisinin toprağın üzerinde yetişen kısımları güneşle direk temas etmeyecek ortamda kurutuldu. Kurutulan bitki numuneleri toz haline getirildi ve hemen ardından bu örneklerden 500 gr tartılarak (1:1) orandaki metanol: su, içinde 40 °C'lik ortamda gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün bu örnekler parçalara ayrılarak 15 dk ultrasonikatör de iyice homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler whatman filtre kağıtları yardımı ile iyice süzüldü ve 40 °C sıcaklığı aşmayacak şekilde rotary evaporatör de alkol solventleri uçuruldu hemen ardından liyofilizatörde toz haline getirilerek ham MeOH ekstreleri ayrıldı.

Ardından kuru olan ham MeOH ekstresi porsiyonları hekzan ile yıkanarak lipofilik kısımları, uçucu yağları ile klorofilli kısımları uzaklaştırıldı. Hemen ardından birleştirilen hekzan porsiyonları da rotary evaporatör ve liyofilizatör aracılığı ile kurutularak bitkinin hekzan ekstresinin elde edilme işlemi gerçekleştirildi.

Yağdan arındırılmış kalıntılar tekrardan küçük porsiyonlara ayrılarak diklorometanla yıkandı ve serbest aglikonlar gibi orta polaritedeki bileşikler de ekstrakte edildi. Bu porsiyonlar da tekrardan kurutuldu ve diklorometan ekstresi izole edildi.

Son işlemde; kalan yüksek polariteli kısımlar 1:1 oranında bütanol:su içeren karışım ile ekstraksiyonu yapıldı ve ardından şeker bileşiklerinin su fazına geçişinde ağırlıklı olarak organik bileşikleri içeren ikincil metabolitleri organik faz olarak bilinen bütanol içinde kaldı. Ayırma hunisi yardımı ile ayrılan fazlar evaporatör ve liyofilizatörde kurutularak BuOH ekstreleri elde edildi.

### **3.2. Hücreler Kültürü Çalışmaları**

Bu tez çalışmasının deneylerinde kullanılan hücreler ATCC' den temin edilip çoğaltılıp stokladığımız insan karaciğer kanser hücresi SNU-423 ve insan normal embriyonik endotel hücresi HUVEC kullanılmıştır.

#### **Hücrelerin Bakımı**

Hücrelerin büyümesi ve beslenmesini sağlamak için % 10 FBS, % 1 L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM F-12 besi ortamı kullanıldı. Hücreler, 25 cm<sup>2</sup> hücre kültürü kaplarında 37°C' de %5 CO<sub>2</sub>' li inkübatörde büyütüldü. Hücreler büyütülürken hücreler yüzeyi %80-90 kaplayıncaya kadar rutin olarak 2 günde bir ortamları yeni besi yeri ortamı eklenerek değiştirildi.

#### **Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması İşlemi**

Büyütülen hücreler yüzeyi %80 kaplayacak kadar çoğaldıkları zaman hücrelerin üzerlerindeki besi ortamı steril pastör pipetleri ile çekilerek atıldı. Ardından hücre kültürünün yüzeyi tripsin-EDTA muamelesini aktivitesini arttırmak için Ca<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> içermeyen ticari olarak satılan steril 1X PBS ile muamele edilerek hücreler 1 kere yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Hücre kültürünün üzerine tripsin-EDTA eklendi ve hücrelerin birbirlerinden ve plate yüzeyinden ayrılması beklendi. Ardından 1200 rpm de +4°C' de santrifüj edildi. Çöken hücrelerin üzerine %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu eklendi ve hücreler bu solüsyon içerisinde önce -20°C'lik derin dondurucuda veya -86°C'lik derin dondurucuda kısa süreli saklanırken uzun süreli olarak sıvı azota alınarak saklandı.

### **3.3. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması ve Sitotoksik Etkilerinin Saptanması**

#### **3.3.1. Hücre Sayımı**

Hücrelerden yeni kültürlere istenilen sayıda hücre alabilmek için thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Sayım için var olan hücre süspansiyonundan 10 µl alınırken tripan mavisinden 90 µl alındı ve böylece karışım 100 µl' ye tamamlandı. Thoma lamının üzerine bir lamel koyuldu ve homojenize edilen hücre boya karışımından pipet yardımıyla thoma lamı ve lamel arasına kenardan yavaşça aktarıldı. Thoma lamı üzerinde yer alan büyük 9 kare içerisindeki hücreler sayıldı. Milimetredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = ((\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)}) \times 10^4) / 8.$$

#### **3.3.2. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması**

Büyütülen hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp  $1 \times 10^4$  hücre-kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril pleytlere ekildi. 24 saat inkübasyonun ardından besi yerleri uzaklaştırıldı ve yerine 0-2.5-5-10-25-50-100-200 µg/ml konsantrasyonlarında bitki ekstresi içeren 200 µl besiyeri hücrelere eklenerek 24 saat %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

#### **3.3.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi**

Hücelere uygulanan bitki ekstresinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi için MTT hücre proliferasyon kiti kullanıldı. MTT testinde canlı hücrelerde meydana gelen metabolik aktivitenin hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile MTT'yi parçaladığı ve çözülebilir formazan tuzlarını oluşturduğu sisteme dayanarak yapılan bir yöntemdir. Hücelere bitki ekstrelerinin uygulanma ve inkübasyon süresinin ardından 96 kuyucuklu pleytlerin kuyucukları içerisindeki besi yerleri çekilip 20 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklenir ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakılmaktadırlar. İnkübasyon süresinden sonra pleytlerdeki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristallerinin üzerine 100 µl DMSO eklenir ve bu kristaller çözdürüldükten

sonra pleyt spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değerleri elde edilir ve bu değerlerle IC<sub>50</sub> değeri hesaplanır.

### **3.4. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi**

#### **3.4.1. Acridine Orange /Ethidium Bromide floresan boyama metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi**

6 kuyucuklu pleytlere lamel koyulduktan sonra lameller üzerine ekilen ve bitki ekstresinin etkin dozu ile muamele edilen hücreler alınıp, 2 kez 2 dakika soğuk 1XPBS ile yıkandı. 5 dakika %70 etanol ile fikse edildikten sonra hücreler 5 defa distile su ile yıkanır. Daha sonra bunlar 2 kez PBS’de bekletilip oda ısısında 15 dakika akridin orange/Ethidium bromide çalışma solüsyonu ile boyandı. Kuyucuklardan alınan lameller kurutma kağıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırıldı ve 4 kez PBS ile yıkandı. Lamellere bir damla PBS damlatılıp lamaların üzeri kapatılarak floresans mikroskopta incelendi.

#### **3.4.2. Apoptotik Etkinin Annexin V ile Flow Sitometrik İncelenmesi**

Sentezlenen bitki ekstrelerinden yüksek sitotoksik etki gösteren bileşiklerin; olası sitotoksik etkilerinin apoptotik yolağın aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozisle mi olduğunu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FacsCanto) ile analiz edildi. Annexin V apoptoz analizlerinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin V lektini, apoptotik hücrelerin membranın dış yüzeyinde yer alan fosfatidil serin fosfolipidine bağlanmaktadır. FITC, Annexin V bağlanan hücreleri flüoresan (FL1 detektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaması sağlamaktadır. Hücrelerde oluşan bu flüoresan ışımaya flow sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenmektedir. Hücreler oluşturdukları ışımamın etki şiddetine göre sınıflandırılır ve bir diyagramda gösterilirler. Ölü (nekrotik) hücrelerde nükleik asitlere bağlanan flüoresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyasıyla belirlenmektedir. PI nekrotik hücrelerde zarar gören hücre membranından geçerek bu hücrelerin DNA’larını boyamaktadır. DNA’ları boyanan hücrelerin flüoresan ışımaması



flow sitometrideki FL2 dedektörü aracılığı ile belirlenmektedir. Işımanın şiddeti ile hücreler sınıflandırılarak bir diyagrama yerleştirilmektedir.

