

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

**HAPLOPHYLLUM BUXBAUMİ BİTKİSİNİN KOLON
KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya AKÇİÇEK

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

ŞANLIURFA

2019

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

HAPLOPHYLLUM BUXBAUMİ BİTKİSİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya AKÇİÇEK

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Kurulu (HÜBAK) tarafından **17227** proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2019

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Derya AKÇİÇEK'in hazırladığı “**Haplophyllum Buxbaumii Bitkisinin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkisinin İncelenmesi**” konulu çalışma, 02.05.2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

BASKAN

Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL (Danışman)
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖRKMEZ
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

ÜYE

Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Harran üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü yönetim kurulunun 02.05.2019 tarih ve 2019/06/12..sayılı kararıyla onaylanmıştır.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitime başladığım ilk günden itibaren bilimsel çalışmalarına yardım ederek, laboratuvar deneyimi sağlamama yardımcı olan, tez çalışmamı yapmamda hiçbir yardımını esirgmeden yanımda olan ve zamanını harcamaktan kaçınmayan, bana her konuda destek veren hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU'ya, danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL'e, bölüm başkanımız Doç. Dr. Nihayet BAYRAKTAR'a,

Her anımda arkamda büyük desteklerini hissettiğim, iyi bir eğitim almam için her türlü fedakarlığı gösteren, beni asla yalnız bırakmayan aileme,

Tezimde hocalarım kadar her daim yanımda olan ve yön veren arkadaşım Hasine YEL' e ve Evren GÜMÜŐ hocama, yardımları için Mehmet ENEŐ, Özgür YÜKSEKDAĞ, Ebru TEMİZ, Nejla KORKUT, Nurően KARDEŐLER ve Esmâ ALTUN 'a

Ayrıca maddi destek sağlayan HÜBAK'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

DERYA AKÇİÇEK

2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
TABLO DİZİNİ.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Kanserin Oluşumu	4
2.3. Tümörlerin Türedikleri Hücreye Göre Sınıflandırılması.....	5
2.2.1. Karsinomlar	5
2.2.2. Sarkomalar.....	5
2.2.3. Lenfoma.....	5
2.2.4. Lösemi	5
2.4. Kanser Hücreleri Normal Hücrelerin Sahip Olmadığı Birçok Özelliğe Sahiptir	6
2.5. Kanserin Tanısı ve Belirtileri	7
2.6. Bir Kanserin Varlığına İşaret Edebilecek Belirtiler	8
2.7. Kanser Tedavisi	8
2.8. Kanser Tedavisinde Önemli Uygulamalar	9
2.9. Kanser Biyolojisi	10
2.10. Kanserin Genetik Yapısı.....	10
2.11. Kolon Kanseri ve Oluşumu	11
2.12. Kolon Kanseri Hücre Hatları ve Özellikleri	13
2.13. Hücre Ölümü	13
2.14. Apoptozis.....	14
2.15. Nekrozis.....	16
2.16. Haplophyllum Buxbaumii	17

2.17. Antikanser Özellik.....	18
3. MATERYAL ve METOD.....	22
3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	22
3.2. Antikanser Özellik ile İlgili Yöntemler	23
3.2.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	23
3.2.2. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması ve Sitotoksik Etkinliklerinin Saptanması	24
3.2.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	24
3.3. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi	25
3.3.1. Apoptotik Etkisinin Cell Cycle (Hücre Döngüsü) ile Flow Sitometrik İncelenmesi.....	25
3.3.2. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi	25
3.3.3. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi	26
3.3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü.....	27
3.3.5. ROS (Serbest Reaktif Oksijen) Ölçümü.....	27
4. BULGULAR.....	30
4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	30
4.2. Apoptotik Etkisinin Cell Cycle (Hücre Döngüsü) ile Flow Sitometrik İncelenmesi	31
4.3. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi	32
4.4. Flow Sitometrik Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi.....	34
4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi	35
4.6. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi (ROS) Analizi	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
6. KAYNAKLAR.....	44
7. EKLER.....	49

Şekil 1. Normal ve Kanser Hücresi Arasındaki Fark	6
Şekil 2. Hücrelerde Kansere Neden Olan Değişiklikler.....	7
Şekil 3. Kolon Kanseri Oluşumu.....	12
Şekil 4. İçsel ve Dışsal Yoldan Apoptozisin Oluşumu	15
Şekil 5. Bir Hücrede Nekrozis ve Apoptozis Oluşumunun Kıyaslanması	17
Şekil 6. Haplophyllum Buxbaumii Bitkisi	18
Şekil 7. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 ve HUVEC Hücrelerinin MTT Analizi.....	31
Şekil 8. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Evreleri.....	31
Şekil 9. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HÜVEC Hücrelerinin Hücre Döngüsü Evreleri.....	32
Şekil 10. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin AO/EB Floresans Boyama Görüntüleri.....	33
Şekil 11. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin AO/EB Floresans Boyama Görüntüleri.....	33
Şekil 12. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi.....	34
Şekil 13. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi	35
Şekil 14. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Mitokondri Membrane Potansiyel Ölçüm Sonuçları	36
Şekil 15. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin Mitokondri Membrane Potansiyel Ölçüm Sonuçları.....	36
Şekil 16. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin Reaktif Oksijen Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları	37
Şekil 17. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin Reaktif Oksijen Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları.....	37

TABLO DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kanser Oluşumunda Risk Faktörleri	13
Tablo 2. Kolon Kanseri Hücre Hattı Örnekleri.....	13
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	28
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	28
Tablo 5. Haplophyllum Buxbaumii Bitkisinin Hücreler Üzerindeki MTT Analizi.....	30



SİMGELER ve KISALTMALAR

HL	: Hodgkin
NHL	: Non-Hodgkin
CRC	: Kolorektal Kanser
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
MTT	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
JC-1	: Mitokondriyal membran Potansiyeli
ROS	: Serbest Reaktif Oksijen Ölçümü
HUVEC	: İnsan Göbek Ven Endotel Hücresi
HCT-16	: İnsan Kolon Kanser Hücresi
IC50	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
FBS	: Fetal Bovin Serum
DMEM	: Dulbecconun Modifiye Kartal Ortamı

ÖZET

HAPLOPHYLLUM BUXBAUMII BİTKİSİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Derya AKÇİÇEK

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Kolon kanseri Amerika'da erkek ve kadınlarda görülen üçüncü kanser türü olup, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Çoğunlukla ana tedavi seçeneği cerrahi sonrası kemoterapidir. Kemoterapide amaç kanser hücrelerinin tamamının yok edilmesini sağlamak olmasına rağmen, sağlıklı hücreler de hasar görmektedir. Bu nedenle normal hücreler üzerindeki toksik etkisi nisbeten düşük olan fitoterapik yöntemlere olan ilgi giderek artmaktadır. Bu çalışma; şu ana kadar antikanser özelliği bilinmeyen ve Şanlıurfa'da endemik olarak yetişen *Haplophyllum buxbaumii* bitkisinin antikanser özelliğinin tespit edilmesi amacıyla yapıldı. Çalışmamızda HCT-116 kolon kanseri hücre hattının ve normal sağlıklı (HUVEC) hücrelerin, *Haplophyllum buxbaumii* bitkisinden elde edilen ekstrelere maruziyeti sonucu oluşan sitotoksik etki MTT yöntemiyle gerçekleştirildi. Ekstrelerin, IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik özellikte olup olmadığı, flow sitometrik Annexin V yöntemi, hücre döngüsü üzerindeki etkisi; cell cycle analizi (BD Cycletest™ Plus DNA Reagent), intrasellüler ROS etkisi flow sitometri ve apoptotik morfolojik değişimde; floresans Acridine orange /Ethidium bromide boyama yöntemleri kullanıldı. Çalışma sonucunda HCT-116 hücrelerinde MTT yöntemiyle bulunan sitotoksik IC₅₀ değeri 14,17 µg/ml olarak tespit edildi. Normal hücrede ise IC₅₀ dozunun 70 µg/ml olduğu bulundu. Sitotoksik etkinin HCT-116 hücrelerinde apoptozis ile oluştuğu, HUVEC hücresinde herhangi bir apoptotik etkinin olmadığı sonucuna varıldı. Bu çalışma ile *Haplophyllum buxbaumii* bitki ekstresinin kolon kanserinde fitoterapiye yönelik katkı sağlayabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HCT-116, Kolon Kanseri, HUVEC, *Haplophyllum Buxbaumii*, Sitotoksikite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIANMAL EFFECTS OF HAPLOPHYLLUM BUXBAUMII PLANT ON COLON CANCER CELLS

Derya AKÇİÇEK

Medical Biochemistry, Master Thesis

Colon cancer is the third type of cancer in America and is the second most common cause of death in men and women. The main treatment option is chemotherapy after surgery. Although the aim of chemotherapy is to destroy all cancer cells, healthy cells are also damaged. Therefore, there is a growing interest in phytotherapeutic methods with a relatively low toxic effect on normal cells.

This study is done to determine the anticancer property of Haplophyllum buxbaumii plant, which is endemic in Şanlıurfa. In our study, the cytotoxic effect of HCT-116 colon cancer cell line and normal healthy (HUVEC) cells as a result of exposure to extracts from Haplophyllum buxbaumii plant were performed by MTT method. Using the IC 50 concentrations of the extracts, whether the cytotoxic effect is apoptotic, the flow cytometric Annexin V method, its effect on the cell cycle; cell cycle analysis (BD Cycletest™ Plus DNA Reagent), intracellular ROS effect in flow cytometry and apoptotic morphological change; fluorescence Acridine orange / Ethidium bromide staining methods were used. At the end of the study, IC50 value of cytotoxicity was determined as 14,17 elerg / ml in MTT method in HCT-116 cells. In normal cell IC50 dose was found to be 70 70g / ml. It was concluded that cytotoxicity was caused by apoptosis in HCT-116 cells and there is no apoptotic effect in HUVEC cell. In this study, it has been shown that Haplophyllum buxbaumii plant extract can contribute to phytotherapy in colon cancer.

Key words: HCT-116, Colon Cancer, HUVEC, Haplophyllum Buxbaumii, Cytotoxicity

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin normal süreçlerini düzenleyen mekanizmalarında meydana gelen mutasyonlar sonucu anormal bir şekilde bölünüp, çoğalarak yayılmasıdır. Sadece bir organı etkilemez aynı zamanda uzaktaki organlara da yayılarak normal işleyiş sürecini etkilemektedir. İnsanların farklı DNA'ya sahip olması nedeniyle kanser oluşumu herkeste farklı etkiler oluşturabilmektedir. Kanser, dünyadaki ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir ve erken teşhisi, hastaların hayatta kalma şansını önemli ölçüde arttırmaktadır. Dünyadaki kanserlerin oluşum insidansı yükseldiğinden; yeni, daha hızlı, yüksek özgünlükte ve teşhis oluşturacak hassas teknolojileri geliştirmek çok önemlidir. Kanser tedavisinde; tümörün organizmada lokalize olduğu dokuya, karakterine, gelişim evresine, hastanın fizyolojik durumuna göre çok farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemleri arasında, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, monoklonal antikor terapileri, gen terapisi ve cerrahi müdahale gibi yöntemlere başvurulmaktadır. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye spesifik bir hastalık olup etkilerinin farklı olması ile uygulanan tedavilerin kişiden kişiye değişkenlik gösterdiğinden tedavi yönteminde kesinlik belirtmek oldukça zordur.

Bu yöntemlerin yetersiz olmasından dolayı son zamanlarda alternatif tedavi yöntemi olarak bitkilerin kullanıldığı doğal kaynaklı yöntemlere yönelme artmıştır ve bu yönelme ile kanser görülme sıklığını azaldığı düşünülmektedir. Bu bitki kaynaklarının değerlendirilmesi spesifik özelliklerinin incelenmesi ve antikanser özelliklerinin belirlenmesi ile önemli derecedeki etkinin belirlenmesi için çalışılmıştır. Çalışmada kullanılacak olan bitki örnekleri araziden toplanıp, teşhisi yapıp, uygun metodlarla bitki ekstraları elde edildikten sonra bitki ekstralarının kanser için etkili tedavi yöntemi olarak kullanılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Haplophyllum Buxbaumii otsu bitki, seyrek, sağlam, daha tüysü yaprakları parlak sarı, dikdörtgen ile eliptik özelliğe sahiptir. Bu çalışmadaki amacımız; Belirlenen kolon kanseri hücreleri hazırlanarak, ekstralarda elde edilen Haplophyllum Buxbaumii bitkisi ile muamele edildi ve ileri moleküler deneyler ile araştırıldı.

Haplophyllum buxbaumii bitkisinden elde edilen ekstreler, kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini tespit için MTT yöntemi kullanıldı. Sitotoksik etkinliği tespit edilen ekstrelerin, IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik olup olmadığı; flow sitometrik Annexin V yöntemiyle, Cell Cycle analizi, İncellular ROS etkisi ve morfolojik olarak; Acridine orange /Ethidium bromide boyama yöntemleri ile tespit edildi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Vücutun oluşmasını sağlayan hücreler bir araya gelerek dokuları, dokuların bir araya gelmesiyle organlar oluşmaktadır. Oluşan doku ve organdaki hücreler belirli bir düzen içinde, aralarında iş bölümü yaparak bir araya gelirler. Organizmanın temel birimini oluşturan hücreler belirli bir hızda ve kontrollü bir şekilde çoğalırlar. Diğer yönden yaşlanan hücrelerde belirlenmiş hücre ölüm mekanizmaları ile programlı bir şekilde yıkıma uğramaktadırlar (1).

İnsanlardaki kalıtsal değişiklikler (mutasyonlar), kimyasalları aktive eden ve düzenleyen enzimlerin yapısını ve ekspresyonunu (karsinojen metabolizmasını) etkileyen bireysel genetik farklılıklar sonucu DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen genetik farklılıklar, kanser riskinin artışına neden olan başlıca genetik etkenlerdir (2).

Kanser günümüzde çok ciddi sağlık sorunudur. Kanser araştırılmasına, engellenme çalışmalarına ve tedavideki modern ilerlemeler olmasına rağmen bu hastalık dünya çapında milyonlarca insanı etkileyerek birçok ölümlere neden olmaktadır. 1990 yılından bu yana dünyada en sık görülen ve hayatın sonlanmasına en çok neden olan kanser türleri arasında akciğer, göğüs, kolon ve mide kanserlerinde %22 oranında artış göstermiştir (3).

Kanser, birçok ülkede ikinci sıradadır. Hastalık, hücrelerin çoğalmasındaki sinyallemeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılarını uzak tutmak, hücre ölümüne direnmek, ölümsüzlüğü sağlamak, tümörün kompleks süreci sırasında genomdaki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar. Kanser belirteçleri tümör oluşumu süreci boyunca maligniteyi çok aşamalı olarak tamamlar (4).

Her insanın farklı bir DNA'ya sahip olması nedeniyle kanser oluşumunda farklı etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle kanser kelimesinin yerine "onkolojik hastalıklar" denmesi daha uygun olabilir. Onkoloji, kanserin bütün türlerini kapsamaktadır (5).

Vücutta herhangi bir anormal çoğalma ile meydana gelen kanserin, davranış ve tedaviye yanıt yönünden farklılık gösteren birçok türü bulunmaktadır. Kontrol dışı sürekli bölünen ve çoğalan hücreler kümeler oluşturarak dokularda tümör oluşumuna neden olurlar (6).

Bir kitle ya da tümör oluşumuna neden olan hücre topluluğunun oluşumuna “neoplazi” denir. Neoplazinin kansere farklılaşmasındaki rolü hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve metastaz özelliği sonucu ortaya çıkar (7).

2.2. Kanser Oluşumu

Tümörler iki grupta incelenir. Benign tümörler, vücuttaki diğer dokulara veya vücudun uzak bölgelerine metastaz göstermeden kalırlarken, malign tümörler ise çevre dokulara veya kan ve lenf dolaşım sistemi ile vücuttaki diğer dokuları istila ederek artmasıyla karakterizedirler.