Haplophyllum Ptilostylum bitkisinin  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstresinin; sitotoksik etkilerinin apoptotik yolağı aktifleyerek mi yoksa hücrelerde nekrozisi aktifleyerek mi olduğunu belirlemek amacı ile Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra lizatlar flow sitometri (BD FACS Canto) cihazı ile analiz edildi.

Çalışmada 6 well pleytlere ekilen SNU-423 hücrelerine Haplophyllum Ptilostylum bitkisinin  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstresinin 0, 5, 10,  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dozlarında 24 saat madde uygulaması yapıldıktan sonra hücrelere Annexin V (BD) kit protokolü uygulandı;

Öncelikle hücreler tripsin-edta ilave edilip kaldırıldı ve ardından üzerlerine 500  $\mu\text{L}$  PBS eklenerek yıkandı sonra 1200 rpm 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet şeklinde kalan hücreler 1X binding buffer ile yıkandı. Pelet hücreler 300  $\mu\text{L}$  olacak şekilde 1X binding buffer ile süspanse edildi ve oluşan karışımdan 100  $\mu\text{L}$  hücre süspansiyonu yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı, üzerine 5  $\mu\text{L}$  fluorochrome-conjugated Annexin V ve yine aynı tüpe 5  $\mu\text{L}$  PI (Propidium Iodide Staining) solüsyonu eklendi. Süspansiyon 15 dk oda ısısında inkübe edildi ve ardından 200  $\mu\text{L}$  1X binding solüsyonu dilüe edilerek flow sitometri cihazında analiz edildi.

### **3.4.3. Apoptotik Etkinin Cell Cycle (Hücre Döngüsü) ile Flow Sitometrik İncelenmesi**

Hücrelerin hücre döngüsünde buldukları evrede içerdikleri DNA miktarına göre ayırım yapılması için kullanılan ve Propidium Iodide boyası içeren bir kittir. Bu kitte hücreler yaklaşık olarak 1.000.000 hücre olacak şekilde 6 well platalere ekildi. SNU-423 ve HUVEC hücrelerine Haplophyllum Ptilostylum bitkisinin  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ekstresinin 0, 2.5, 5, 10,  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dozlarında 24 saat madde uygulaması yapıldıktan sonra hücrelere cell cycle (hücre döngüsü) (BD) kit protokolü uygulandı;

6'lik well plate ekilmiş olan hücrelerin üzerine 500  $\mu\text{L}$  tripsin eklendi ve hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden kalktığı gözlenince üzerlerine 1ml besi ortamı eklendi.

Ependorf tüplere alınan hücreler 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve pellete olan hücrelerin üzerindeki süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından hücre süspansiyonunun üzerine kit içerisinde bulunan 1X buffer solüsyonu eklendi. Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant uzaklaştırıldı ve bu işlem 2 kere tekrarlanarak hücreler yıkandı.

Hücre süspansiyonunun üzerine kit içerisinde ki A solüsyonundan 250 µl (tripsin buffer) eklendi. Tüpler hafifçe karıştırıldı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücre süspansiyonunun üzerine B solüsyonundan 200 µl (tripsin inhibitör ve RNase buffer) eklendi. Tüpler hafifçe karıştırıldı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solüsyon C eklenerek tüpler karıştırıldı ve 10 dk karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Hücre süspansiyonları daha sonra flowsitometri cihazında okutuldu, kaluza analysis programı kullanılarak her örnek analiz edildi.

#### **3.4.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü**

Hücrelerde ortaya çıkan apoptozun mitokondriyal içsel yolağında ortaya çıkan JC-I değişimi Flow sitometrik yöntemle belirlendi. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) ölçümü BD JC-1 Kit protokolüne göre yapıldı.

6 well platalere 1.000.000 hücre olacak şekilde ekilen hücreler 300µL tripsinle tripsinize edilerek kaldırıldı. Ardından 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelletin üzerine 500µL 1X PBS eklenerek hücreler homojenize edilerek yıkama işlemi yapıldı. Hücre solüsyonu tekrar santrifüj edildi oluşan pellet üzerine 500 µL JC-I working solüsyonu eklenerek hücreler vortekslendi ve 15 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı (bu işlem 2 kere tekrarlandı). 2ml 1X assay buffer hücrelerin bulunduğu tüpe yavaşça eklendi ve solüsyon yavaşça karıştırıldı. 400C de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Kit içerisinde bulunan 1X lik 1 ml assay buffer hücre solüsyonunun üzerine yavaşça eklenerek hücre solüsyonu tekrar karıştırıldı. 400C de 5 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı, pelletin üzerine 500µl 1X lik assay buffer eklenerek hücreler vortekslendi ve flowsitometri cihazına verilerek okuma işlemi yapıldı.

JC-1 Stok solüsyonu (1 mg/ml) hazırlanırken verilen prosedüre göre hazırlandı (200µl DMSO liyofilize olan JC-1 boyası üzerine eklendi ve boya tüpü sıkıca kapatılarak vorteks ile iyice karıştırıldı, hemen ardından -20 ye kaldırıldı).