Kanseri tehlikeli olarak nitelendiren en önemli etken diğer dokularda yayılım göstermesidir. Benign tümörler genellikle tıbbi müdahalelerle tedavisi mümkün iken, malign tümörler ise vücuttaki diğer bölgeleri istila etmelerinden dolayı, hastalığın tedavi sürecini zorlaştırmaktadır ve hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasını engellemektedir (6).

Kanser, hastalığın tanı konma sürecinden itibaren hastalar açısından stres oluşturan bir süreçtir. Hastanın ilksel olarak tepkisi kabullenememe ile gelişen şok durumudur. Bu dönemde görülen; tanının yadsınması, katlanılması zor olan gerçeğin yarattığı endişe, korku ve çaresizlik duygularına karşı bir savunmadır. Sonrasında hayata tutunamama ve depresif ruh hali gelişebilir. Zamanla hasta bu gerçeği kabullenip, yaşam enerjisini ve ruhsal gücünü yeni hayatına adaptasyonu ile alışma süreci başlar (8).

Kanser temel olarak gen ekspresyonunun düzensiz olması nedeniyle, morfolojik olarak benzer ancak moleküler olarak patolojik değerlendirme ile farklı olan tümörleri ayırt etmek zordur. En erken teşhis için, bireysel kanser hastaları açısından mümkün olan en iyi tedavinin belirlenmesi ancak tümörlerdeki moleküler farklılıkların izlenmesini sağlayan non-invazif kanser biyobelirteçleri bulunması ile mümkün olacaktır (9, 10).

2.3. Tümörlerin Türedikleri Hücreye göre Sınıflandırılması

Kanserler, çeşitli hücelere (Karsinomalar, Sarkomalar, Lenfomalar ve Lösemi) ait olup, tümör hücrelerinin hangi hücrelerden geldiğine bağlı olarak sınıflandırılırlar.

2.2.1. Karsinomalar

Karsinomalar, epitel dokularda başlayan kanserlerdir. Epitel hücreler vücudun dış kısmını, iç kısımları ve boşlukları kaplayan hücrelerdir. Karsinomlar göğüs, akciğer, prostat ve kalın bağırsağı etkileyebilir ve bunların ortak olan birleşim alanlarında bulunabilir. Yetişkinlerde en yaygın kanser çeşididir.

- Adrenal bezleri etkileyen karsinom.
- Tiroid bezini etkileyen karsinom.
- Burun vefalkins'i etkileyen karsinom.
- Cilt kanserini tanımlayan malign melanom.
- Melanoma dışındaki deri karsinoması.
- Tükrük bezi, kolon, apendiksi, akciğer ve bronş, serviks ve idrar torbası.

2.2.2. Sarkomalar

Bağ dokusunun kanserleri Sarcomas olarak adlandırılır. Bu tür kanserler, yağ, kan damarları, sinirler, kemikler, kaslar, derin deri dokuları ve kıkırdak gibi vücudun bağ dokusunda gelişirler.

2.2.3. Lenfoma

Lenfoma vücudun bağışıklık sisteminde yer alan beyaz kan hücrelerinde gelişen bir kanserdir. İki büyük lenfoma türü vardır: Hodgkin (HL) ve non-Hodgkin (NHL) lenfomadır.

2.2.4. Lösemi

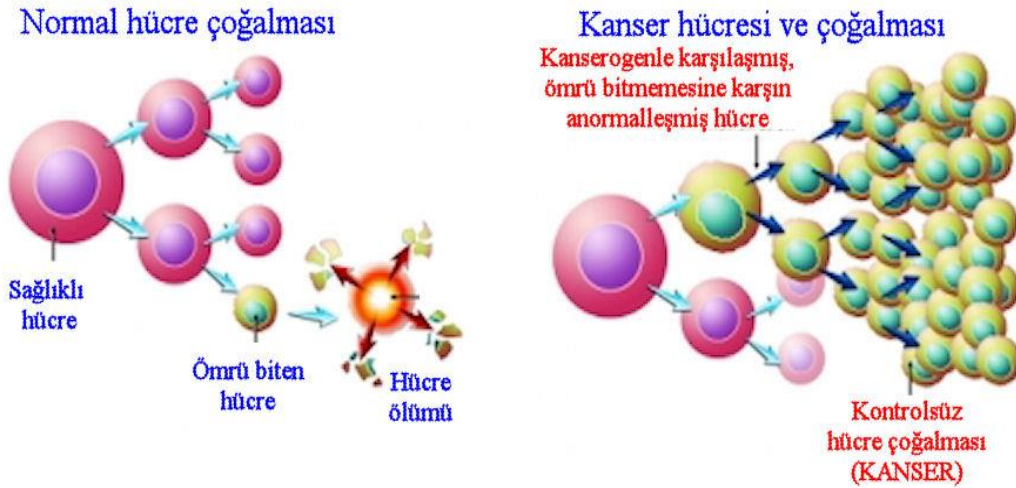
Lösemi beyaz kan hücrelerinde oluşan bir kanser türüdür ancak bazı lösemi başlangıcı diğer kan hücresi türlerinden başlamaktadır. Lösemi tümörlerinin belirtileri, anormal bir şekilde kan hücrelerinin çoğalması ve kanserli hücreler tarafından kemik iliğinin yer değiştirmesi ile ilgilidir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir süreç olduğundan dolayı değişik faktörler kanserin ortaya çıkmasını tetikler.

- Radyasyon
- Kimyasallar
- Virüsler

Bunların DNA’da hasar oluşturması ile mutasyonlar uyarılarak ortaya çıkmaktadır (11, 12).

2.4. Kanser Hücreleri Normal Hücrelerin Sahip Olmadığı Birçok Özelliğe Sahiptir

- Hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin sinyal alma sıklığı artmaktadır.
- Kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı sağlayan sinyal sistemleri mevcuttur.
- Yanındaki hücreye temas etmesi sonrasında bölünme durdurulamaz, büyümeye ve yayılmaya devam eder (5).
- Kanserleşen hücrelerde apoptoz mekanizması engellenmiştir.
- Kanserleşen hücrenin metabolizması değişir. Genellikle şeker kullanımı artar ve oksijensiz solunum (anaerobik solunum) oranı yükselir.
- Kanserleşen hücrelerin enzimleri miktar, yapı ve işlev bakımından değişikliğe maruz kalır.
- Kanserleşen hücrenin antijenik özellikleri değişir (6).

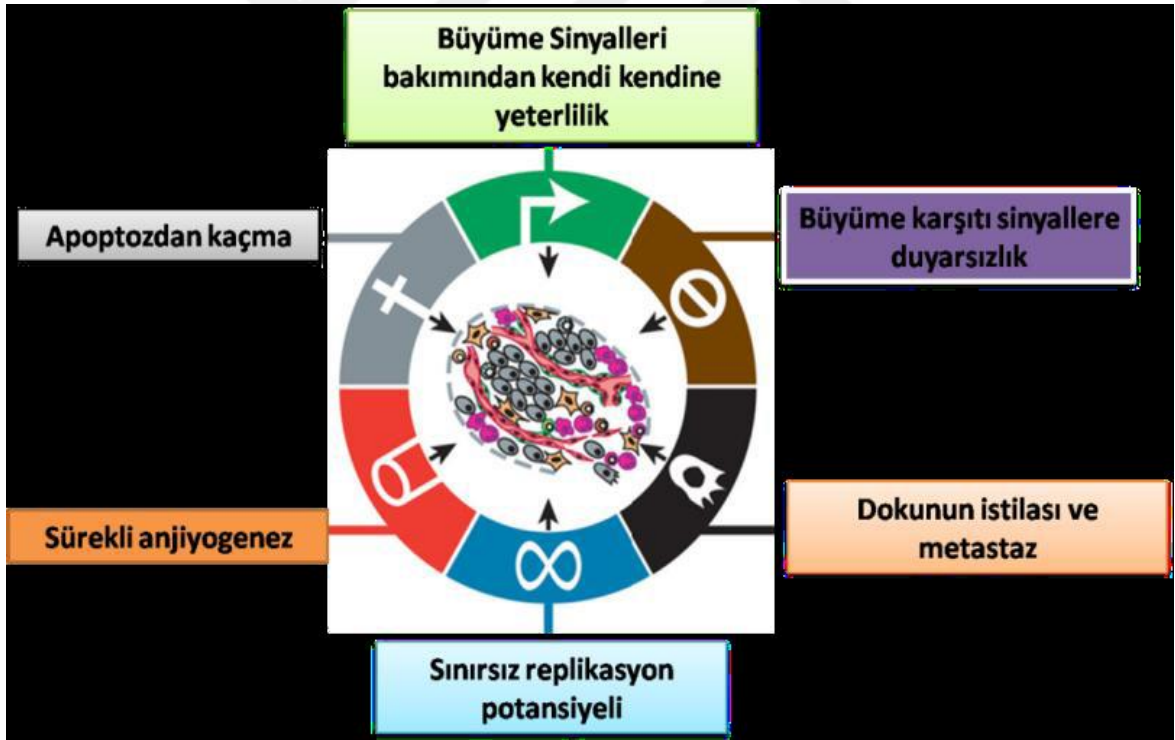


Şekil 1. Normal ve Kanser Hücresi Arasındaki Fark (13)

2.5. Kanserin Tanısı ve Belirtileri

Düzenli kontrollerin yapılması kanserin erken aşamasında önemli role sahip olsa da çoğu insan ancak ciddi sağlık problemleri sonrasında kontrollerini yaptırmaktadır. Ailesinde kanser geçmişi olanların rutin kontrolleri konusunda daha hassas olmaları gerekir. Röntgen, kan testleri, bilgisayarlı tomografi işlemleri, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sistemi, endoskopi ve genetik görüntüleme testleri kanserin erken teşhisinde yardımcı olan yöntemlerdir. Özellikle virüsler tarafından oluşturulan kanser türlerinin engellenebilmesi için aşılar geliştirilmektedir.

Ailesinde kanser hikayesi olan kişilerde kansere yatkınlığının belirlenmesi amacı ile yapılan genetik testler erken teşhis aşamasında önemlidir. Bu testlerin sonucu hastalığı oluşturan sebeplerin daha net şekilde belirlenebilmesini sağlar. Ancak bu testler sayesinde bilgiler elde edilebilse de her onkogen taşıyan kişide kanser otaya çıkmamaktadır (5, 12).



Şekil 2. Hücrelerde Kansere Neden Olan Değişiklikler (14)

2.6. Bir Kanserin Varlığına İşaret Edebilecek Belirtiler

- Öksürük
- Nefes darlığı
- Seste değişiklik
- Yutmada güçlük
- Ağrı ve halsizlik
- Hazımsızlık
- Aşırı kilo kaybı
- Bağırsak alışkanlıklarında bozukluk
- Vücut dışına (örn. meme başı ya da vajina) akıntı
- Yüksek ateş
- Her türlü normal olmayan kanama
- Hemoptizi
- Rektal kanama
- Menstrüasyonlar arası vajinal kanama
- Menopoz sonrası vajinal kanama
- Hematüri
- Derideki nevüste kanama (15).

2.7. Kansere Tedavisi

Kanser tedavisinde; tümörün organizmada olduğu dokuya, tümörün karakterine, evresine ve hastanın fizyolojik durumuna göre birçok tedavi yöntemi bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinde radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, monoklonal antikor terapileri, gen terapisi ve cerrahi müdahale gibi uygulanan yöntemler bulunmaktadır (6).

Her yöntemin spesifik avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin her insanda farklı etkiler oluşturmasından dolayı uygulanan tedavilerin de kişiden kişiye farklılık göstermesi olası bir durumdur (5).

Kanser, dünyadaki morbidite ve mortalitenin ana sebepleri arasındadır. 2012 yılında yaklaşık 14 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiştir. 2015 yılında 8,8 milyon kişinin ölümden kanser sorumluydu. Kanserden erken ölümleri azaltmak için, çözüm: “Entegre

Yaklaşım Bağlamında Kanser Önleme ve Kontrol” başlığı altında, Dünya Sağlık Asamblesi tarafından 2017 yılında kabul edilmiştir.

Kanserli hücreler normal büyümelerini kontrol eden doğal mekanizmalar olmaksızın değişime uğramış hücrelerdir. Onkogenez, çevresel kaynaklı veya kalıtsal genetik mutasyonlardan kaynaklanabilir. Normal büyümenin kontrol mekanizmalarına hücre reaksiyonunun inhibisyonuna yol açar ve neoplazm üreten hücre klonlarının hızlı gelişimine yol açar. Kanser tedavisi apoptozis indüksiyonunu ve tümör hücre proliferasyonu inhibisyonunu içerir.

Kanser hücrelerinde fizyolojik olarak altı önemli değişiklik gösterilmektedir: büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyen sinyallere karşı duyarsızlık, apoptoza direnç, sınırsız proliferatif potansiyel, sürekli anjiyogenez ve metastazdır. Kanser için mevcut tedavilerden biri, çoğunlukla ana tedavi seçeneğine ait olan kemoterapidir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin yok olmasını sağlarken ne yazık ki aynı zamanda sağlıklı hücrelerin ve dokuların da hasar görmesine veya ilaç direncinin gelişmesine yol açar (15, 16).

2.8. Kanser Tedavisinde Önemli Uygulamalar

Kanser tanısı, kanser yönetiminde ilk adımdır. Endoskopi, görüntüleme, histopatoloji, sitoloji ve laboratuvar araştırmaları ile dikkatli klinik değerlendirme ve teşhis muayenelerinin kombinasyonunu içerir.

Kanserin, özellikle de (Kolorektal kanser) CRC'nin tedavisinde cerrahi, kemoterapi (anti-kanser ilaçları kullanımı) veya radyoterapi (kanseri hücrelerini hedeflemek ve öldürmek için röntgen kullanımı), tek başına veya kombinasyon halinde hormonal tedavi gerekebilir. CRC tedavisi, hastalığın üç farklı evresine doğru yönlendirilebilir.

Birincisi tümör gelişimi, ikincisi orijinal kanser dokusu ve üçüncüsü sistemik hastalıktır. Yakın gelecekte, CRC tedavisinde en büyük avantaj birincil tümörün derecesinde olmayabilir ancak önleme, ilk keşfi ve tedavisi ile ilgili olarak hastalığın ilerlemesindeki ilk adımları belirlemede olabilir. En sık görülen ve avantajlı olan kolon kanseri için kullanılan kemoterapötik ilaçlardır ve tedavi etkinliği doza bağımlıdır (11, 17).

Kanser kemo-müdahalesi, invaziv kanserin kanserojen ilerlemesini tersine çevirmek, bastırmak veya önlemek için doğal kaynaklı, biyolojik ajan, sentetik veya kimyasal bileşiklerin kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Bu noktada ana tedavi şekli, ilaçların sistemik olarak verilmesini ve böylece tümör hücrelerine ulaşabilmelerini ve öldürebilmelerini içeren kemoterapidir. Ancak bu ilaçların çoğu hastalarda ciddi yan etkilere neden olmakta ve suboptimal seviyelerde kullanılmaları gerekmektedir. Bu nedenle, bazı bitki ekstreleri, bitkilerden elde edilen doğal bileşikler veya bunların türevleri gibi alternatif kimyasal önleyici maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (18).

Daha etkili antikanser ajanlarının geliştirilmesi devam eden farklı araştırma dalları ve tedavi yöntemlerini içermektedir. Doğal ürünler, halen kanser tedavisi için kullanılan ilaçların yaklaşık %75'ini sunan değerli bir hazinedir. Günümüz ilaçlarının etkilerine göre daha güçlü, daha seçici ve daha az toksik bileşikler keşfetmek amacıyla, antikanser ajanların araştırılması sürekli olarak farklı kaynaklardan gelen yeni doğal ürünler araştırılmaktadır (19).

2.9. Kanser Biyolojisi

Kanser, hücrenin istem dışı olarak çoğalması şeklinde tanımlanır. Hücrenin kontrollü bir şekilde çoğalması çeşitli faktörlerle meydana gelmektedir. Kanser başlangıç noktasına göre gruplandırılmak istenirse; kemik, kas veya bağ doku gibi mezenchimal dokulardan kaynaklanan sarkomlar; bağırsak mukozası, bronşlar veya meme dokusu gibi epitel dokudan kaynaklanan karsinomlar; kemik iliği, lenfatik sistem veya periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfoma gibi hematopoetik ve lenf dokusuna ait kötü huylu tümörlerdir (20).

2.10. Kanser Genetik Yapısı

Kanserleşme, hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu genlerde kalıcı değişimler sonucu oluşmaktadır. Kanserleşen hücrede, hasar denetim mekanizmaları kontrollü çalışmaz ve sürekli bölünmeye tetiklenir. Kanser aşamaları; genel anlamda başlama, tanıma, ilerleme ve metastaz olarak sınıflandırılmaktadır. Kanser oluşumu ilk olarak basit bir mutasyon ile oluşur bununla birlikte dış etmenlere bağlı olarak radyasyon, çeşitli kimyasallar gibi hücrenin kanserleşmesine neden olmaktadır (21).

Tek bir somatik hücrenin mutasyona uğraması ile başlayan, istemsiz ve hızlı bölünme ile devam eden tümör diye adlandırdığımız neoplazik yapının oluşumuna yol açar. Mutasyona uğrayan hücrelerin kanserleşmesinde tetikleyici etkiye sahip olan genler Onkogenler ve Tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılır (22, 23).

Onkogenler, hücreyi kontrolsüz bir şekilde bölünmesini uyarırken, tümör baskılayıcı genler ise meydana gelen mutasyonların kalıcı olmaması için hücre bölünmesini engeller. DNA replikasyonu ve DNA hasar onarımı sırasında meydana gelen mutasyonlar genomik kararsızlığa ve kanser oluşumuna neden olur (23).

Hücre bölünmesi ve çoğalmasında etkili olan, hasar tespitinin saptanması durumunda DNA onarımını sağlayan, DNA tamir mekanizmalarının yetersizliği ile onarımın gerçekleşmediği durumda apoptoz mekanizmasını öne süren gen gruplarına ise tümör baskılayıcı genler denir. Bunlardan en yaygını ve en çok çalışılanı TP53 genidir.

Önemli gen gruplarından farklı olarak, hasarlı DNA'nın onarılmasında gerekli olan proteinleri, hasarlı kısma çeken ve böylece gen fonksiyonun tekrardan elde edilmesini sağlayan DNA tamir genleridir (5, 16).

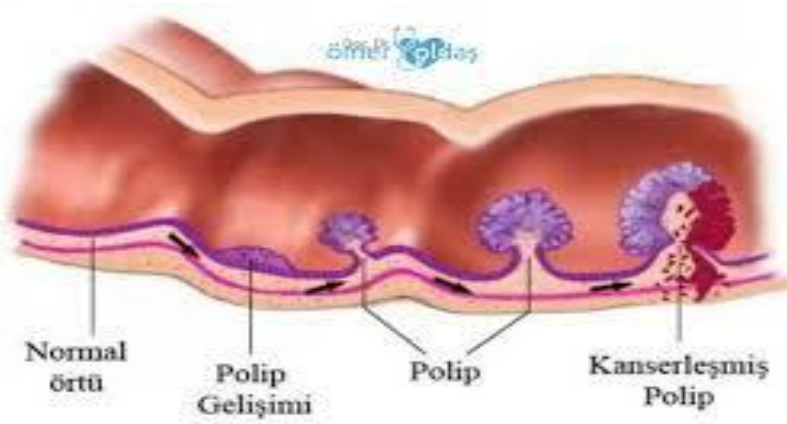
2.11. Kolon Kanseri ve Oluşumu

CRC, dünya genelinde en sık görülen kanserlerden biridir. Spesifik lokalizasyon, CRC tedavisi için önemli bir etken iken, metastazların tedavisinde önemli sorunlara yol açar. Bu nedenle, CRC'ye karşı yeni ve etkili tedavilerin tanımlanmasına büyük bir ihtiyaç vardır (12, 24).

Kanser hastaları arasında genellikle ilk sıralarda ölüm nedenlerinden biri olan CRC, heterojen bir hastalıktır ve evrimsel süreç boyunca birleşik moleküler sistemlerindeki sapmalar ile belirlenmiştir. Pozitif bir aile öyküsü, yaşam süresi boyunca artmış CRC teşhisi riski ile de güçlü bir bağlantı taşımaktadır. Bununla birlikte, CRC erken evrelerinde sıkıntılı bir hal alırken hastalığın ilerleyen aşamalarında semptomatik hale gelir. Uygun tarama yöntemleri oluşturmak için birçok araştırma yapılmasına rağmen, ancak bugüne kadar, bunlar invaziv kalmaktadır ve bu da sağlıklı popülasyonda daha düşük katılım oranlarına neden olmaktadır (10, 25).

CRC tedavisindeki iyileşmeler sağlanmış olmasına rağmen, ilerlemiş metastatik veya tekrarlayan CRC nedeniyle CRC'nin ölüm oranı hala yüksektir. Bu nedenle, CRC için var olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (10).

CRC dünyada kansere bağlı olarak gerçekleşen ölüm nedenlerinin ve oranlarının en önemli kaynakları arasındadır. İstatiksel verilere göre Amerika'da erkek ve kadınlarda en çok görülen üçüncü kanser türü olan CRC, ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2003 yılında akciğer ve meme kanserlerinden sonra CRC üçüncü sırada yer almaktadır ve bu değer 5,41/100.000 olarak belirtilmektedir (12, 26).



Şekil 3. Kolon Kanseri Oluşumu (27)

CRC'nin ortaya çıkışı dünyadaki tüm ülkelerde büyük farklılıklar göstermekle birlikte, Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da olmak üzere gelişmiş ülkelerde en çok oluşum oranı görülürken, en az oluşum oranları Afrika ve Asya'da belirlenmiştir. Bu coğrafi farklılıklar diyet ve çevresel faktörlerin çeşitliliğine bağlı olarak etkilemektedir. Yine de yeni gelişen ülkelerde CRC'nin ortaya çıkma oranlarında artış gözlemlenmektedir. Artan kanser oranları, diyetin daha çok hazır gıdaya bağlı olarak batı toplumundakine benzemesine, hareketsizlik ile obezite oluşumuna bağlanmaktadır (11, 26, 28).

CRC'nin kolonda oluşum bölgesine göre dağılımı da farklıdır ve son 25 yılda proksimal kolonda yer alan adenokarsinom oranı distal kolon ve rektumdaki insidans oranlarına göre hafifçe artmıştır. Bununla birlikte, yapılan bazı çalışmalarda, kanser dağılımının proksimal oluşumunu arttıran eğilimler fark edilmiştir, sağ taraflı lezyonlarda daha fazla artış

gözlemlenirken, sol taraflı lezyonlarda daha az yaygınlaştığı belirlenmiştir. Şu anda, bu dağılım oranı için geçerli bir sebep belirlenmemiştir. Çalışmalar ayrıca kolondaki belirlenen yapısal alt bölgelerde kolorektal adenokarsinomların görülme sıklıklarının farklı coğrafi ve kültürel değişiklikler ile risk faktörü nedenlerini oluşturarak ilişki kurulabileceğini düşündürmektedir. Bu coğrafi farklılıklar, genetik olarak belirlenmiş olup diğer yönden arka planda oluşturduğu etkilerin beslenme ve çevresel maruziyetlerden kaynaklandığı belirlenmiştir (11, 28).

Tablo 1. Kanser Oluşumunda Risk Faktörleri (11)

Risk Faktörü	Açıklamalar
Yaş	> 50
Diyet	- Yağdan zengin, posadan fakir
Kişisel öykü	- KR adenom (senkron ya da metakron) - KRK
Aile öyküsü	- Polipozis sendromları (FAP, Gardner, Turcot, Muir-Torre, Peutz-Jeghers, familyal juvenil polipozis) - HNPCC - KRK'li birinci dereceden akrabalar
Inflamatuvar barsak hastalıkları	- Ülseratif kolit (UK) - Crohn hastalığı

Yaş, polipin varlığı, inflamatuvar bağırsak rahatsızlığı, yaşam kalitesi ve genetik geçmişi gibi birçok faktör CRC riskiyle ilişkilendirilmiştir. Obezite, fiziksel hareketsizlik, dengesiz beslenme ve sigara içme, alkol kullanımı gibi çevresel faktörler tüm CRC koşullarının yaklaşık %80' ini oluşturmaktadır. Erken CRC herhangi bir belirti göstermeyebilir (11).

2.12. Kolon Kanseri Hücre Hatları ve Özellikleri

Birçok kolon kanser hücresi vardır. Çalışma yürüttüğümüz HCT-116 hücresi diğer kolon kanser hücresine göre biyogüvenlik seviyesi birinci sıradadır. Morfolojisi epitel olup, kültür özelliği yapışık ve dondurulmuş şekildedir. HCT -116 hücresinin karyotipi kromozom sayısı modal sayı 45 (% 62) ve poliploidler % 6.8 olan diploide yakındır. Kültür koşulları; Atmosfer: hava %95; karbon dioksit (CO₂) %5, Sıcaklık: 37 °C, büyüme koşulları: Büyüme ve kaplama verimliliği, besleyici bir murin fibroblast tabakası kullanılarak artırılır (29).

Tablo 2. Kolon Kanseri Hücre Hattı Örnekleri

Ticari ismi	Organizma	Morfoloji	Hastalık
HCT116 (ATCC CCL-247) (DNA yanlış eşleşme baz onarım eksikliği)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
LoVo (ATCC CCL-229)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
HT29 (ATCC HTB-38)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma
SW48 (ATCC CCL-231)	İnsan	Epitel	Kolorektal adenokarsinoma

2.13. Hücre Ölümü

Hücre ölümü programlanmış olarak apoptozis ve dış kaynaklı etki ile oluşan nekroz olmak üzere sınıflandırılır. Apoptozis, inflamasyonu önleyen aktif, programlı bir otonom hücresel parçalanma süreci olarak tanımlanır. Nekroz, enflamatuar hücresel içeriklerin kontrolsüz salınımı ile çevresel karışıklıklardan kaynaklanan pasif, tesadüfi hücre ölümü olarak karakterize edilmiştir. Apoptozun düzenlenmiş ve kontrollü bir süreç olduğu düşünülürse, belirli bulaşıcı süreçler sırasında ortaya çıkması büyük ilgi görmüştür (30).

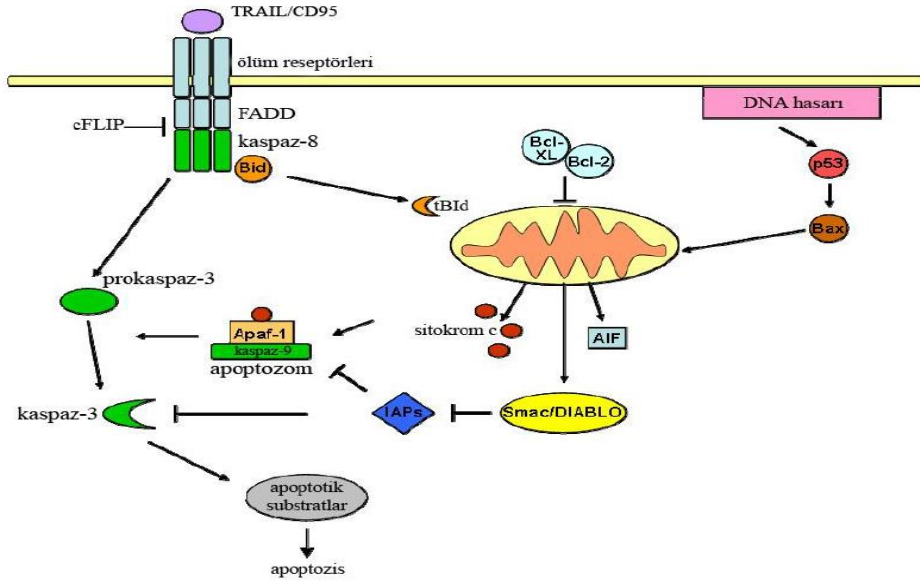
Bireysel hücre ölümü için tanımsal adlandırmayı sağlamak zor olmuştur. Toksikolojik patoloğlar genellikle “tek hücre nekrozu” ve “apoptoz” terimlerini birbirinin yerine kullanırlar. Fakat son yıllarda hücre ölüm mekanizmaları üzerine yapılan araştırmaların artması, apoptoz ve nekrozun farklı hücresel yolları içerdiği ve bu farklılıkların genel toksisite mekanizmalarını dikkate alırken önemli etkileri olabileceği ve bu nedenlerden ötürü apoptozun ayrı koşullarının anlaşılmasına yol açmıştır ve farklılaşma mümkün olduğunda nekroz terimi kullanılması daha uygundur (31).

2.14. Apoptozis

Apoptoz terimi 1972'de Kerr ve meslektaşları tarafından, embriyonik gelişim sırasında hücrelerin ortadan kaldırıldığı, sağlıklı yetişkin dokularda normal hücre döngüsünün ve hormon çekilmesi üzerine atrofinin gözlemlendiği spesifik hücre morfolojisi modelini

tanımlamak için önerilmiştir. Yunanca apoptoz kelimesi, bir ağaçtan yaprakların düşmesi anlamına gelmektedir. Bu terim, organizmanın tahribatı veya hasarı olmaksızın bir organizmanın tek tek bileşenlerinin çıkarılması gibi kontrollü bir fizyolojik süreci anlatır (30).

Vücudun her hücresinin, uygun fizyolojik koşullar altında intihar etme potansiyeli vardır. Hücre intiharı genel olarak apoptozise yol açan bir hücre ölüm yolunun aktivasyonu sonucu gerçekleşir (31).



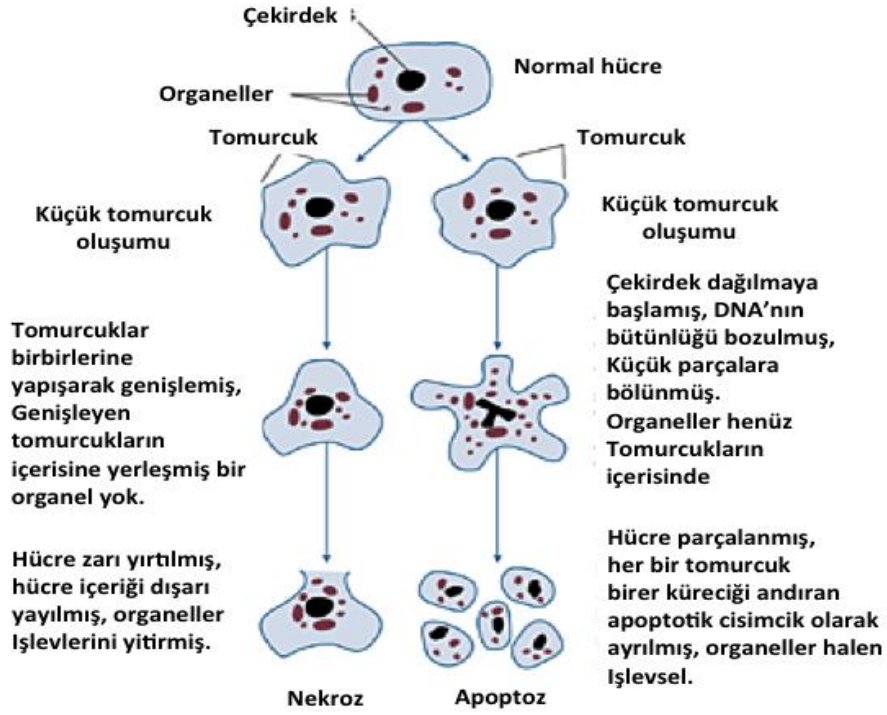
Şekil 4. İçsel ve Dışsal Yoldan Apoptozisin Oluşumu (32)

Çok hücreli organizmalarda, apoptozis gelişmekte olan ve yetişkin dokularda, normal doku homeostazisi sırasında ve farklı hücre saldırganlarının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Apoptozis mekanizması yaşlanan, ihtiyaç duyulmayan, enfekte olan, farklılaşmış veya hasar görmüş hücrelerin yok edilmesi için önemli bir mekanizmadır. Gelişim sırasında apoptoz, organ/doku gelişiminin normal sürecinde etkili ve gerekli olan bir bileşendir. Belli zamanlarda ve bölgelerde doku ve organların geliştirilmesinde ortaya çıkar. Geçici dokuları hedefleyerek dokuların gelişimsel yönden yeniden şekil kazanmasında rol oynar ve daha fazla doku farklılaşmasına izin verir. Genel olarak, apoptotik süreç tek hücreler, bitişik olmayan hücreler veya tek başına veya bir doku bölümü içinde dağılmış küçük hücreli kümeler halinde gerçekleşir (31, 33).