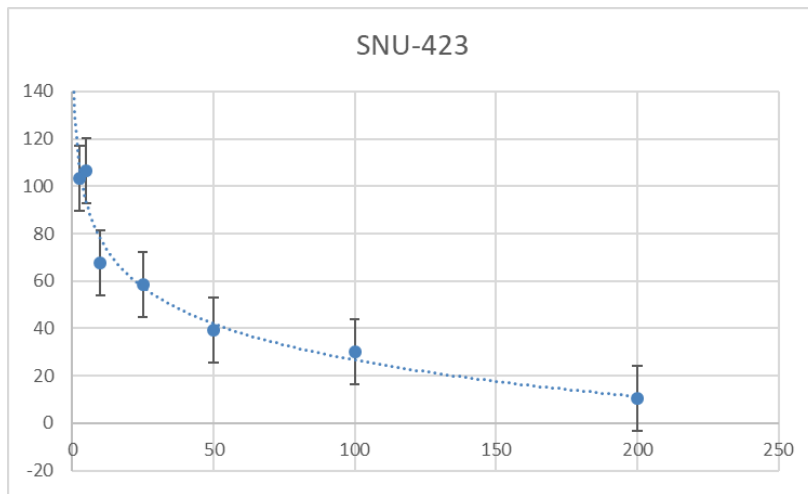
## 4. BULGULAR

### 4.1. MTT Yöntemi Kullanılarak Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

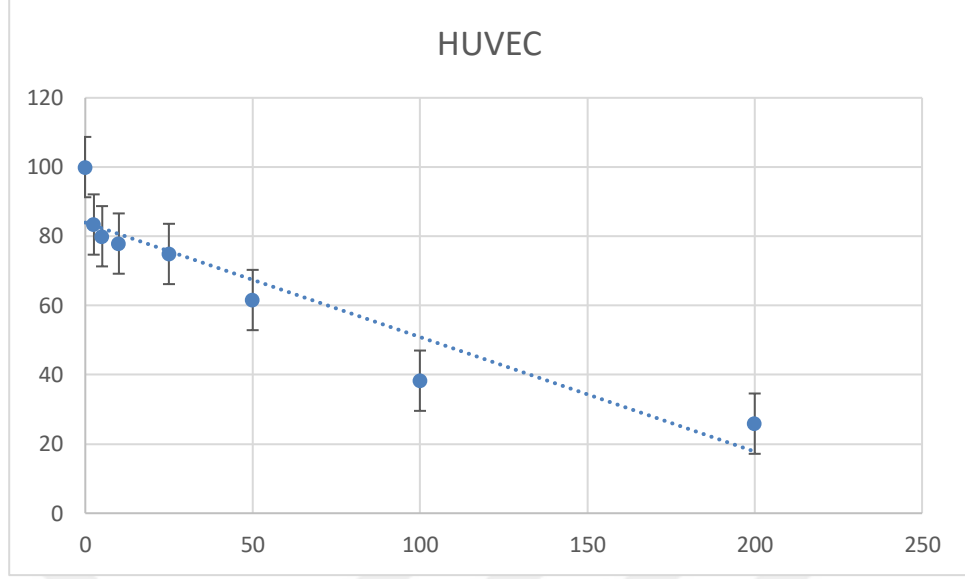
*H. ptilostylum* bitkisinin CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> (diklorometan) ekstresinin normal karaciğer hücresi olan HUVEC hücresi ve karaciğer kanseri hücresi olan SNU-423 hücresine olan etkisini incelemek için MTT yöntemi kullanıldı. MTT yönteminde hücreler *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresine 24 saat maruz bırakıldı. SNU-423 hücreleri üzerinde ki sitotoksik etkisinin (IC<sub>50</sub>: 3,55 µg/mL olduğu gözlenirken, HUVEC hücreleri üzerindeki etkisinin ise 102,7 µg/mL olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin karaciğer kanseri hücrelerine olan etkisinin kemoterapik ilaçlara eşdeğer olduğunu, aynı zamanda normal hücrelerde ki IC<sub>50</sub> dozunun yüksek olması sebebiyle kanser tedavilerinde kullanılan diğer kemoterapik ilaçlardan daha az zarar verdiği görüldü. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemlerinden olan fitoterapide kullanılabilir yeni bir bitki olabileceği yönündeki düşünceleri doğrular yöndedir.

**Tablo 4.1.** Hücrelerin IC<sub>50</sub> değerleri

	IC <sub>50</sub>	Birimi
<b>HUVEC</b>	102,7056	µg/mL
<b>SNU-423</b>	3,552596	µg/mL



**Şekil 4.1.** *H. ptilostylum* diklorometan ekstresinin SNU-423 hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi

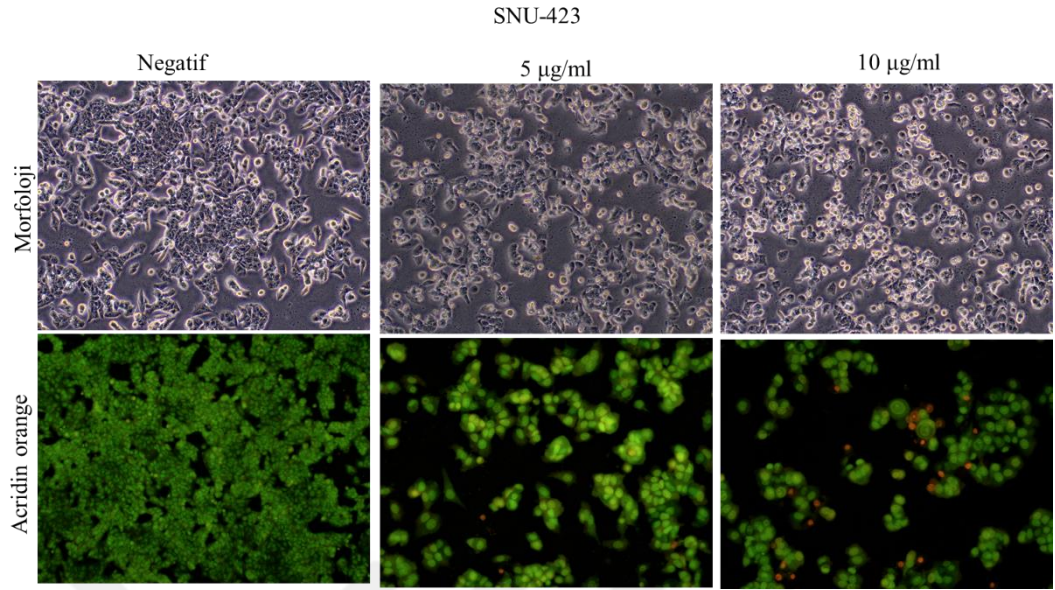


Şekil 4 2. *H. ptilostylum* diklorometan ekstresinin HUVEC hücresi üzerindeki sitotoksik etkisi

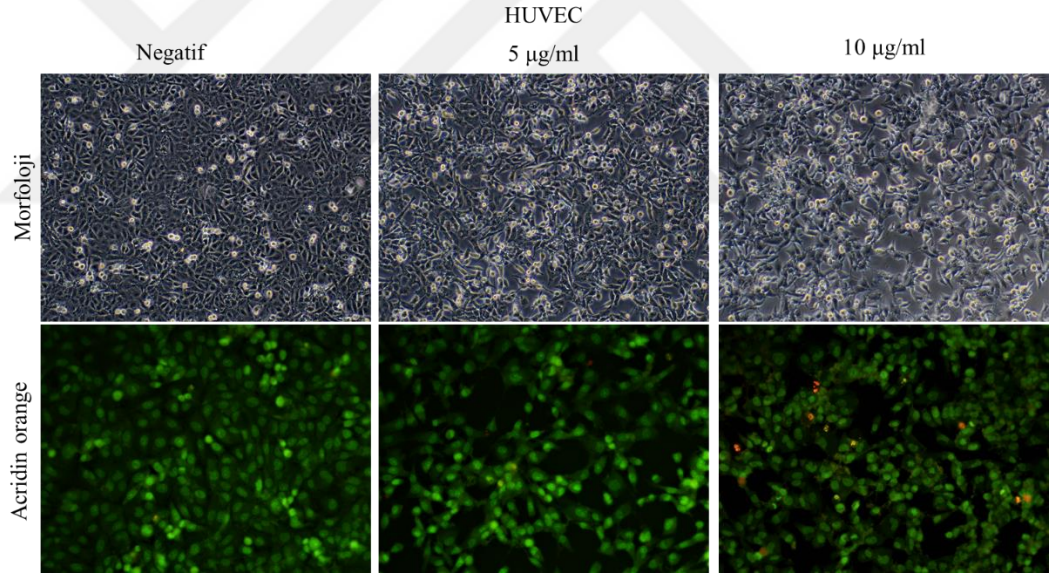
#### 4.2. Acridine Orange /Ethidium Bromide Metodu

*H. ptilostylum* diklorometan ekstresinin HUVEC ve SNU-423 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini hücrelerde morfolojik olarak belirlemek amacıyla yapılan bir metottur. Acridin orange metodunda nükleusta ve hücre membranında meydana gelen apoptoza bağlı olarak gerçekleşen değişiklikleri belirlemek ve incelemektir. Ethidium bromide membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyarken acridin orange boyası canlı ve ölü hücreleri boyamaktadır. Hücre bütünlüğü ve aktivitesi devam eden hücreler yeşil renk boyanırken apoptotik hücreler sarı turuncu renk almaktadır. Ölen hücreler ise kırmızı renk boyanmaktadır.

Yaptığımız bu boyamada tespit ettiğimiz IC<sub>50</sub> dozlarında (5-10 µg/ml) HUVEC ve SNU-423 hücrelerini karşılaştırdığımızda HUVEC hücrelerinin *H. ptilostylum* diklorometan ekstresinin uygulanan dozlarında hücre canlılığını koruduğunu negatifle kıyaslanan dozlardaki hücrelerin yeşil renk boyandığını tespit ettik. SNU-423 hücrelerinde ise *H. ptilostylum* diklorometan ekstresinin uygulandığı hücrelerde doza bağlı olarak negatife oranla apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüldüğünü tespit ettik.