2.15. Nekrozis

Apoptoziste yer alan enzimatik mekanizmaların biyolojik önemi ve daha fazla öngörülmesi, bu süreci diğer mekanizmalarla meydana gelen hücre ölümlerinden ayırt etmenin önemini göstermektedir. Bilimsel iletişimdeki açıklığa duyulan ihtiyaç ve bilgilendirici test edilebilir hipotezler oluşturma hedefi, hücre ölümünün isimlendirilmesinde, apoptosis tarafından meydana gelmeyen hücre ölümleri için uygun isimlerin veya sınıflandırmaların eksikliğiyle ilgili önemli bir soruna yol açmaktadır. Nekroz günümüzde nonapoptotik olarak adlandırılan ve dış etkenler sonucu hücre ölümü için kullanılan terimdir. Bununla birlikte, hücre ölümü literatüründe sıklıkla göz ardı edilen önemli bir konu, ölmekte olan bir hücrede meydana gelen yapısal ve biyokimyasal süreçler ile ölümün son aşaması arasındaki ayrımdır. Nekroz, patologlar tarafından ölü doku veya hücrelerin varlığını belirlemek için kullanılır ve ölüm öncesi süreçlere bakılmaksızın ölmüş olduktan sonra hücrelerde meydana gelen değişikliklerdir. Bu nedenle nekroz, ölen bir hücrenin ve çevresindeki hücrelerin dengeye ulaştıktan sonra görülen morfolojik değişimdir. Bu nedenle, fagositozun yokluğunda, apoptotik cisimler bütünlüklerini kaybedebilir ve nekroza dönüşebilir (30, 33).

Tek hücrelerin ve bitişik hücrelerin nekrozu geri dönüşümsüzdür ve çoğu zaman akut hücresel hasardan kaynaklanır. Apoptozun aksine nekroz, tarihsel olarak, enerji gerektiren, genetik kontrollü bir süreç olarak görülmemiştir. Nekrozun temel sürecinde, hücre zarının bütünlüğünün kaybolmasını içerir. Hücre ve iyonların plazmolize uğraması ile organellerinin şişmesi hücre dışı iyonların ve akışkanın akmasına neden olur. Bir başka nekroz mekanizması, proteolitik enzimlerin lizozomlardan kaçmasına, sitoplazmaya girmesine ve hücresel parçaların düzensiz bir şekilde sindirilmesine ve hücrenin hasar oluşmasına neden olan organel membranların dağılımını içerir (31, 33).



Şekil 5. Bir hücrede nekrozis ve apoptozis oluşumunun kıyaslanması (34)

2.16. Haplophyllum Buxbaumii

Haplophyllum buxbaumii, çok yıllık otsu bir bitkidir. Bu bitki genellikle 6-7 çiçekli olan, İran-Turan elementinde kategorize edilmiştir. Step, çorak ve nadas arazide veya ekili arazilerde yetişebilen Haplophyllum buxbaumii, 1400 metre yüksekliklere ulaşan ekstrem yaşam olanağı bulabilen bir bitkidir. Genel dağılımı Suriye çölü ve İran olan Haplophyllum buxbaumii bitkisi Türkiye’de Şanlıurfa’ da görülmektedir (35).

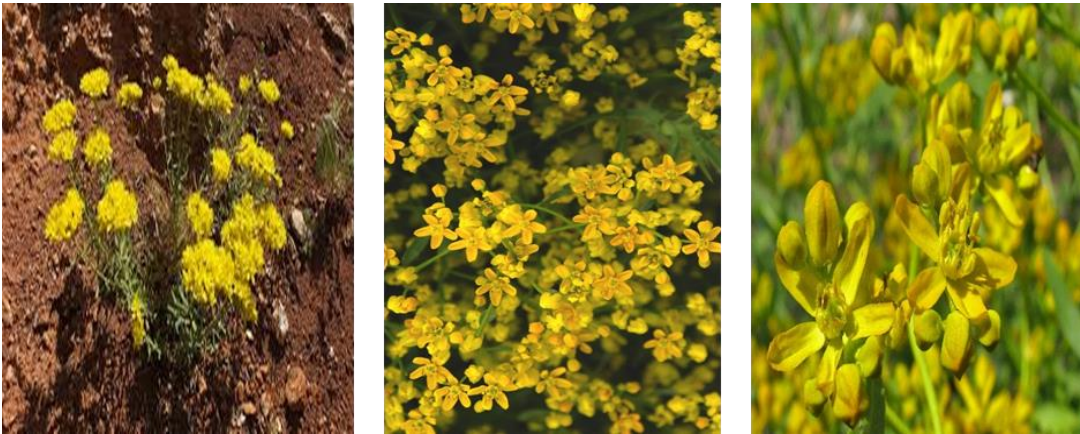
Genç yumurtalık her biri, her segmentin vücudunun \pm düzlemsel bezlerinden belirgin olarak daha büyük apikal bir tüberkül ile bölünür; yumurtalık geliştikçe ve sonunda olgun meyvelerde nadiren saptanabilen bu tüberküloz; Genç yumurtalık, tüm bezleri birbirine benzer; küçük ama belirgin apikal tüberkülü yoktur (36).

Haplophyllum tuberculatum türünde yapılan çalışmalarda esansiyel yağlarının oksidatif strese karşı potansiyel koruyucu aktivitesi olduğu, Haplophyllum tuberculatum esansiyel yağları yüksek temizleme aktivitesi gösterdiği ve insan astrositomu U373-MG hücrelerini H₂O₂ hasarına karşı koruduğu belirtilmiştir. Uçucu yağlar hücre ölümünü önlediği ve

H₂O₂'nin neden olduğu ROS üretimini inhibe ettiğini tespit edilmiştir. Polifenollerin ve Haplophyllum tuberculatum'un alkaloidlerinin antioksidan aktivitesi, β-karoten ağartma testi ile düşürüldüğü ve güç azaltma gücü testi ile değerlendirildi; iki madde, polifenollerin alkaloidlere kıyasla daha iyi bir aktivitesi ile iyi bir antioksidan aktivite gösterdiği, alloksan kaynaklı diyabetik sıçanların kanında glutasyon tayini ile antioksidan etki için değerlendirildiği sonucuna varılmıştır.

Haplophyllum tuberculatum'un hava kısımlarının etanolik özü, E vitamini ile karşılaştırıldığında anlamlı bir anti-oksidan aktivite (%98) sergilediğini gösterilmiştir. Diyabetik sıçanlarda azaltılmış glutasyon seviyesi, aynı zamanda, diabetik sıçanlarda bulunan uçucu yağların ve çiçeklerin esansiyel yağları ile büyük ölçüde restore edilmiştir.

Sitotoksik etkisine bakıldığında Haplophyllum tuberculatum özü G₀ / G₁ ve S fazlarında hücre döngüsü durmasını tetiklediği, Haplophyllum linifolium (Haplophyllum hispanicum) ekstraktlarının ve bileşiklerinin sitotoksiteleri, tripan mavisi dışlama testi ile belirlenen %95'ten daha fazla canlılığa sahip sıçanlardan elde edilen peritoneal lökositler üzerinde değerlendirildi. Hücre canlılığı, PMN mitokondriyal dehidrojenaz enzimlerinin MTT koyu mavi formazan'a dönüştürme kapasitesi ile değerlendirildi. Arilnaftalen liganlarının üzerinde sitotoksik olduğu görülmüştür (37).



Şekil 6. Haplophyllum Buxbaumii Bitkisi (35, 36)

2.17. Antikanser Özellik

Geleneksel şifalı bitkiler, dünyanın çeşitli yerlerinde birkaç bin yıldır kanser tedavisinde kullanılmaktadır ve bitkisel ilaçlar dünya çapında çeşitli hastalıkların tedavisinde ya tek

başına ya da geleneksel terapötiklerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Bitki bazlı biyoaktif bileşiklerin, kanserojen aktiviteyi çeşitli yollarla etkiledikleri bilinmektedir. Karsinojen metabolizmasını değiştirmek, DNA hasarını indüklemek, bağışıklık sistemini aktive etmek, hücre döngüsü ilerlemesini inhibe etmek ve apoptozisi teşvik etmektedir. Ayrıca kanser hücrelerine karşı kemoterapötik ve kemopreventif aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (4, 38).

Bugün kanser tedavisinde kullanılan ilaçların çoğu hücre DNA'sının çalışmasıyla etkileşime girerek aktifleşen sitotoksik ilaçlardır. Sitotoksik bileşiklerin tanımlanması, uzun bir süre boyunca anti-kanser terapisinin gelişimine yol açmıştır. Ancak kanser tedavisinde ileri düzey, tümör hücrelerini seçici olarak hedeflemek için kullanılabilen malignitelerin eşsiz biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile sınırlandırılmıştır (11).

Son beş yılda, modern moleküler biyoloji yöntemleri, yüksek verimli tarama, yapısal temelli araştırmalar da dahil olmak üzere bilimsel keşifler ve teknolojik gelişmeleri sağlamıştır.

İlaç tasarımıındaki ilerlemeler, insan genomlarının dizilişi için ilaç keşfini geliştirmiştir. Bununla birlikte, yeni ilaç geliştirme maliyetinin artması ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan etkili etkili ilaç sayısının azaltılması, onkoloji de dahil olmak üzere ilaç endüstrisi ve hasta sağlığı hizmetleri için bazı zorlukları ortaya çıkarmıştır (39).

En eski ve en etkili antikanser ajanlardan bazıları DNA'yı hedef alır. Tarihsel olarak, DNA hedefli kemoterapötiklerin gelişimi, II. Dünya Savaşı sırasında kimyasal savaşın yan etkilerine ilişkin gözlemsel bir araştırma olarak başladı. Çoğu DNA hedefli terapötikler, etkili oldukları için kanserli hücreleri tercih ederler. Proliferasyon oranı ve genomik instabilite, ancak benign hücreler de etkilenebilir. Normal ekzojen kimyasallar tarafından üretilen DNA hasarının bazal seviyelerini tolere edebilir (40, 41).

Geçmişte, farklı kanser engelleyici hedeflere ilişkin belirli bir molekül sınıfı antikanser aktivitesini tahmin etmekte kullanılmış ve çok sayıda nicel yapı-aktivite ilişkisi bazlı model geliştirilmiştir. Bunun aksine, çok çeşitli kanser hücresi hatlarına karşı çeşitli kimyasalların antikanser aktivitesini tahmin etmek için gerçekleştirilen girişimler sınırlı olarak kalmıştır (42, 43).

Son zamanlarda, doğal olarak edinilen bileşiklere olan ilgi yeniden artmıştır. Doğal maddelerdeki yenilenen ilgi, zengin biyo besin kaynağı veya biyo-aktif fito-kimyasal kaynağı olan gıda, sebze, meyve veya baharat olarak kullanılan bitkilere dikkati çekmiştir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin güvenliğini bulmak için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Son yıllarda, bitkilerde fito-kimyasal maddeler, kanser tedavisi ve önlenmesi için bir seçenek olarak sunulmaktadır. Bu bileşikler daha az yan etkilere sahip olduklarından, kanser karşıtı özellikleri için çalışılacak bir seçenektir, böylece bunları tamamlayıcı tedavi ve kanserin önlenmesi için kullanılabilirler (4).

Bitki kaynaklı doğal ürünler normal hücrelere toksik değildir ve daha iyi tolere edilir. Böylece modern ilaç keşfinin dikkatini çekmektedir. Tahmini rakamlar, bitki popülasyonunun en az 250.000 tür içerdiğini ve sadece yüzde 10'unun farmakolojik uygulamalar için araştırıldığını ortaya koymuştur. Kök, yaprak, çiçek, gövde ve kabukta bulunan fito-kimyasallar ve türevleri, insanın metabolik sistemlerinde çeşitli farmakolojik fonksiyonları yerine getirmektedir (43, 44).

Antikanser ilaçların yaklaşık %60'ı bitkiler, mikroorganizmalar, omurgalılar ve omurgasızlar gibi doğal kökenlidir. Birçok çalışma, kemoterapötik ilaçların çoğunun sitotoksik olduğunu ve spesifik olmayan bir şekilde yüksek proliferatif hücreleri hedeflediğini kanıtlamıştır. Bu daha sonra kanser hastalarının kötü prognozuna yol açmaktadır. Bu bağlamda, kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen ve kemorezan kanser hücrelerini duyarlı hale getiren yeni antikanser ajanlarının araştırılması ve geliştirilmesi hedeflenmektedir. Antikanser ilaçların çeşitli kaynakları arasında, mikroorganizmalar, üretim manipülasyonundaki kolaylık ve antibiyotik, enzim inhibitörleri ve biyosümfaktanlar gibi çeşitli biyoaktif metabolitleri üretme potansiyellerinden dolayı çok dikkat çekmiştir. Aslında, birçok çalışma biyosümfaktanların ümit vaat eden biyolojik aktiviteleri gösteren mikrobiyal metabolitler arasında olduğunu göstermiştir (42, 44).

Günümüzde, daha etkili antikanser ilaçlar bulmada yeni yaklaşımlardan biri, çift anti-proliferatif/antioksidan etki gösteren ajanların geliştirilmesidir. Yani bu, dirençlerin üstesinden gelebilir ve kanser hücrelerinde bulunan oksidatif stresin neden olduğu olumsuz etkiyi baskılayabilir. Tıbbi bitkiler halen yeni ve etkili antikanser ilaçlar için paha biçilmez bir kaynak olarak öngörülmektedir (45).

Medikal yönden malign bir neoplazm olarak bilinen kanser, düzensiz hücre büyümesi içeren geniş bir hastalık grubudur. Kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla malign tümörler vücudun yakın ve uzak kısımlarını işgal edebilirler. Melanom, cilt kanserinin en tehlikeli şeklidir. Gelişmiş aşamaları kullanılan tedavilere çok dirençlidir. Araştırmacılar sürekli olarak melanoma karşı alternatif yöntemler geliştirmektedirler. Bitkilerden izole edilen bazı bileşikler ilginç terapötik özellikler göstermektedir (46).