**Şekil 4.3.** Bitki ekstresi uygulanan SNU-423 hücresinin floresan ve ışık mikroskobu morfolojik görüntüleri



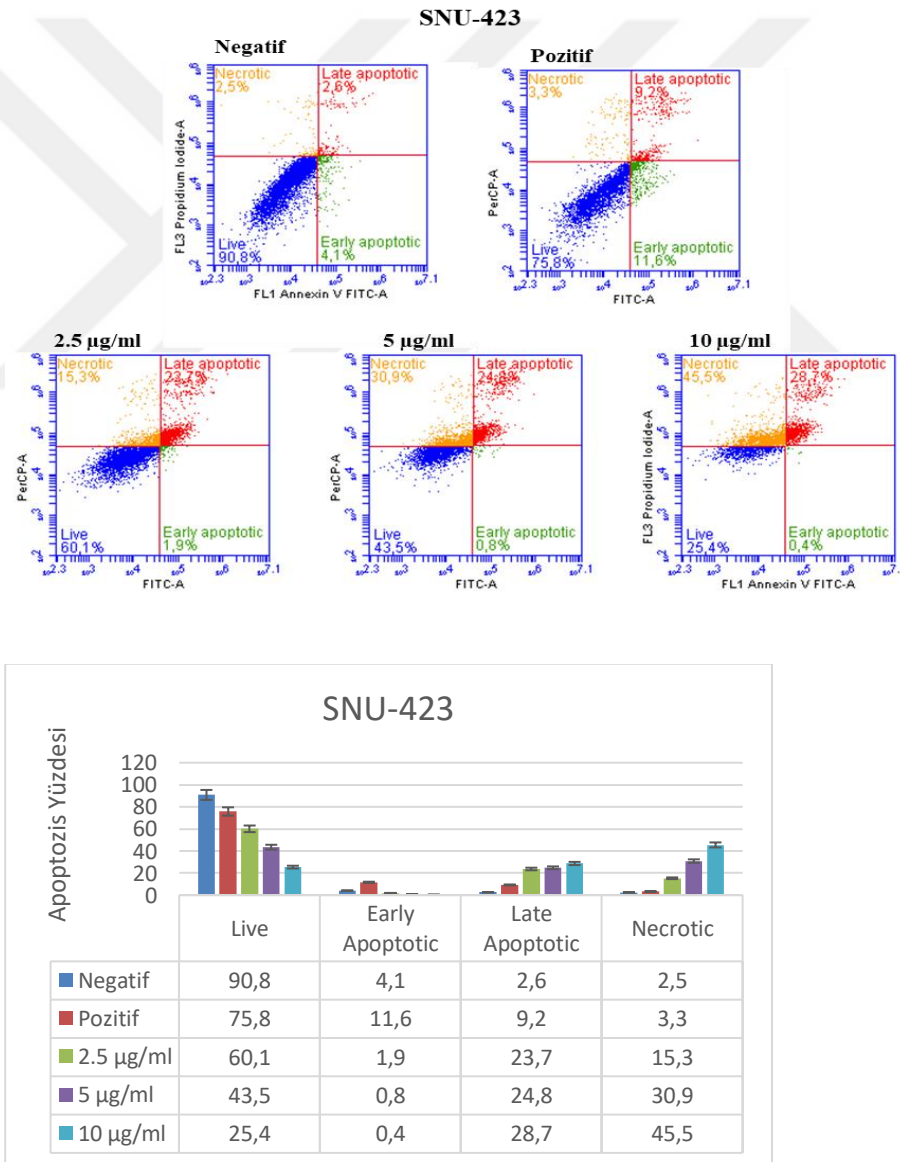
**Şekil 4.4.** Bitki ekstresi uygulanan HUVEC hücresinin floresan ve ışık mikroskobu morfolojik görüntüleri

### 4.3. Flow Sitometrik Annexin V PI Apoptoz/Nekroz Analizi

*H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin belirlenen IC<sub>50</sub> değerleri (2.5-5 ve 10 µg/ml) maruz bırakılan SNU-423 ve HUVEC hücreleri 24 saat inkübasyon süresinin sonunda Flow Sitometri cihazında Annexin V PI kiti ile analiz edildi. Bu kitle hücre ölüm mekanizmasını belirlemek için gerçekleşen hücre ölümünün apoptotik hücre ölümü ya da nekrotik hücre ölümünden hangisi olduğunu belirlemek amaçlanmaktadır.

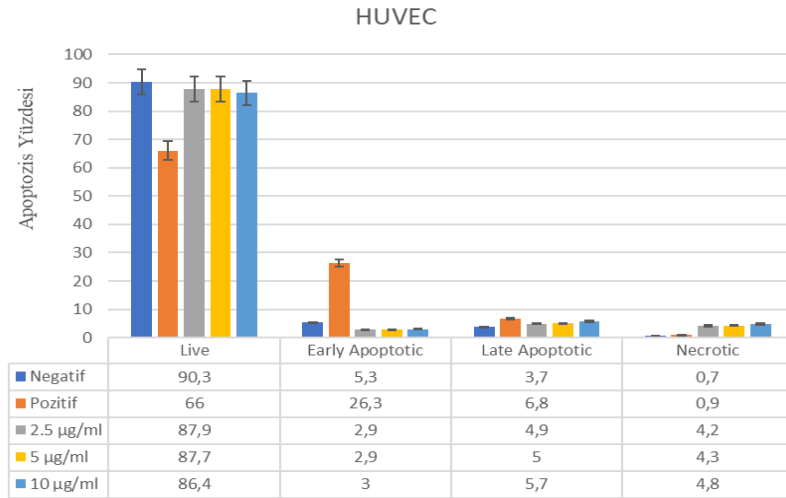
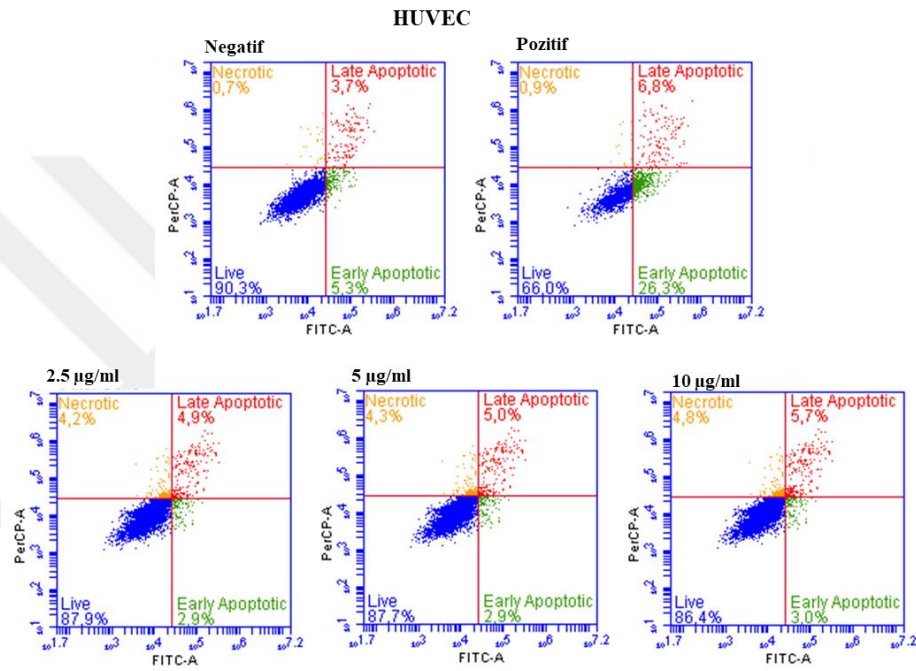
Kit içerisindeki protokole göre hazırlanan numuneler Flow Sitometri cihazında okutulurak hücre sayımı gerçekleştirildi. Annexin V - ve PI - hücreler sağlıklı hücreleri belirtirken, Annexin V + ve PI - hücreler erken apoptotik hücreleri göstermektedir. Annexin V + ve PI + hücreler ise geç apoptotik hücreleri göstermektedir.

SNU-423 hücrelerine uygulanan *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin uygulanan 2.5 µg/ml dozunda % 25.6 unun apoptotik etki gösterdiği, 5µg/ml dozunda hücrelerin % 25.6'sının apoptotik etki gösterdiği hücrelere uygulanan 10 µg/ml dozda hücrelerin % 29.1'inin apoptotik etki gösterdiği gözlemlendi. Apoptotik etkinin doza bağlı olarak arttığı görüldü.