Bitkisel kaynaklı maddelerin geliştirilmesi, geleneksel tıbbın temelini oluşturmaktadır ve günümüzde bitkiler hala farmasötik ajanların önemli bir kaynağı olmaya devam etmektedir. Özellikle, doğal ürünler birkaç yıldır kanser kemoterapisinin temelini oluşturmuştur. Kombinatorial kimya çok çeşitli yeni ve sentetik ilaçlar sağlasa da doğal ürünler gelişmiş biyolojik özelliklere sahip yeni ajanların geliştirilmesi için etkili bileşikleri sunabilir. İlaç keşfindeki bu başarı, doğal kaynakların yüksek kimyasal çeşitliliğine bağlıdır; bununla birlikte, bitki popülasyonunda meydana gelen kimyasal değişkenlik, çok sayıda metabolit karakterizasyon süreçlerini zorlaştırmaktadır. Yeni aktif molekülleri keşfetmek için kullanılan geleneksel yöntemler, karmaşık bir yapıya ve uzun zaman dilimleri gibi farklı sakıncalara sahiptir. Bu araştırma ham bir ekstraktan aktif bir bileşik ortaya çıkmadan önce farklı ayırma ve izolasyon aşamaları gerektirmektedir. Son zamanlarda, bitkisel türevli karışımların taranması, biyolojik özelliklere sahip metabolitlerin hızlı seçiminde etkili bir yol haline gelmektedir (45, 47).

3. MATERİYAL ve METOD

Tez önerisi sunulmadan önce bir ön hazırlık çalışması ve literatür araştırması yapıldı. Bunun neticesinde çalışma devamında antikanser özellik tespiti için yapılan çalışmaları şu şekilde sıralayabiliriz.

- 1- Elde edilen bitki ekstraktlarının kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle tespit edildi.
- 2- Sitotoksik etkinliği tespit edilen ekstraktların, IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik olup olmadığı; flow sitometrik Annexin V yöntemiyle, Cell cycle analizi, JC-I ve ROS yöntemi, morfolojik olarak; Acridine orange /Ethidium bromide boyama yöntemleri ile tespit edildi.

3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Haplophyllum Buxbaumii* bitkisinin toprak üstü kısımları güneş alamayan ortamda kurutuldu. Kuruyan bitki örnekleri toz haline getirildikten sonra, 500 gr alınarak (1:1) oranda hazırlanan metanol: su, içerisinde 40 °C'de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra, küçük porsiyonlar haline getirilip 15 dk ultrasonikatör ile iyice homojenize edildikten sonra, whatman filtre ile süzülüp, 40 °C sıcaklığı geçmeyecek şekilde rotary evaporatör yardımıyla alkol solventleri uçurulup, liyofilizatörde toz haline getirilip ham MeOH ekstraktları elde edildi. Kuru ham MeOH ekstresi küçük porsiyonlar halinde hekzan ile yıkanarak lipofilik kısımlar, uçucu yağlar ve klorofilli kısımlar ekstreden uzaklaştırıldı. Birleştirilen hekzan porsiyonları da aynı şekilde rotary evaporatör ve liyofilizatör yardımıyla kurutulup hekzan ekstresi elde edildi. Yağdan arındırılmış kalıntı bu kez yine küçük porsiyonlar halinde diklorometanla yıkanarak serbest aglikonlar gibi orta polaritedeki bileşikler ekstrakte edildi. Aynı şekilde bu porsiyonlar da kurutularak diklorometan ekstresi elde edildi. Son olarak kalan oldukça polar kısım 1:1 oranında bütanol: su karışımıyla ekstraksiyonu yapıldı. Böylece şeker bileşikleri su fazına geçerken ağırlıklı olarak organik bileşiklerden oluşan ikincil metabolitler organik faz olan butanol içerisinde kalır. Bir ayırma hunisi ile ayrılan fazlar evaporatör ve liyofilizatörde kurutularak BuOH ekstraktları elde edildi.

3.2. Antikanser Özellik ile İlgili Yöntemler

3.2.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Firmalardan alınan hücre kültürü için kullandığımız malzemeler 160°C’de 60-90 dakika sterilize edildi. 0,22 µm ve 0,45 µm por çapına sahip filtreler kullanılarak kullanılan sıvı malzemelerin (Fetal Bovine Serum ve Penisilin-Antibiyotik) sterilizasyonu sağlandı. Çalışma ortamı steril kabin 10-15 dakika ultraviyole ışık ile steril edildi ve sonrasında %70 alkolle silindi. Steril edilen kabinde kullanılan malzemeler %70 alkolle silinerek içeri alındı. Çalışmanın türüne göre kullanılan malzemeler kabin içine alındı ve özellikle kabin içerisinde açılarak deney için hazır hale getirildi.

Çalışmada ATCC’den temin edilip stokladığımız; insan kolon kanser hücreleri (hct 116 ve ht-29) ve normal epitel hücreleri (HUVEC) kullanıldı. Kullanılan hücrelerin beslenmesi ve büyümesi için gerekli olan DMEM-F12 besi ortamı hazırlanırken %10 FBS ve (50 ml FBS, 5 ml L glutamat ve 5 ml penisilin) %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin kullanıldı. Hücreler -80 °C den (stok solüsyonu içerisinde dondurulmuş) alınarak su banyosunda 37°C’ de çözünmesi sağlandı. %70 lik alkol ile dezenfekte edilerek steril kabin içerisine alındı. Çözdürülen hücre solüsyonu, falkon tüpe alınan besi ortamına dikkatlice transfer edilip 5000 RPM de 5 dk santrifüj edildi, oluşan pellet ve süpernatant karıştırılmadan dikkatlice kabin içerisine alındı. Vakum sistemi kullanılarak pellete dokunmadan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet halindeki hücrelerin üzerine 2 ml ortam eklenip pipet ile homojenizasyonu sağlandı. 75 cm² ‘lik flaska 8 ml ortam eklenip üzerine hücre solüsyonu eklendi. + işareti ile flaskta yayılımı sağlandı. 37 °C ’de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamda inkübe edildi ve hücre çoğalması gözlemlendi.

Hücreler 75 cm² ‘lik flasklarda %80-100’e ulaştıktan sonra ortam çekildi, hücrelerin üzerine Tripsin-EDTA’ dan 2-3 ml eklendi. Flasklar 3-4 dakika 37°C etüvde bekletildi ve flaska tutunan hücrelerin kalkması sağlandı. Ardından flasklara Tripsin-EDTA’nın aktivitesini durdurmak için hazırlanan ortam DMEM eklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla incelendi. Hücreler kalktıktan sonra tripsini inaktive etmek için 1:3 oranında besi ortamı eklendi. Hücreler 50 ml’lik steril falkon tüpe alındı. 5000 RPM’de 5 dk santrifüj edilerek süpernatantları uzaklaştırıldı. Hücrelere MTT metodu uygulandı. Kullanılmayan

hücreler ise stok alındı. Stok alınan hücreler stok solüsyonu (50 ml stok solüsyonu için; 25 ml FBS, 20 ml non komplement DMEM, 5 ml DMSO karışımı filtreden geçirilerek kullanılır.) içerisine alınarak homojenize edildi ve cryo tüplere bölündü önce 30 dk -20°C de, sonra da -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması ve Sitotoksik Etkinliklerinin Saptanması

Hücreler sitotoksiste, çalışmalarında kullanılmadan önce Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Bunların aşamalarında hücreler tripsin ile kaldırıldı. Falkon tüpe alındı. 5.000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Üzerine 5 ml besiyeri eklenerek hafifçe pipetlenip süspansiyon hale getirildi. Hücre sayımında kullanılan Trypan-Blue boyasından 90 µl endorf tüpe alındı ve üzerine 10 µl hücre karışımı eklenerek hafifçe pipetaj yapıldı. Bu hücreler Thoma lamına damlatıldı ve ışık mikroskobu ile 10X büyütmede canlı hücre sayımı yapıldı. Lamdaki boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre süspansiyonunun ml'sindeki canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = ((\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı (10)}) \times 104) / 9.$$

3.2.3. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) hücre proliferasyon kiti kullanılarak bitki ekstralarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturmasını prensibine dayanarak yapıldı. Hücreler stoktan açılarak 25 cm³ flakslara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp hücre sayımı yapıldıktan sonra 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi ortamı uzaklaştırılıp, her bir ekstre için belirlenen 0-2,5-5-10-25-50-100-200 µg/ml dozlarında uygulandı ve sitotoksik doz hesaplaması yapıldı. Hücrelere uygulanan bitki ekstraları ardından 24 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 100 µl MTT solüsyonu eklendi. MTT solüsyonu 1mg/1ml oranında boya ve ortam karışımının vorteks ile homojen olması sağlandı ve ortalama 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldı, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile

çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. Uygulanan bitki ekstresi bulunan etkin değere göre madde uygulamasında hesaplama yapılarak çalışmalara uygulandı.

3.3. Apoptotik Etkinin Tespit Edilmesi

3.3.1. Apoptotik Etkisinin Cell Cycle (Hücre Döngüsü) ile Flow Sitometrik İncelenmesi

Hücre döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti (340242) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü şöyledir:

1. Hücreler 1.000.000 olacak şekilde sayıldı.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ul tripsin, 1ml FBS' li DMEM ile kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 5000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi, pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine tampon solüsyon (buffer solution) eklendi. (1ml buffer solution + 9 ml destile su ile seyreltildi) 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılarak, bu işlem iki defa tekrarlandı.
5. Hücre süspansiyonunun üzerine 250 µl solüsyon A (tripsin buffer) eklendi. Tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı (vorteks kullanılmadı).10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
6. Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solüsyon B (tripsin inhibitor ve RNase buffer) eklendi. Yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı.10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl solüsyon (DNA'ya bağlanan boya) eklenip ve yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı ve 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Hücre süspansiyonları daha sonra akım (flow) sitometre ile değerlendirilip, Kaluza Analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

3.3.2. Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik İncelenmesi

Hücre apoptozu FITC Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (BD, lot kodu: 556547) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri

ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD (kırmızı floresan) ile aynı anda boyatıldı.

1. Well plate'lere total hücre 1.000.000 olacak şekilde ekildi.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ml tripsin ve 1ml FCS ile kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml PBS eklenip, 5 saniye vorteksle pellet çözüldü, 5000 rpm de 5 dakika sanrifüj edilip, üst faz döküldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra, hücre süspansiyonlarının üzerine binding buffer eklendi. (1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) 5000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Hücre süspansiyonların üzerine 500 µl binding buffer eklendi. Kısaca vortekslenerek ve yeni tüplere 100 µl olacak şekilde transfer edildi.
6. 100 µl hücre süspansiyonun üzerine 5 µl Annexin, 5 µl 7AAD boya eklenip, hafif karıştırılarak 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücreler 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Hücre süspansiyonlarının üzerine 500 µl binding buffer (1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) eklendi.
9. Hücre süspansiyonları daha sonra akım (flow) sitometre ile değerlendirildi. Kaluza Analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

3.3.3. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi

Acridine orange /Ethidium bromide yönteminde; sitotoksik etkinliği tespit edilen ekstrelerin, IC₅₀ konsantrasyonları kullanılarak, gösterilen sitotoksik etkinin apoptotik olup olmadığı incelendi. Bu metotta bitki ekstraktları ile muamele edilmiş 12 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler 37°C den alındı, floresans mikroskop ile hücrelerin morfolojik görüntüleri alındı. Morfolojik görüntü alınırken hücreler kendi besi ortamı içerisinde incelendi. Acridin orange, Ethidium bromide görüntüsü alınırken öncelikle besi ortamı çekildi, her bir kuyucuğa görüntü alınacağı zaman boya solüsyonu eklendi. 20X oküler de görüntü alındı.

3.3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli (JC-1) Ölçümü

Mitokondri membran potansiyelini ölçmek için BD™, MitoScreen, JC-1, RUO-551302-BD Biosciences-US kiti kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü şöyledir:

1. Hücreler 1.000.000 olacak şekilde sayıldı.
2. 6'lık well plate'e ekilmiş olan hücreler 300 ul tripsin, 1ml FCS'li DMEM ile kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 1500 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip, pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Kitin çalışma solüsyonuna uygun olarak hücre süspansiyonun üzerine 500 µl PBS eklendi, vortekslenip karışımı sağlandı ve santrifüj edildi. Süpernatant döküldü üzerine 500µl JC -1 working solüsyonu eklendi, vortekslenip 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.
5. Bu iki defa tekrarlandı, 2ml assay buffer hücre solüsyonun üzerine eklendi yavaşça vortekslendi. 1000 RPM'de 5 dk santrifüj edilip dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı.
6. 1x lik 1 ml assay buffer hücre solüsyonun üzerine eklendi ve vortekslendi. 1000 RPM'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 500 µl assay buffer eklendi, vorteks edildi ve flowsitometri cihazında okutuldu.

3.3.5 ROS (Serbest Reaktif Oksijen) Ölçümü

Serbest Reaktif Oksijeni ölçmek için Muse™ Oxidative Stress Kit | MCH100111-Merck Millipore kiti kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü şöyledir:

1. Hücreler 1.000.000 olacak şekilde sayıldı.
2. 6'lık well plate ekilmiş olan hücreler 300 ul tripsin, 1ml FCS'li DMEM ile kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonun üzerine 500 µl PBS eklendi, vortekslenip karışımı sağlandı ve santrifüj edildi. Süpernatant döküldü.

5. Üzerine reagent 1 (assay buffer) ve reagent 2 (assay buffer intermediate solüsyonu) hazırlandı. 190 µl hücrelerin üzerine eklenip vortekslendi, 37°C de 30 dk inkübe edildi ve okutuldu.

Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeleri

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Sınıf II güvenlik kabini
İnvörted ışık mikroskobu
Soğutmalı santrifüj
Flouresans mikroskop ve görüntüleme sistemi
CO ₂ 'li inkübatör
Mikroplayt reader
Flow sitometri (BD facs via)
Spektrofotometre

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

6 kuyucuklu hücre kültür kapları (Isolab)
2.5-5-10-25 ml hacimli steril pipetler (Isolab)
Pipet uçları (Isolab)
Tripsin (Sigma)
EDTA (Sigma)
RPMI-1640 (Sigma)
DMSO (Sigma)
Penisilin/streptomisin (Sigma)
Annexin V kiti (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit BD)(556547)
96 kuyuculu hücre kültür kapları (Isolab)
1-10, 20-200, 100-1 000µl'lik otomatik pipetler (eppendorf)
Eppendorf tüpler (Isolab)
DMEM: F12 (Sigma)
Fötal Bovin serum (FBS) (Sigma)

L-Glutamin (Sigma)
Cell cycle kiti (BD 340242)
JC-1 kiti (BD MitoScreen)(551302)
ROS kiti (Merc Millipore)(MCH100111)



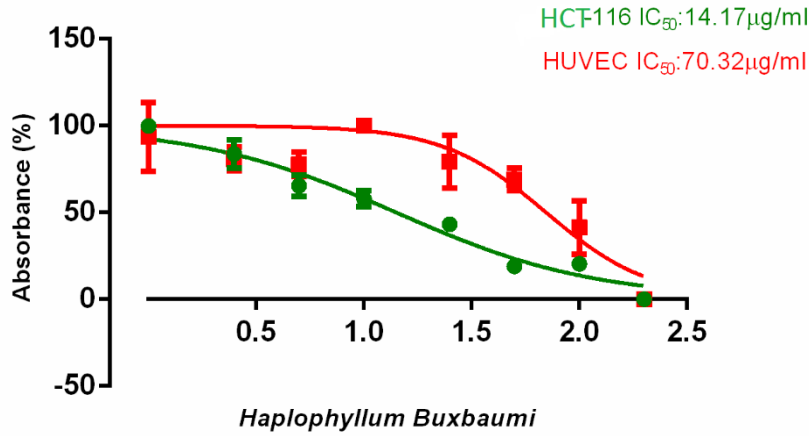
4. BULGULAR

4.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Tablo 5. Haplophyllum Buxbaumii Bitkisinin Hücreler Üzerindeki MTT Analizi

Kullanılan Hücreler	Haplophyllum Buxbaumii CH ₂ CL ₂ MTT Analizi (µg/ml)
DU-145(Prostat kanser hücresi)	22 µg/ml
HGC-27 (Gastrik kanser hücresi)	17 µg/ml
HCT-116 (Kolon kanser hücresi)	14 µg/ml
SNU-423(Karaciğer kanser hücresi)	18 µg/ml
MDA-MB 231(Meme kanser hücresi)	25 µg/ml
Huvec (İnsan Göbek Damar Endotel Hücresi)	70 µg/ml