Şekil 4.5. SNU-423 hücrelerinin Annexin V analiz sonuçları

HUVEC hücrelerine uygulanan *H. pilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin uygulanan 2.5µg/ml dozunda %7.8'inin apoptotik etki gösterdiği, 5µg/ml dozunda hücrelerin %7.9'unun apoptotik etki gösterdiği hücelere uygulanan 10 µg/ml dozda hücrelerin % 8.7'sinin apoptotik etki gösterdiği gözlemlendi. Normal hücreye ve kanser hücresine uygulanan *H. pilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin kanser hücresinde apoptotik etki gösterdiği görülürken normal hücreye minimum seviyede zarar verdiği görüldü.

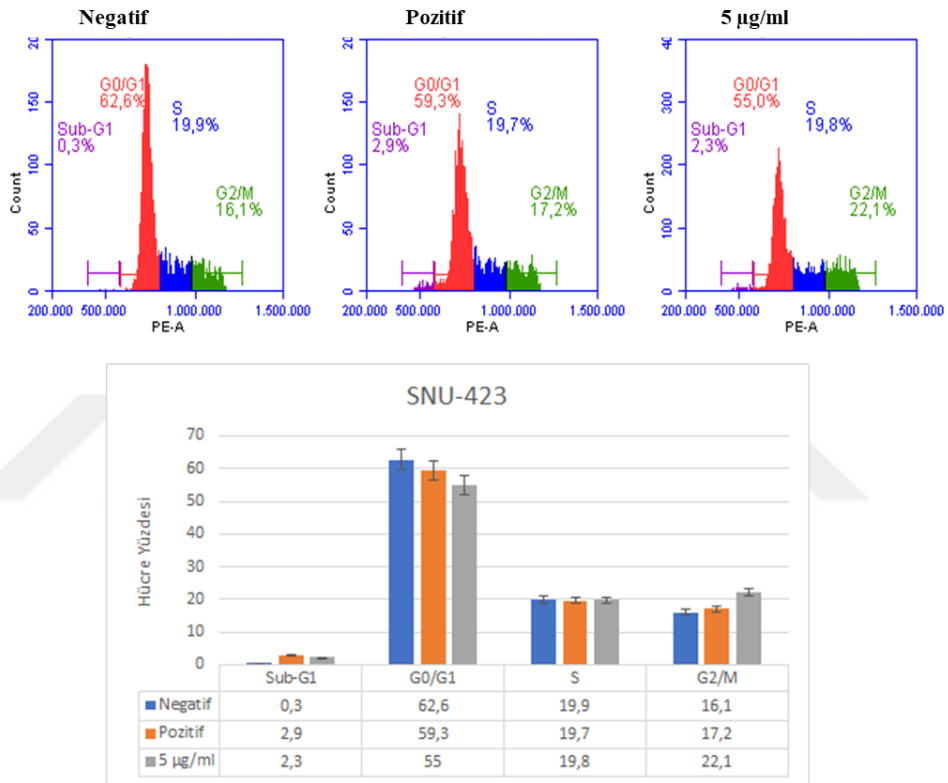


Şekil 4.6. HUVEC hücrelerinin Annexin V analiz sonuçları



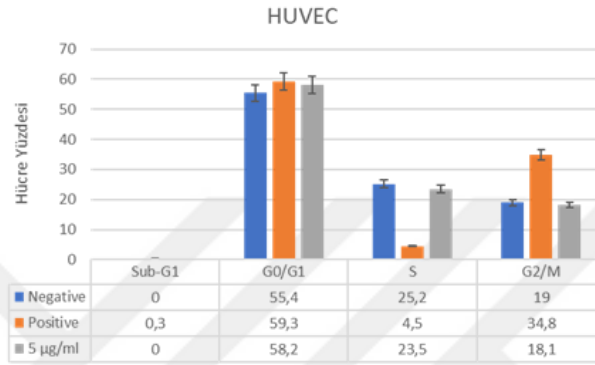
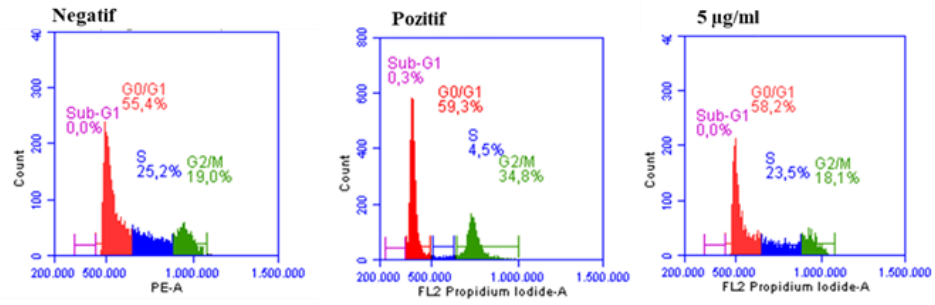
#### 4.4. Cell Cycle (Hücre Döngüsü) Kiti ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

*H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresine belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında (5 µg/ml) 24 saat maruz bırakılan HUVEC ve SNU-423 hücrelerinin hücre canlılıklarını ve hücrelerin proliferasyonlarının tespit edilebilmesi için cell cycle kiti kullanıldı. Flow sitometri cihazı kullanılarak yapılan ölçümlerde 10.000 hücre sayımı yapıldı. Hücrelerin hücre döngüsünde buldukları evrede içerdikleri DNA miktarına göre ayırım yapılmaktadır ve Propidium Iodide boyası kullanılmaktadır.



Şekil 4.7. SNU-423 hücrelerinin cell cycle analiz sonuçları

Yapılan analizlerde *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin 5 µg/ml dozuna maruz bırakılan SNU-423 hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre döngüsü evrelerine bakılarak hücre poliferasyonu incelendi. Hücre döngüsü evrelerine bakıldığında Sub-G1 fazında %2.3 GO/G1 fazında %55, S fazında %19.8 ve G2/M %21.1 hücre olduğu tespit edildi.

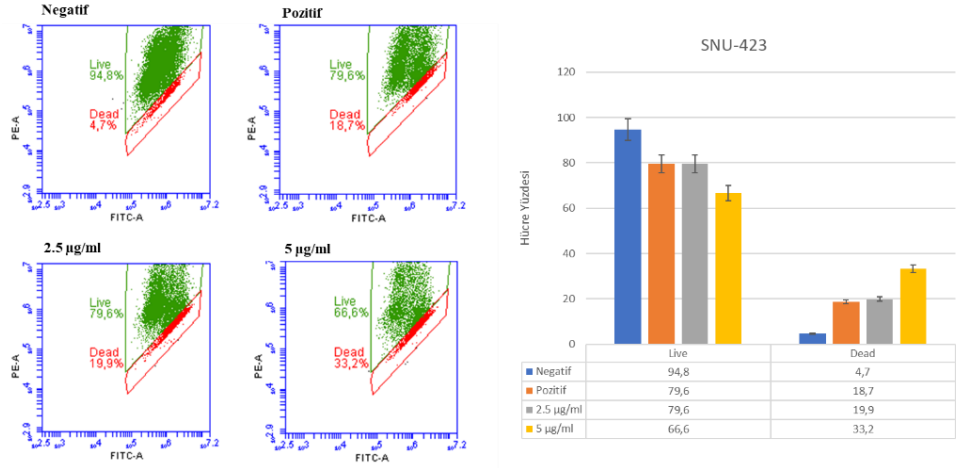


Şekil 4.8. HUVEC hüresinin cell cycle analiz sonuçları

*H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin 5 µg/ml dozuna maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin 24 saat sonundaki hücre döngüsü evrelerine bakıldığında ise Sub-G1 fazında %0,0, G0/G1 fazında %58,2, S fazında %23,5 ve G2/M %18,1 hücre olduğu tespit edildi.