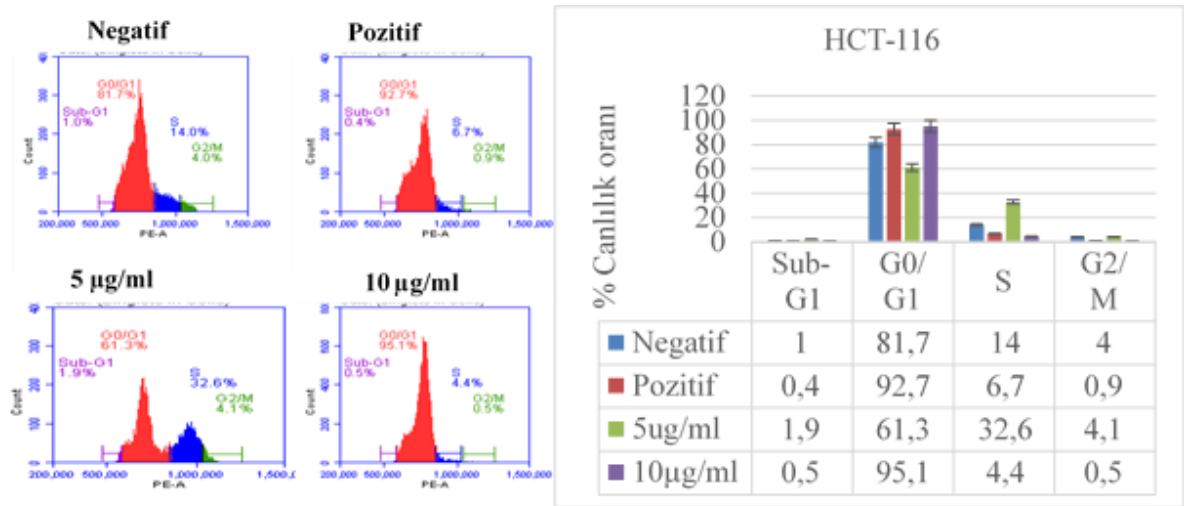
Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin diklorometan ile hazırlanan ekstresinin kolon kanseri hücreleri (HCT -116) ve normal kolon hücreleri (HUVEC) üzerine etkisi MTT yöntemi kullanılarak tespit edildi. MTT yönteminde; 24 saat Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin diklorometan ekstresine maruz bırakılan HCT 116 kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi (IC₅₀) 14.17 µg/ml olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisinin ise 70.32 µg/ml olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin diklorometan ekstresinin hemen hemen kemoterapik ilaca eşdeğer bir etki gösterdiği ve normal hücreye kemoterapik ilaçtan daha az zarar verdiği gözlemlendi.



Şekil 7. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 ve HUVEC Hücrelerinin MTT Analizi

4.2. Apoptotik Etkisinin Cell Cycle (Hücre Döngüsü) ile Flow Sitometrik İncelenmesi

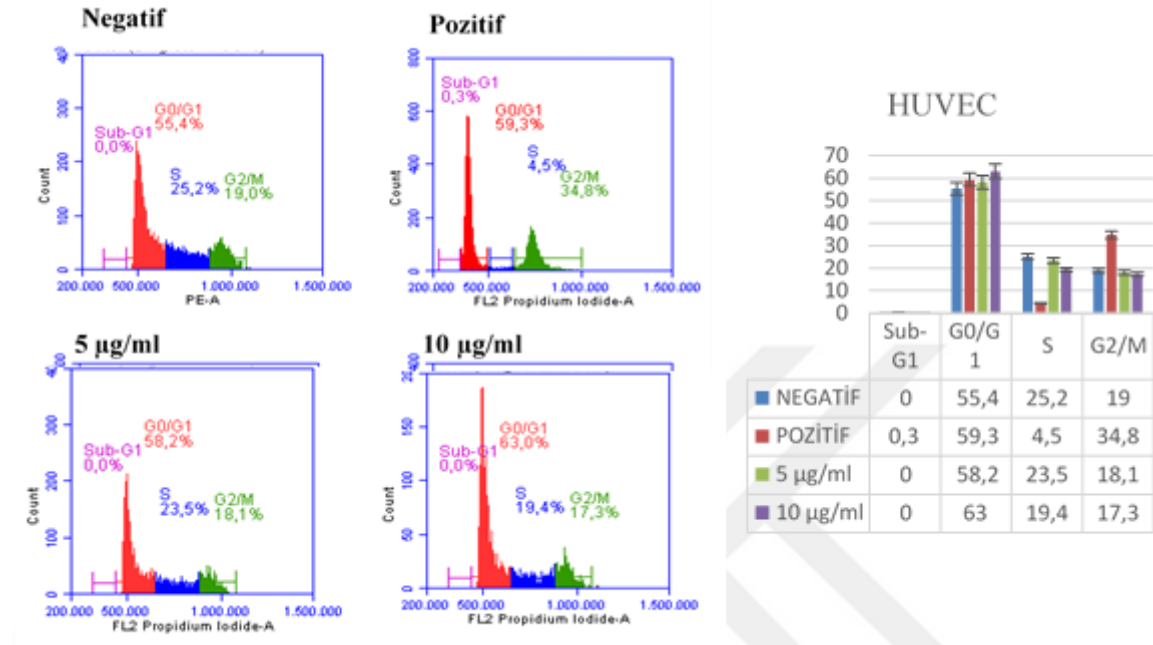
Hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri ile tespit edilen IC50 değerlerine göre 5 ve 10 µg/ml olacak şekilde HCT-116 ve HUVEC hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre döngüsü evrelerinde DNA içeriğine göre tespit eden PI (Propidium Iodide) boyası kullanılarak akış sitometrisi yöntemiyle incelendi. Alınan örnek için akış sitometrisinde 10.000 hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre döngüsü evrelerinin (G0/G1, S ve G2/M) yüzde hücre oranları tespit edildi.



ŞEKİL 8. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin Hücre Döngüsü Evreleri

Haplophyllum Buxbaumii ekstraktı ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinin 5 µg/ml'den başlayarak artan dozdan itibaren hücre bölünmesi üzerine etki gösterdiği ve doz

artışına bağlı olarak hücre bölünmesini yavaşlattığı saptanmıştır. 5 µg/ml dozunda hücre döngüsü evrelerinin oranları Sub-G1 fazında %1.9, GO/G1 fazında %61.3, S fazında %32 ve G2/M %4.1 olarak ve 10 µg/ml dozunda ise Sub-G1 fazında %0,5 GO/G1 fazında %95,1, S fazında %4.4 ve G2/M %0.5 oranlarında tespit edildi.



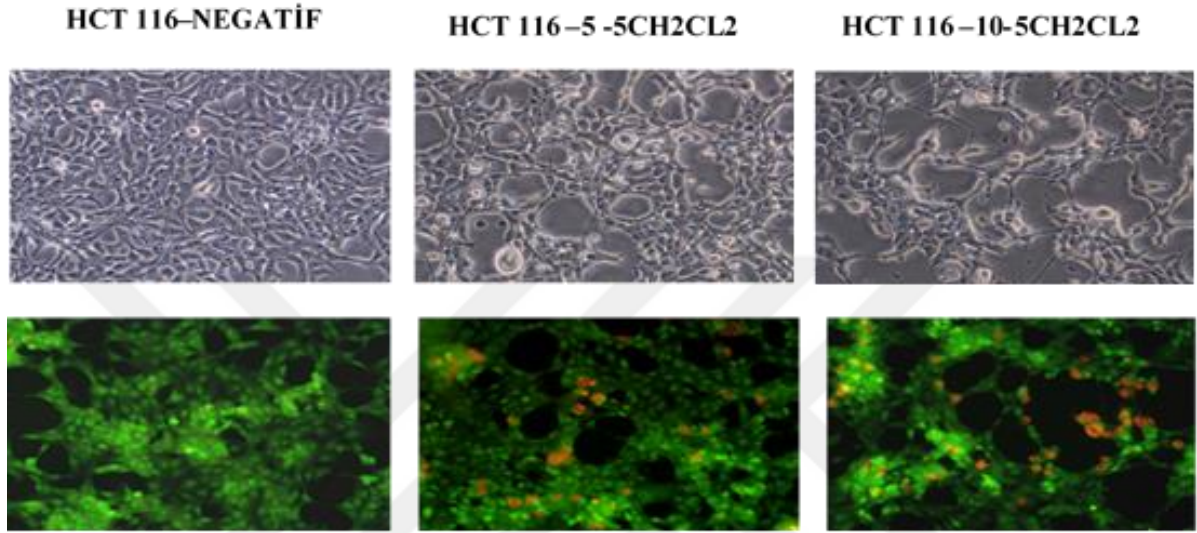
ŞEKİL 9. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin Hücre Döngüsü Evreleri

Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin ekstraktı HUVEC hücreleri üzerinde anlamlı bir etki göstermemiş ve hücreler bölünmeye devam etmiştir.

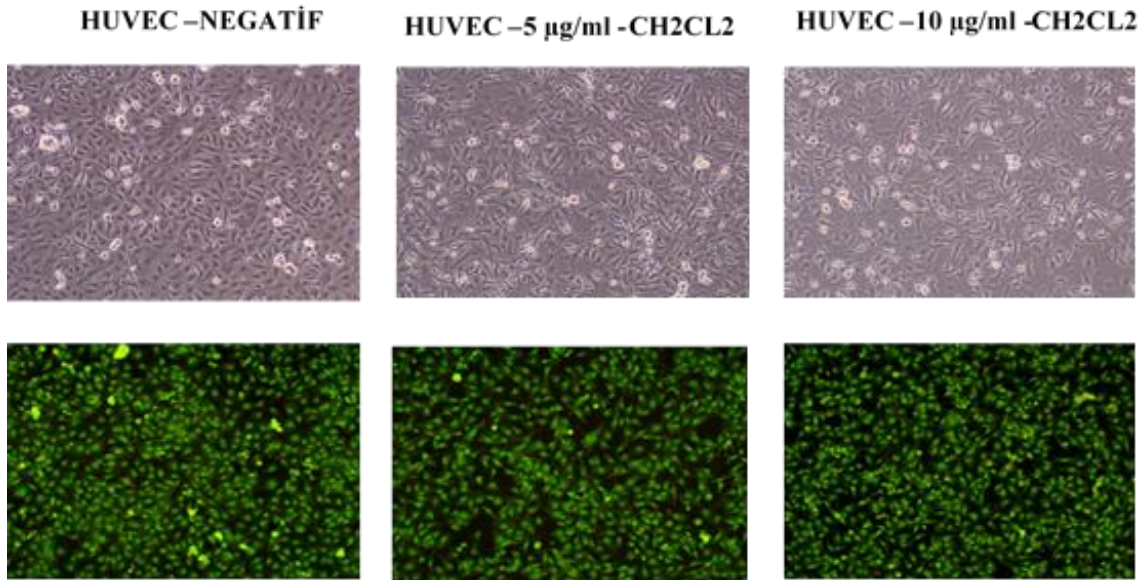
4.3. Acridine Orange /Ethidium Bromide Staining Metodu ile Apoptozisin Morfolojik Olarak Tespit Edilmesi

Haplophyllum Buxbaumii ekstresinin HCT-116 ve HUVEC hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek amacıyla Acridin orange, Ethidium bromide boyaması yapıldı. Bu boyama yönteminde amaç, canlı ve ölü hücreleri belirlemek iken aynı zamanda nükleusta ve hücre membranında apoptozis ve nekroza bağlı değişiklikleri incelemektir. Acridin orange boyası hem canlı hem ölü hücreleri boyarken, etidyum bromür ise sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyamaktadır. Yeşil renk boyanan hücreler; canlı hücreleri ve apoptozisin erken dönemindeki hücreleri ifade etmektedir. Ancak apoptozisin erken dönemindeki hücreleri canlı hücrelerden ayıran nükleuslarında kromatin kondensasyonu ve

nükleer fragmantasyonu gösteren parlak yeşil renkli noktalanmalardır. Geç apoptotik dönemdeki hücreler ise nekrotik hücreler gibi etidyum bromür ile turuncu renkte boyanırlar. Çalışmada hücreler acridin orange, ethidium bromide boya ları ile boyandıktan sonra floresan mikroskop kullanılarak morfolojik olarak değerlendirildi. Bu metodla elde edilen sonuçların diğer apoptotik testleri destekler nitelikte olduğu gözlemlendi.



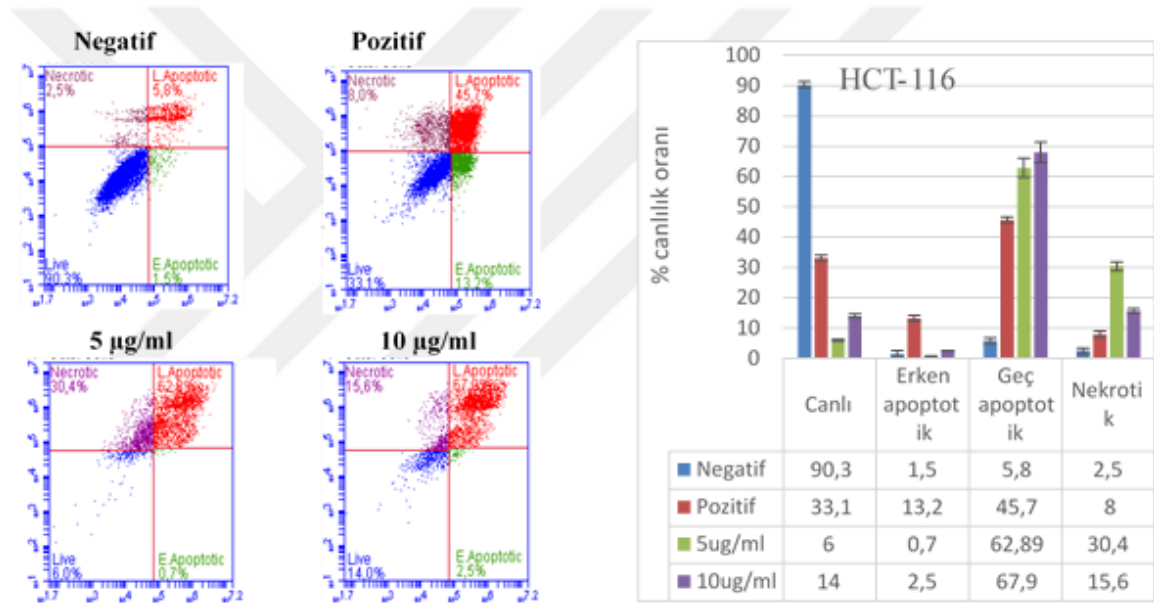
Şekil 10. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin AO/EB Floresans Boyama Görüntüleri.



Şekil 11. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin AO/EB Floresans Boyama Görüntüleri

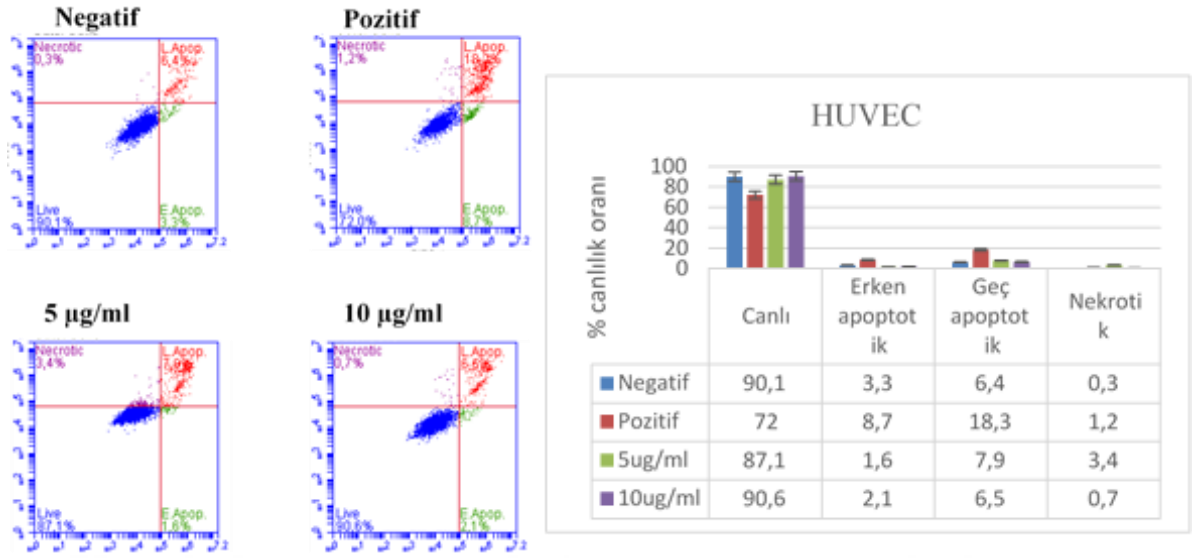
4.4. Flow Sitometrik Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi

Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin diklorometan ekstresinin tespit edilen IC50 değerlerine göre 5 ve 10 µg/ml olacak şekilde diklorometan ekstresine maruz bırakılan HCT-116 ve HUVEC hücreleri 24 saat inkübasyonun ardından Flow Sitometrik Annexin-V-PI boyamaları yapıldı. Bu boyamanın yapılmasında amaç; hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptotik hücre ölümü olup olmadığını belirlemektir. Alınan örnekler için Flow Sitometride 10.000 hücre sayımı gerçekleştirildi. Annexin-V (-) ve PI (-) hücreler sağlıklı, Annexin-V (+) ve PI (-) hücreler erken apoptotik, Annexin-V (+) ve PI (+) hücreler geç apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.



Şekil 12. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi

Haplophyllum Buxbaumii ekstresinin HCT-116 hücreleri üzerinde uygulanan dozların apoptotik etki gösterdiği, aynı zamanda doza bağlı olarak apoptotik etkisinin arttığı görülürken bu değerlerin gruplara göre toplam apoptotik hücre ölüm oranları 5 µg/ml (%63.6), 10 µg/ml (% 70.4) olduğu saptandı.

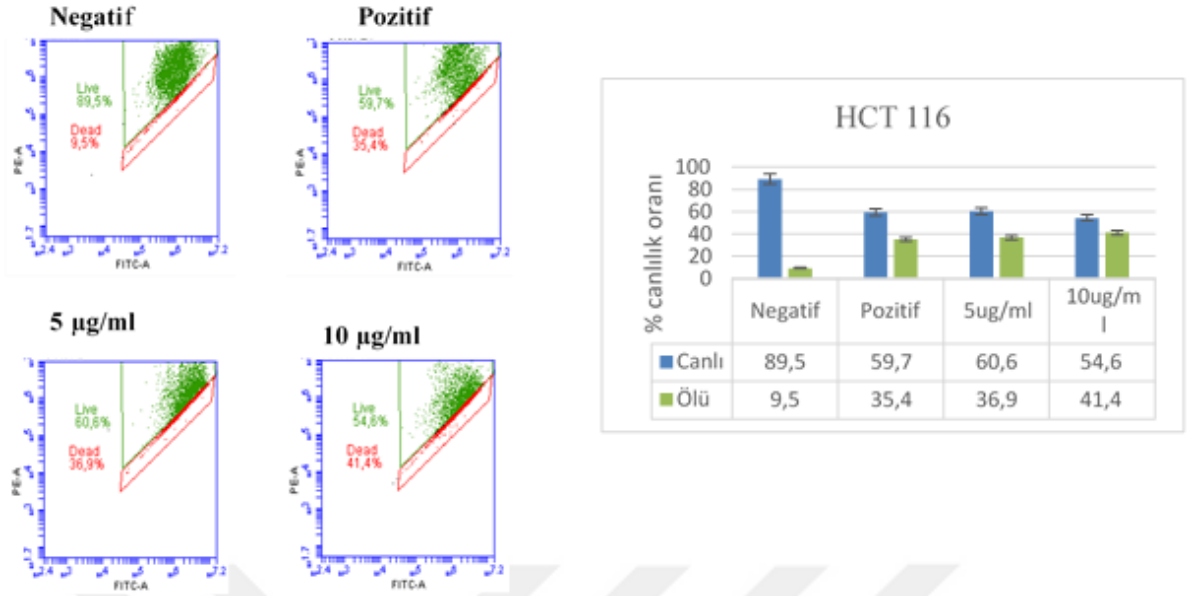


Şekil 13. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi

HUVEC hücreleri üzerinde ise uygulanan dozların apoptotik etki göstermediği saptandı. Bu değerlerin de 5 µg/ml (%95), 10 µg/ml (%8.6) olduğu gözlemlendi. Bu boyamada elde edilen sonuçların önceki deney sonuçlarını destekler nitelikte olduğu görüldü.

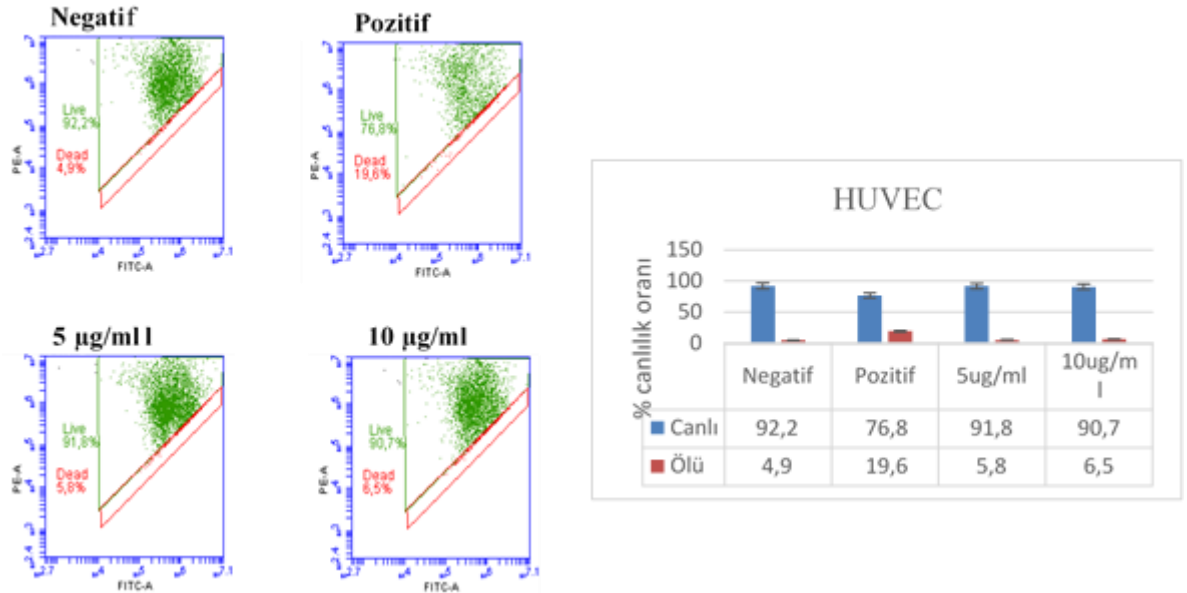
4.5. Flow Sitometrik Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) Analizi

Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin diklorometan ekstresinin IC50 değerlerine göre 5 ve 10 µg/ml olacak şekilde HCT-116 ve HUVEC hücrelerine uygulanan bitki ekstresi 24 saat inkübasyonunun ardından hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli analizi için JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro1,1',3,3'-tetramethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) boyası kullanılarak flow sitometri yöntemi ile incelendi. Her bir örnek için flow sitometride 10.000 hücre sayımı gerçekleştirildi. Mitokondriyal membran gözenekleri, fazla miktarda reaktif oksijen türünü sitoplazmaya geçirerek apoptozisin artmasına neden olmaktadır.



Şekil 14. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Mitokondri Membran Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Haplophyllum Buxbaumii ekstresi HCT-116 hücreleri üzerinde 5-10 µg/ml dozları mitokondri membran potansiyeli üzerinde etki gösterdiği ve 5 µg/ml’de yaşayan hücre oranı %60,6, ölü hücre oranı %36,9 iken 10 µg/ml’de yaşayan hücre oranı %54,6, ölü hücre oranı %41,4 oranında olduğu ve bunun doz artışına göre apoptotik etki gösterdiği tespit edildi.

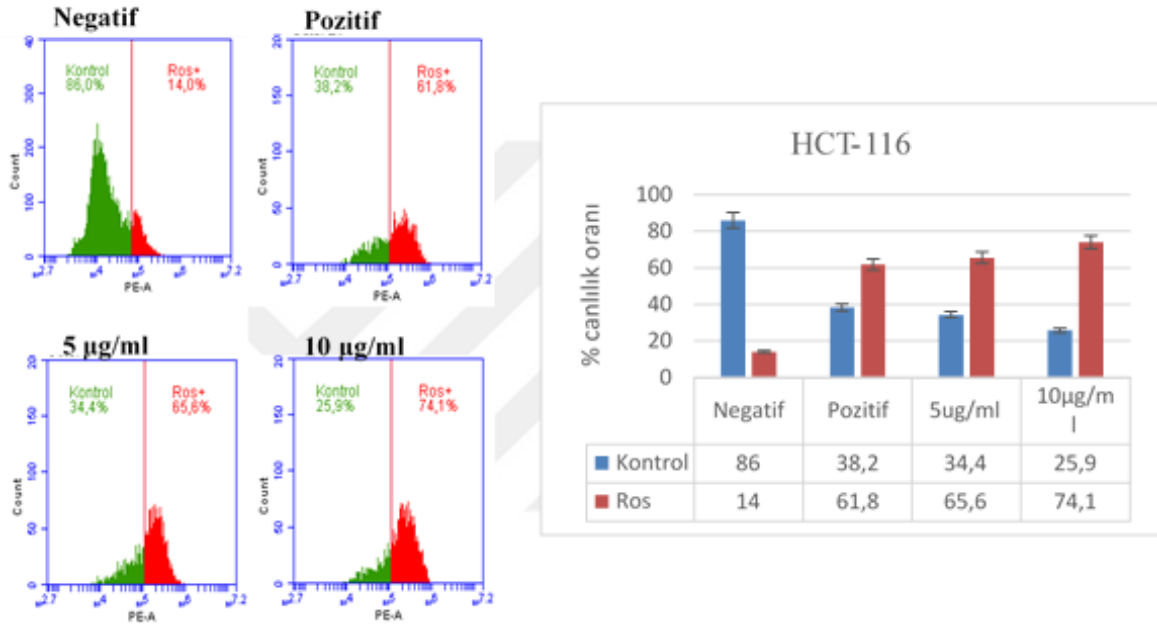


Şekil 15. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Mitokondri Membran Potansiyel Ölçüm Sonuçları

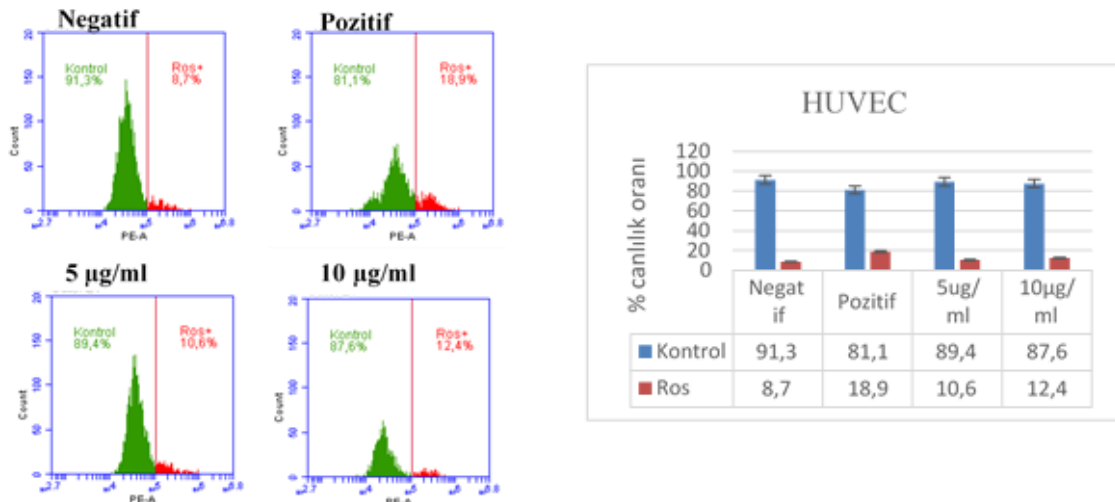
HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi 5-10 µg/ml dozunun mitokondri membran potansiyeli üzerinde anlamlı bir etki göstermediği bulundu.

4.6. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi (ROS) Analizi

Haplophyllum Buxbaumii ekstraktı HCT-116 ve HUVEC hücrelerinde meydana getirdiği hücre içi serbest radikal miktarı üzerindeki etkisi incelendiğinde HCT-116 hücresindeki değerlerin 5 µg/ml dozunda kontrol %34,4, ROS %65,6 ve 10 µg/ml dozunda kontrol %25,9, ROS %74,1 olduğu saptandı. Bu da bitki ekstresi uygulanan hücrelerde doza bağlı olarak serbest radikal miktarını arttırdığı gözlenirken bu artışın neredeyse kemoterapik maddeye eşdeğer olduğu gözlemlendi.



Şekil 16. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HCT-116 Hücrelerinin Reaktif Oksijen Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları



Şekil 17. Haplophyllum Buxbaumii Ekstraktı ile Muamele Edilen HUVEC Hücrelerinin Reaktif Oksijen Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları

HUVEC hücrelerinde ise uygulanan dozların apoptotik bir etki gözlemlenmediği saptandı.



5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Kolorektal kanser, tüm ülkelerde; Amerika Birleşik Devletlerin’de, Batılı ülkelerde, Avrupada yaygın bir şekilde görülmektedir. Kolon kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda yeni gelişen ve ölüme yol açan kanserler arasında ilk sıralar da yer almaktadır (48).

Kolon kanseri tedavisi, radyasyonla veya radyasyonla kemoterapi ile takip edilen tümörün cerrahi olarak çıkarılmasını gerektirir. Bununla birlikte, bu tür tedavilerin bilinen etkisi, çoğu durumda, alıcıların genel azalan sağlığı ve yaşam kalitesini kötüleştirmiştir. Erken teşhis sağkalımı arttırmış olsa da kolon kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların tüm hastalarda etkili olduğu kanıtlanmamıştır (49).

Kolon kanserinin yaygınlaşması ilgi çeken bir araştırma alanı haline gelmiştir. Toplumlar arası oluşan kolorektal kanserin oluşum hızının birçok farklı sebepleri bulunmaktadır. Yaş, aile kaynaklı, yüksek karbonhidratlı besinlerin tüketimi diyet, sigara, aşırı alkol tüketimi, az fiziksel hareket kolon kanser tümörlerinin oluşumunda etkili risk faktörleri arasındadır. Benzer şekilde, taze sebze ve meyvelerin belirli miktarlarda tüketilmesi düşük kanser oluşum hızıyla ilişkilendirilebilir (50, 51).

Son yıllarda yapılan çalışmalar da kanser tedavisinde, doğal olarak edinilen bileşiklere olan ilgide önemli bir artış görülmektedir. Doğal maddelerdeki zengin biyo besin kaynağı veya biyo-aktif fito-kimyasal kaynağı olan gıda, sebze, meyve ya da baharat olarak kullanılan bitkilerin özellikleri dikkat çekmiştir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin biyolojik olarak ne kadar güvenli olduğunu bulmak için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkilerdeki fito-kimyasal maddelerin kanseri önleme ve tedavisi için seçenek olarak sunmaktadır (4).