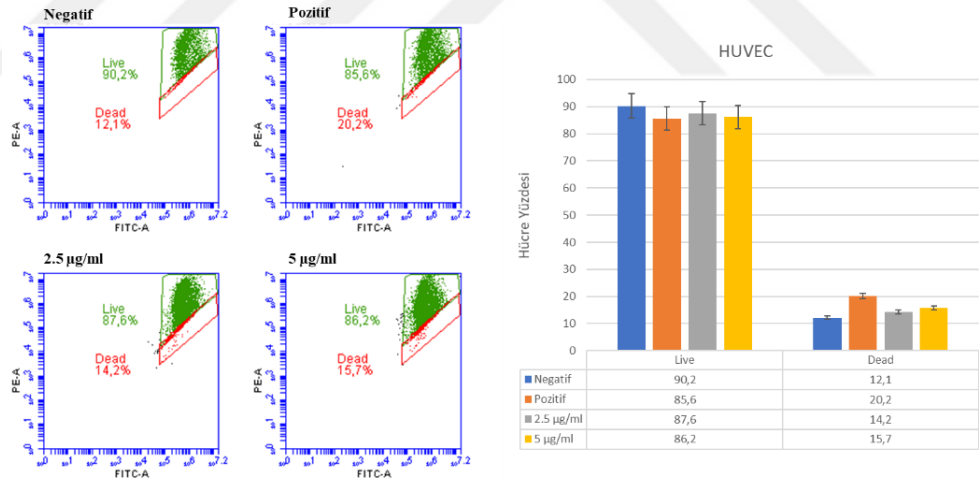
#### 4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi

*H. ptilostylum* diklorometan ekstresi SNU-423 ve HUVEC hücrelerine 2,5 ve 5 µg/ml dozlarında uygulanarak 24 saat inkübasyonda bekletildi. Bu inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin mitokondriyal membran potansiyeline (JC-1) bakıldı. Mitokondriyal membran gözeneklerinin yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin sitoplazmaya alması sonucu hücrelerde apoptosisin arttığı görülür. SNU-423 hüresinde 2,5 µg/ml dozunda canlı hücrelerin sayısı %79,6 ölü hücrelerin sayısı %19,9 iken 5 µg/ml dozunda canlı hücrelerin sayısı % 66,6, ölü hücrelerin sayısı ise %33,2 olarak tespit edildi.



Şekil 4.9. SNU-423 hücrelerinin JC-1 analiz sonuçları

HUVEC hücrelerinde 2.5 µg/ml dozunda canlı hücrelerin sayısı %87.6 ölü hücrelerin sayısı %14.2 iken 5 µg/ml dozunda canlı hücrelerin sayısı % 86.2, ölü hücrelerin sayısı ise % 15.7 olarak tespit edildi.



Şekil 4.10. SNU-423 hücrelerinin JC-1 analiz sonuçları

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserler arasında ölüme en çok sebebiyet veren kanser türü olarak erkeklerde 2. sırada yer alan kadınlarda ise 6. Sırada Hepatoselüler Karsinom (HCC) yer almaktadır. Bu kanseri türüne yakalan insanların sayısı her yıl daha da artmaktadır. HCC tanısının konulması çok zordur. Genellikle tanının konulması için serum markerlarına ya da birçok görüntüleme yöntemi ile histolojik olarak doğrulamaya ihtiyaç duyulmaktadır (49).

HCC gelişirken görülen evrelerden biri siroz oluşumudur. HCV ve alkolden kaynaklanan HCC'ların tamamında siroz görülürken HBV'den kaynaklanan HCC'de siroz oluşumu görülmemektedir (50). Çokaklı ve ark. yaptığı araştırmalarda HBV enfeksiyonundan kaynaklanan HCC'nin yaşam kalitesi ve sağlık sistemi kötü hala gelişmemiş olan ülkelerde görüldüğü kanısına varırken gelişmiş ülkelerde bu etkenlerin HCV enfeksiyonları ve alkol olduğunu gözlemlemiştir (52).

Tanaka ve Arii 2006 yılında yayınladığı bir araştırmada karacigerdeki siroz ve HCC oluşumunun öncesinde sitokinlerin, reaktif oksijen radikallerinin ve büyüme faktörlerinin, hipoksi-reoksijenasyon döngülerinin olduğu bir ortam oluşturduğunu tespit etmişlerdir (53). Bu ortamda yer alan HCC dokularının, hipoksik ortam yarattığı etki sebebiyle birçok protein düzeylerinde artış veya azalma olduğu belirtilmiştir (54). Proteinler arasında büyüme faktörleri ve büyüme faktörlerinin reseptörleri yer almaktadır (54).

Hücreler ekstraselüler matriks bileşenleriyle ilişkilerini hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin yardımı ile gerçekleştirirler. Bu reseptörlerden biri de integrin olarak adlandırılan, hücredeki proliferasyon olayından, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz ve diferansiyasyon vb. önemli olaylardan sorumlu olarak invazyon olayında rol almaktadır (55).

Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar hücredeki apoptotik süreci aktive edebilir. Çekirdekte, hücre zarında, mitokondriyonda veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek

bir uyarı apoptozu başlatabilir. DNA'da oluşan bir hasar özellikle önemli bir uyarıdır. Duyarlı hücrede p53'ün aktivasyonu veya diğer başka mekanizmalar apoptozu başlatabilir. Bu hasarlanmalar dışında apoptozu tetikleyen bazı fizyolojik sitokinler vardır. Hücre membranının yapısının bozulması ve seçici geçirgenlik özelliğini kaybetmesi sonucu mitokondriyal membran gözeneklerinin fazla miktarda reaktif oksijen türünü sitoplazmaya geçirmesi de apoptosisin artmasına neden olmaktadır (56).

Apoptozu başlatabilen tüm bu uyarılar, sonuç olarak kaspazların (sistein proteazlar) aktivasyonuna neden olmakta, bunların aktivasyonu ile kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması gibi apoptozu ait belirgin yapısal ve biyokimyasal değişiklikler gelişmektedir. Kaspazlar apoptozun efektör kolunu oluşturmaktadır ve apoptozu giden bütün hücrelerde aynı şekilde gelişmektedir (56, 57).

Hücrelerde apoptoz mekanizmasında üç temel grubun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar; ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler olan kaspazlardır. Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler (57).

Son yıllarda HCC tedavilerinde karaciğer nakil işlemi, radyofrekans ablasyon işlemi, perkutan alkol veya asetik asit ablasyonu işlemi, radyoterapi işlemi, kemoterapik ilaçlarla tedavi gibi işlemler uygulanmaktadır (58).

Kanser hastalarının tedavi edilmesi sürecinde umut veren gelişmeler olduğu gibi hastalarda tedavinin etkili olma seviyesinin yüksekliğinin ve tedavinin başarı yüzdesinin düşüklüğü de insanlara tedavi sürecinin zorlu yolunda belki de tedavi edilebilme yüzdelerini azıcıkta olsun arttıracaklarını düşündükleri alternatif tıbbi yöntemlere yönelmeye başlamışlardır. Bu tedavi yöntemlerinin en tercih edilenlerinden biri olarak da akla bitkisel tedavi yöntemleri gelmektedir. Bitkilerle tedavi yöntemlerinin tedavi süresince yan etkileri açısından diğer tedavi yöntemlerine oranla rahat bir tedavi yöntemi olması bu durumu güçlendirmiştir (49).

Bitkilerde doğal olarak sentezlenmekte olan, antikanser özelliğe sahip olan resveratrol ve silimarin maddelerinin toksik özellik göstermediğini tespit eden bir

çalışmada bu maddelerin etki mekanizmalarının kısmen bilinmesi üzerine elde edilmesi kolay olduğundan gıda takviyesinde kullanılabileceği düşünülmüştür (59).

Kimyasal içeriğin ve biyoaktivitenin incelendiği çalışmalar arasındaki ilişkilere bakılan çalışmalar *Taraxacum Officinale* bitkisinin bileşimindeki luteolin, şikorik asit fenolik bileşiklerinin antienflamatuvar aktiviteye katkısının olduğu tespit edildiğini göstermiştir (60). Flavonoittenin lipid peroksidasyonunun azaltmasına ve serbest radikallerin yok edilmesi gibi güçlü antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (61).

İnsan sağlığı ve doğa sağlığı fitoterapinin önemini ve değerini gün geçtikçe saha çok anlatmaktadır. Son yıllarda dünyada büyük çoğunluğu bitkilerle tedaviyi en fazla tercih edilen ilaçlar listesine almıştır. Adı bilinen farmasötik firmalar bu gelişmelerin ışığında yeni bir kaynak olarak bitki ve bitkisel türevlere yeniden ilgi göstermeye başlamıştır (61).

Yeni ilaçların üretim, uygulama ve geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmaların yan etkilerinin az olması diğer tedavi yöntemleri yerine bitkilerle hazırlanan ilaçlarla yapılan tedavilere verilen önemi arttırmıştır. Kanser hastalığının tedavisinde kullanılan yöntemlerin en çok bilinen dezavantajının hem yan etkilerinin olması hem de tedavinin kişiye özel olmamasıdır. Oysa ki bitkilerle yapılan araştırmalarda hedef kişiye özel ilaç üretimi ile spesifik tedavi yöntemi geliştirerek sağlıklı hücrelere zarar verilmeden sadece tümörlü dokuyu hedef alarak oluşabilecek yan etkileri ortadan kaldırabilmektedir.

Yaptığımız tez çalışmasında, karaciğer kanseri hücresi olarak bilinen ve ticari olarak satın alınan SNU-243 ve sağlıklı karaciğer hücresi olarak bilinen HUVEC hücresini kullanarak hücre kültürü çalışmaları ile düşük sitotoksik etki gösterdiğini düşündüğümüz endemik bir bitki olan *H. ptilostylum* diklorometan ekstresi üzerine araştırmalar yaparak karaciğer kanserinde spesifik tedavi ile ilgili çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

*H. ptilostylum* bitkisinin sitotoksik etkinliğini belirlemek amacı ile yaptığımız MTT deneylerinde artan dozlarda yaptığımız madde uygulamasında SNU-423 hücresinde sitotoksik dozun (IC<sub>50</sub>) 3.55 µg/ml olduğunu buna karşın HUVEC hücresinde bu

sitotoksik dozun (IC<sub>50</sub>) 103 µg/ml olarak elde edildi. Sağlıklı hücrede daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olan bu bitkinin kanser hücresinde ki sitotoksik dozunun çok düşük olduğunu görmek yeni olası bir tedavi ajanı fikrini güçlendirmektedir.

Bu verileri doğrulamak amacı ile elde edilen IC<sub>50</sub> dozlarının hücrelerin morfolojik yapısında ve hücresel bütünlüklerini belirlemek amacıyla acridin orange-etidium bromide boyaması yapıldı. Hücrelerin floresans mikroskop ile alınan görüntülerinde sağlıklı hücrelerde hücre yapısının ve bütünlüğünün bozulmadığı gibi karaciğer kanseri hücresi olan SNU-423 hücresinin yüksek dozlarda (5-10 µg/ml) hücrelerin apoptoza gittiğini gösteren apoptotik ve nekrotik cisimlerin varlığının yanında SNU-423 hücrelerinde ki yapısal bütünlüğün bozulduğu hücrelerin normal morfolojik şekillerini kaybettiği görüldü.

Bu sonuçlar doğrultusunda hücrelerde aktif olan hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptoz ve nekrozdan hangisinin etkisi ile kanserli hücrelerin ölümünün gerçekleştiğini belirlemek için 2.5-5-10 µg/ml dozlarında *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresi uygulanan hücreler flow sitometri de Annexin V yöntemi ile apoptotik etkinliği analiz edildi. Sonuçlara bakıldığında SNU-423 hücresine uygulanan *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin artan dozlarda hücreleri nekroza sürüklediğini ancak 2.5 µg/ml dozunda hücrelerin apoptotik etki gösterdiği görüldü. HUVEC hücrelerinin ise artan dozlara bağlı olarak nerdeyse %85'inin canlı olduğu görüldü.

Flowsitometrik yöntemlerden olan cell cycle (hücre döngüsü) yöntemi ile hücrelerin uygulanan *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin 5 µg/ml dozuna bağlı olarak hücre döngüsünün fazların da ki etkisini belirlemek için yaptığımız deneylerde SNU-423 hücrelerine uygulanan dozun G0/G1 fazında tutulan hücrelerin sağlıklı hücreyle kıyaslandığında artış gösterdiği belirlendi.

Mitokondriyal membran potansiyelinin ölçülmesinde kullanılan JC-1 kiti ile yapılan deneylerde elde edilen sonuçlarda *H. ptilostylum* bitkisinin diklorometan ekstresinin 2.5-5 µg/ml sağlıklı hücre olan HUVEC hücrelerinde SNU-423 hücrelerine

kıyasla hücre canlılık oranının azaldığı sağlıklı hücrede 5 µg/ml dozunda hücreler canlı iken kanserli hücrelerde bu canlılık oranının düştüğü görüldü.

Tüm bu verilerden yola çıkarak endemik bir bitki olan *H. ptilostylum* bitkisinin anti kanser aktivitesinin bulunduğunu, kanserli hücreleri apoptoza sevk etmesinin yanında sağlıklı hücrede olumsuz bir etki göstermemesi ile kanser tedavilerinde olumlu etkiye sahip olabileceğine inanmaktayız.

Literatüre yeni bilgiler katmayı amaçladığımız bu tez çalışmamızın ileri deneylerle daha spesifik olarak araştırılması ile etkinliğinin daha çok belirlenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



## 6. KAYNAKLAR

1. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. Journal of Cancer Science and Therapy 2009; 1:1-4.
2. Player A, Barrett JC, Kawasaki ES. Laser capture microdissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell. Expert Review of Molecular Diagnostics 2004; 4:831–840.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer Cell,2000; 100, 57–70.
4. <https://tr.medicok.com/understanding-liver-cancer-24451>, Mart 2019.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2011; 61:69–90.
6. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol a review of preclinical studies for human cancer prevention, Toxicology and Applied Pharmacology 2007; 224 (3), 274-83.
7. Venugopal R, Liu RH. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. Food Science and Human Wellness 2012; 1 (1), 1-13.
8. Gozler B, Onur MA, Gozler T, Kadan G, Hesse M. Lignans and lignan glycosides from *Haplophyllum cappadocicum*. Phytochemistry 1994a; 37:1693–1698.
9. Gozler B, Kivcak B, Arar G, Gozler T, Hesse M. (-)-Padocin: A novel epoxylicignan from *Haplophyllum cappadocicum*. Heterocycles 1994b; 39:243–249.
10. Gozler B, Rentsch D, Gozler T, Unver N, Hesse M. Lignans, alkaloids and coumarins from *Haplophyllum vulcanicum*. Phytochemistry 1996; 42: 695–699.

11. Yuldashev MP. Flavonoids of *Haplophyllum foliosum* and *H. pedicellatum*. *Chem Nat Comp* 2001; 37:288–289.
12. Weaver RF, Hedrick PW. *Genes and Cancer*, 3rd edition, Brown Publishers 1993; 18-21.
13. Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 2003; 36, 131- 49.
14. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz LFP, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79 (4), 593-616.
15. Trosko JE, Chang CC, Madhukar BV, Dupont E. Intercellular communication: A paradigm for the interpretation of the initiation/promotion/progress model of carcinogenesis. In: Arcos, J. C. Editor, *Chemical Induction of Cancer: Modulation and Combination Effects* 1996; 56(1)-10.
16. Pitot HC, Goldsworthy TL, Moran S. The natural history of carcinogenesis Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* 1981; 17(2), 133-146.
17. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* 2002; 29, 15–18.
18. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri>, Nisan 2019.
19. <https://www.karaciger.gen.tr> 2018.
20. <http://www.bilgiinegi.com/karaciger-nerededir-gorevleri-nelerdir.htm>, Nisan 2019.
21. <http://www.kansertedavisi.web.tr/karaciger-kanseri/> 2019.

22. Cha C, DeMatteo RP. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2005; 19, 25–37.
23. Henry SH, Bosch FX, Bowers JC. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2002; 504, 229-232.
24. Maddrey WC. Hepatitis B- an important public health issue. *Clinical Laboratory* 2005; 47, 51-53.
25. Lok AS. Hepatitis B infection: pathogenesis and management, *Journal of Hepatology* 2009;32, 89-93.
26. Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, et al. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 3620-3627.
27. McKillop IH, Schrum LW. Alcohol and liver cancer. *Alcohol* 2006; 35, 195-203.
28. Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: are we making progress, *Cancer Investigation* 2003; 21, 418-420.
29. El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clinical Liver Disease* 2001; 5, 87-92.
30. Romeo R, Colombo M. The natural history of hepatocellular Carcinoma. *Toxicology* 2005; 39, 181–182.
31. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis c virus core protein inhibits fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via nfkappab activation. *Journal of Virology* 1999; 73, 4713-4720.
32. Riley J, Mandel HG, Sinha S, Judah DJ, Neal GE. In vitro activation of the human Harvey-ras proto-oncogene by aflatoxin B1. *Carcinogenesis* 1997; 18, 905-910.

33. Kew MC. Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. *Liver International* 2003; 23, 405-409.
34. Nita ME, Alves VAF, Carrilho FJ, Ono-Nita SK, De Mello ES, GamaRodrigues JJ. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2002; 44, 39-48.
35. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127, 87-96.
36. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6, 674-687.
37. Yeşilbakan Ö, Akyol A, Çetinkaya Y, Altın T, Unlu D. Kemoterapi Tedavisi Alan Hastaların Tedaviye Bağlı Yaşadıkları Semptomlar ve Yaşam Kalitesine Olan Etkisinin Öncelenmesi. *Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi* 2007; 21(1): 13-31.
38. Denir S. Farklı *Salvia Tomentosa* Ekstarktlarının C6 Glioma Monolayer ve Sferoid Hücre Kültürü Modelinde Antitümör Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir 2005.
39. Dhannikula AB, Panchagnula R. Lokalized Paclitaxel Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 183:85-100.
40. Bozkurt H. Bazı Cisplatin Türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir 2004.
41. Çubukçu B, Sarıtar G, Meriçli AH, Sütülpınar N, Mat A, Meriçli F. Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı İstanbul 2002; 1-3.

42. AKTAŞ K. Morphological and Palynological properties of Endemic *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. (Rutaceae). *Bilge International Journal of Science and Technology Research* 2017; 1(2), 155-159.
43. Ünver SN, Kaya GI, Sarıkaya B, Ömür MA, Özdemir C, Demirci B, ve ark. Composition on the essential oil endemic *Haplopyllum megalanthum* Bornm. From Turkey. *Records of Natural Products* 2002; 6(1), 80-83.
44. <https://www.turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/view-album/5507.html>, Nisan 2019.
45. Gozler B., Onur MA, Gozler T., Kadan G, Hesse M. Lignans and lignan glycosides from *Haplophyllum cappadocicum*. *Phytochemistry* 1994a; 37:1693–1698.
46. Gozler B, Kivcak B, Arar G, Gozler T, Hesse M. (-)-Padocin: A novel epoxy lignan from *Haplophyllum cappadocicum*. *Heterocycles* 1994b; 39:243–249.
47. Gozler B, Rentsch D, Gozler T, Ünver N, Hesse M, Lignans, alkaloids and coumarins from *Haplophyllum vulcanicum*. *Phytochemistry* 1996; 42: 695–699.
48. Yuldashev MP. Flavonoids of *Haplophyllum foliosum* and *H. pedicellatum*. *Chem Nat Comp* 2001; 37:288–289.
49. Varamini P, Doroudchi M, Mohagheghzadeh A, Soltani A, Ghaderi A, Cytotoxic Evaluation of Four *Haplophyllum*. Species with Various Tumor Cell Lines 2007; 45: 299-302.
50. Yazıcı O, Bahar K. Hepatosellüler Karsinomda Yeni Tanı ve Tedavi Yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji* 2008; 12(1); 47-52.
51. Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005, 17:477-483.

52. Çokaklı M. Hepatosellüler Karsinoma Dokularında ve Hücre Hatlarında Kaveolin- c-Met İlişkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir 2006.
53. Tanaka S, Arii S. Current status and perspective of antiangiogenic therapy for cancer: hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2006; 11:82–89.
54. Brader P, Riedl CC, Woo Y, Ponomarev V, Zanzonico P, Wen B, et al. Imaging of hypoxia-driven gene expression in an orthotopic liver tumor model. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(11):2900-8.
55. Alex YH, Friedman SL, Clavien PA, Trautwein C, Graf R. *Signaling Pathways in Liver Diseases*, Springer Berlin Heidelberg 2005: 63-71.
56. Dhannikula AB, Panchagnula R. Lokalized Paclitaxel Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 183:85-100.
57. Çelik E. Hepatosellüler Karsinoma Hücre Motilitesinde PKB/AKT/mTOR Sinyal Yolağının Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İzmir 2008.
58. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün Nobel Tıp Kitapevleri 1999; 142-44.
59. Singh CK, George J, Ahmad N. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. *Annals of the New York Academy of Science* 2013;1290, 113-21.
60. Piao T, Ma Z, Li X, Liu J. Taraxasterol Inhibits IL-1 $\beta$ -Induced Inflammatory Response in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *European Journal of Pharmacology* 2015; 756: 38-42.
61. Schütz K, Carle R, Schieber A. Taraxacum--a Review on its Phytochemical and Pharmacological Profile. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 107: 313-323.

## 7. EKLER




**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**Etik Kurul Kararı**

**TARİH** : 13.06.2019  
**OTURUM** : 06  
**SAAT** : 13:30

**HRÜ/19.06.33**

**Karar:** Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU'nun yürütücüsü olduğu "Haplophyllum Ptilostylum Bitkisinin Antioksidan, Anti Kanser ve İçerik Analizinin İncelenmesi" başlıklı çalışmaya Etik Kurul onayına gerek olmadığına,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

  
**ASLI GİBİDİR**  
**Prof. Dr. Zehra YILMAZ**  
**Etik Kurul Başkanı**





T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

**Öğrencinin**

Numarası :165302012  
Adı, Soyadı :Mustafa Orhan TUNÇEL  
Anabilim Dalı :Tıbbi Biyokimya  
Programı : Yüksek Lisans  
Tezin Adı : “*Haplophyllum Ptilostylum* Bitkisinin Anti Kanser Özelliğinin İncelenmesi.”

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 48 sayfalık kısmına ilişkin, 20/08/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %8’dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 20/08/2019

**Tezi Hazırlayan Öğrencinin**

Adı-Soyadı: Mustafa Orhan TUNÇEL

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 20/08/2019

**Danışmanın**

Unvanı-Adı-Soyadı:

İmzası: Dr. Öğr. Üyesi İsmail KÖYÜNCÜ



T.C  
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10284688
Yazar Adı / Soyadı	MUSTAFA ORHAN TUNÇEL
T.C.Kimlik No	20093749082
Telefon	5370561293
E-Posta	mustafatuncel22@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM BİTKİSİNİN ANTI KANSER ÖZELLİĞİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF ANTI CANCER PROPERTIES OF HAPLOPHYLLUM PTILOSTYLUM PLANT
Konu	Biyokimya = Biochemistry
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Biyokimya Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	45
Tez Danışmanları	DR. ÖĞR. ÜYESİ İSMAİL KOYUNCU
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

21.08.2019

İmza:.....