Bitkilerden elde edilen ilaçlar dünya genelinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitki özlü bileşiklerin özelliklerini araştırarak, kanserojen aktiviteyi çeşitli yollarla etkilediklerini bulmuşlardır (45).

Bitkiler ve onların türevleri eski çağlardan beri tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır. Birçok farklı kültürel kökenleri olan çeşitli bitkiler farklı uygulamalardan geçirilerek, hekimler tarafından birçok hastalıkların iyileştirilmesi için kullanılmaktadır. Bitki kaynaklı

ürünlerin kullanımı normal hücrelere toksik değildir ve daha iyi tolere edilir. Bu nedenle modern ilaç keşfinin dikkatini çekmektedir. Araştırılan tahmini rakamlar, bitki popülasyonunun en az 250.000 tür içerdiğini ve sadece yüzde 10'unun farmakolojik uygulamalar için araştırıldığını ortaya koymuştur. Kök, yaprak, çiçek, gövde ve kabukta bulunan fito-kimyasallar ve türevleri, insanın metabolik sistemlerinde çeşitli farmakolojik fonksiyonları yerine getirmektedir (4, 38, 39).

Yeni uygulanan ilaç üretimi ve inovasyon çalışmaları sonucunda kemoterapiden daha az yan etkisi olan fitoterapi kökenli ilaçlara ilgi daha da artmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların en büyük dezavantajı kişiye spesifik olmaması ve yan etkilerinin oldukça fazla olmasıdır. Bu nedenle kesin tedavi yönteminin uygulanmasından bahsetmek olanaksızdır.

Kolorektal kanser örneklerinde bugüne kadar birçok başarılı araştırma yapılmıştır. Bitki ekstraktlarının terapötik amaçlar için uygulanması, bitkiler, biyolojik aktiviteye sahip çok çeşitli kimyasal bileşiklerin kaynağı olduğu için geleneksel tıpta kullanılmıştır. Aslında, bu ekstraktların kanser gibi hastalıklar üzerindeki etkisi geniş bir şekilde incelenmektedir.

Amin Allaoui ve ark; kolorektal kanserin tedavisi ve ilerleyişinde *Trigonella foenum graecum* etkisine yönelik bir araştırma makalesi yayınlamıştır. Farklılaşmış ve farklılaşmamış insan kolonik adenokarsinomu hücreleri üzerinde etkisine bakılmıştır. Her iki hidrolizat, farklılaşmış hücrelerin büyümesini etkilememiş, erken apoptoz ve G1 fazında hücre döngüsü durması ile farklılaşmamış hücre çoğalmasında bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Bu, bir mitokondriyal membran geçirgenliği, sitoplazmaya sitokrom C salınımı ve kaspaz-3 aktivasyonu ile tetiklendiği gösterilmiştir. Ek olarak, çemen proteinlerinin hidrolizatları, ROS'un hücre içi seviyelerini düşürdüklerinden antioksidan aktivite sergilemiştir (52).

Jyothi MV ve ark; *Caralluma Adscendens*'in kolorektal kanser hücre hatlarında apoptozis aracılı sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiş. IC50 değerinin 10 µg / mL olduğu gösterilmiştir. Nükleer boyama ile apoptotik hücreler, koyu sitoplazmaya sahip oval kütleler ve aynı konsantrasyonda (10µg / mL) hem n-heksan hem de sulu metanolik özütlere için programlanmış hücre ölümünü gösteren yoğun yeşil nükleer kromatin fragmanları

olarak gözlemlendiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, sulu metanolik ekstre kanser hücre hattına karşı belirgin sitotoksik potansiyel göstermiştir (53).

Eda Becer ve ark; Kolşikum Pusillum özütünü kullanarak, kolon kanseri hücreleri üzerindeki antikanser aktivitelerini değerlendirmiş ve MTT yöntemi kullanılarak sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca İmmünohistokimyasal boyama, β -katenin bir sonucu olarak apoptotik yolların tetiklendiğini gösteren önemli ölçüde kaspaz-3 immünoreaktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (54).

Yapılan çalışmalardan biri de Fatma Guesm ve ark; Clematis Flammula'nın hidrofilik fraksiyonlarını karakterize edilmesini sağlamaktır. Buradaki veriler açıkça hidrolat fraksiyonlarının serbest radikal temizleyiciler olarak hareket ettiğini, zaman ve konsantrasyona bağlı bir şekilde, önemli bir sitotoksik etkiye sahip farklı hücre çizgilerinin çoğalmasını inhibe ettiğini açıkça göstermiştir. Hücreleri bu şekilde tedavi etmek, kolonik karsinomda ROS üretimi tarafından zayıflatılmış hücre büyümesini baskılama etkisine sahip olduğu belirtilmiştir. Dahası, HCT-116 hücrelerinde Clematis Flammula'nın sağkalım, proliferasyon, anjiyogenez ve in-vitro metastazı bastırdığı gen ekspresyonunu inhibe ederek bu terapotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Clematis flammula'nın etkisinin çeşitli biyolojik işlemlerin apoptoz ve G1 hücre döngüsü durmasının indüksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (55).

Chang ve ark; hücre fonksiyon deneyi, EGb-761 ile yapılan tedavinin, E-cadherin ekspresyon seviyesinin baskılanması yoluyla kolon kanseri hücrelerinin göç ve istilacı yeteneklerini doza bağlı bir şekilde baskıladığını doğrulamışlardır. LincRNA-p21'in, Ginkgo biloba ekstraktı EGb-761'in anti-kanser etkisine aracılık ettiği gösterilmiş; bu, EGb-761'in kanser tedavisinde fonksiyonel rolünün tanımlanmasına yardımcı olabileceği ve kolon kanserinde E-cadherin proteininin stabilize edilebildiği belirtilmiştir (56).

Bu çalışmada Haplophyllum Buxbaumii bitkisinin kolon kanseri hücreleri HCT-116 ve normal kolon hücreleri HUVEC üzerine; sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle incelendi. Hücre içi radikal değişimi ROS, hücrelerinin mitokondriyal membran potansiyeli analizi için JC-1, apoptotik ve nekrotik etkileri ise flow sitometride Annexin-V ve Cell Cycle yöntemi ile incelendi.

Haplophyllum Buxbaumii bitkisi ile yapılan sitotoksite deneyleri sonucunda; IC50 HCT-116 hücrelerinde 5-10 µg/ml olarak tespit edildi. Bulunan bu IC50 dozunun normal hücrelerde çok daha yüksek olduğu gözlemlendi. Hücre ölümünü belirlemek amacıyla hücreler ikili boyama yöntemiyle (Acridin orange, Ethidium bromide) floresans mikroskopunda görüntülendi. Bu yöntem ile bitki ekstresinin CH₂Cl₂ bileşiği ile muamele edilen kanser hücrelerinin hem morfolojik olarak yapısındaki bütünlüğün bozulduğu hem de membran bütünlüğünde gözle görülür bir parçalanma meydana geldiği görüldü. Bu ikili boyamanın sonucunda kolon kanseri hücrelerinde apoptozisin gerçekleştiği gözlenirken normal kolon hücrelerinde bitki ekstresinin CH₂Cl₂ bileşiğinin hücre yapısına zarar vermediği hücrenin normal yapısını ve hücre bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi. Ardından hücrelerdeki olası sitotoksik etkileri incelemek amacıyla; bitki ekstresinin CH₂Cl₂ bileşiğinin hücrelerde apoptotik yolağı aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozis mi gerçekleştiğini tespit etmek amacıyla Annexin V Apoptosis tayini yapıldı. Bitki ekstresinin CH₂Cl₂ bileşiğinin apoptotik yolağı aktiflediğini ve hücre ölüm oranında ciddi bir artışa neden olduğunu tespit ettik.

Ayrıca Mitokondri Membran Potansiyeli (JC-1) sonuçları da apoptotik mekanizmanın hangi metabolik yolak üzerinden düzenlendiğinin belirteci oldu. HCT-116 hücrelerinin doza bağlı olarak 5-10 µg/ml'de öldüğü tespit edildi ve aynı dozda muamele edilen HUVEC hücrelerinde anlamlı bir etki göstermediği gözlemlendi. Aynı zamanda bileşiğimizin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizmasını serbest radikal üretimini artırdığı da saptandı. Hücre döngüsü evrelerinde uygulanan dozun hücrelerin kontrole göre GO/G1 fazındaki hücrelerde artış olduğu gözlenirken, S fazında ise azalmanın olduğu tespit edildi. Ayrıca apoptozun tetiklendiğinin başka bir göstergesi olan Sub-G1 fazı HCT-116 hücrelerinde tespit edildi ve diğer verilerimiz desteklendi. HUVEC hücrelerinde ise üzerinde anlamlı bir etki göstermedi ve hücreler bölünmeye devam etti.

Her ne kadar CRC'nin fitoterapi ile sağaltımına yönelik pek çok çalışma yapılmış olsa bu çalışma Haplophyllum Buxbaumii bitki türü ekstraktının denendiği öncü çalışma niteliği taşımaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda bu bitkinin spesifik antikanser aktivitesinin olduğunu, insan sağlığı için önemli bir etkiye sahip olabileceği, aşırı serbest radikal oluşumuna bağlı olarak gerçekleşen kolon kanserinde koruyucu etkisi olabileceği tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen verileri analiz ettiğimizde Haplophyllum Buxbaumii bitki

ekstratlarının kolon kanseri tedavisinde inovatif ve özgün ilaç çalışmalarına ışık tutacağı kanısındayız.



6. KAYNAKLAR

1. Tezer K, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler, Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi. Ankara: 1992; 1-141.
2. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Ankara: 2008; 282-295.
3. Özmen A. Aydın Yöresinde Yetişen Bazı Endemik Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Aydın: 2008; 1-99.
4. Ska AC, Kulbacka J, Harasym J, Dubı M, Magiera S, Saczko J. Anticancer Activity Of Oat B-Glucan in Combination with Electroporation on Human Cancer Cells. 2017; 74: 616-623.
5. Baykara O. Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment. İstanbul: 2015; 1-52.
6. Seçme M. Oleuropeinin Sh-Sy5y Nöroblastom Hücre Hattında Çeşitli Hücreyel Yolaklardaki Etkisinin Belirlenmesi. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Denizli: 2014; 1-121.
7. Koç LY, Bazı Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal, Antioksidan ve Sitotoksik Etkileriyle, Kanserli Dokularda Adenozin Deaminaz Enzimi Üzerine Etkisi. Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi. Ankara: 2012; 1-169.
8. Ateşci1 FÇ, Oğuzhanoglu NK, Baltalarlı B, Karadağ F, Ozdel O, Karagöz N. Psychiatric Disorders in Cancer Patients and Associated Factors. Turk Psikiyatri Dergisi. 2003; 14(2):145-152.
9. Sitarek P, Kowalczyk T, Santangelo S, Białas AJ, Toma M, Wiczfinska J, Sliwinski T, Skala E. The Extract of Leonurus sibiricus Transgenic Roots with AtPAP1 Transcriptional Factor Induces Apoptosis via DNA Damage and Down Regulation of Selected Epigenetic Factors in Human Cancer Cells. Neurochemical Research. 2018; 43:1363–1370.
10. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya1 T. Circulating Microrna in Body Fluid: A New Potential Biomarker for Cancer Diagnosis and Prognosis. National Cancer Center Research. 2010; 101:2087-92.

11. Fang W, Tong Z, Zhi Y, Jian-Chang W, Hong-Fen Shenc Dong Xiaoc Qiang Wanga, Ping Y, Hua-Cui C, He H, Zhuan-Peng C, Qing H, Wang-Lin L, Jie C. Gambogic Acid Efficiently Kills Stem-Like Colorectal Cancer Cells by Upregulating ZFP36 Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018; 46:829-846.
12. YIU AJ, YIU CY. Biomarkers in Colorectal Cancer. *Anticancer Research*. 2016; 36:1093-1102.
13. <https://www.bestepebloggers.com/wp-content/uploads/normal-ve-kanserli-h%C3%BCcre-cogalmasi.jpg>.
14. https://www.google.com/search?q=Normal+ve+Kanser+H%C3%BCcresi+Aras%C4%B1ndaki+Fark&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjGp9Tdg7DiAhUYAWMBHTCuDSkQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgdii=pevcrcHugh47tM:&imgsrc=O8v4Oy56BorqAM.
15. <http://www.saglikbilgisi.gen.tr/kanser-tanisi-nasil-konulur:2079>. 25 Nisan, 2016.
16. Hurley LH. DNA and its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2:188-200.
17. Centelles JJ. General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncology*. 2012; 139268.
18. Tomasz M, Nski K, Adamczak A. Anticancer Activity of Bacterial Proteins and Peptides. *Pharmaceutics*. 2018; 10:54.
19. Gao J, Yang X, Yin W, Li M. Gallnuts A Potential Treasure in Anticancer Drug Discovery. 2018; 1-9.
20. Nussbaum RL, McInnes, RR, Willard, HF, Boerkoel, CF. *Tıbbi Genetik*. 2005.
21. Nordling C. A New Theory on The Cancer-Inducing Mechanism. *British Journal of Cancer*. 1953; 7:68-72.
22. Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W. Colorectal Adenoma to Carcinoma Progression Follows Multiple Pathways of Chromosomal Instability. *Gastroenterology*. 2002; 123:1109-1119.
23. Erdem SS. Evaluation of Digoxin as Anti-Cancer Agent in Colon Cancer Cell Line. Istanbul: 2017.

24. Coşkun A, Hadi M, Ayvaz Ö, Yükselen V, Ergin F, Karaoğlu AÖ. Aydın Bölgesindeki Kolon Kanserlerinin Özellikleri. Nobel Medicus. Aydın: 1-25.
25. Graziani V, Scognamiglio M, Belli V, Esposito A, Abrosca BD, Chambery A, Russo R, Panella M, Russo A, Ciardiello F, Troiani T, Potenza N, Fiorentino A. Metabolomic Approach for a Rapid Identification of Natural Products with Cytotoxic Activity Against Human Colorectal Cancer Cells. 2018; 5309.
26. Seydaoğlu G, Özer B, Arpacı N, Parsak CK, Eray İC. Trends in Colorectal Cancer by Subsite, Age and Gender over a 15-Year Period in Adana: 2008; 1-31.
27. https://www.google.com/search?q=kolon+kanseri+olu%C5%9Fumu&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjszq24gbDiAhWP3OAKHSGCAtcQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgsrc=IKvppIUqXpATtM.
28. <https://docplayer.biz.tr/3434058-Kolon-Kanseri-Epidemiyoloji-prof-dr-ahmet-dobrucali.html>.
29. <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-247.aspx#specifications>.
30. Elmore SA, Dixon D, Hailey JR, Harada T, Herbert RA, Maronpot RR, Nolte T, Rehg JE, Rittinghausen S, Rosol TJ, Satoh T, Vidal JD, Willard-Mack CL, Creasy DM. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. Author Manuscript. 2016; 44:173-188.
31. Modianol JF, Bellgrau D, Cutter GR, Lana SE, Ehrhart NP, Ehrhart EJ, Wilke VL, Charles JB, Munson S, Scott MC, Pozniak J, Carlson CS, Schaack J, Duke RC. Inflammation, Apoptosis, and Necrosis Induced by Neoadjuvant Fas Ligand Gene Therapy Improves Survival of Dogs with Spontaneous Bone Cancer. Molecular Therapy. 2012; 20:149.
32. Kuş Ç. Nöroblastomalarda Pi3-K Sağkalım Sinyal İletimini Değiştirerek Oluşan Apoptozis Sensitizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Adana: 2010; 1-78.
33. Susan Lk, Brad T. Cookson. Molecular and Cellular Biology Program and Departments of Laboratory Medicine and Microbiology, University of Washington, Seattle, Washington Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. 2005; 73:4.
34. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Erişim: ([http:// biyokimya uludag edu tr/ apoptozisdersnotu pdf](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf))Erişim tarihi. 2003; 4:2007.


35. http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=2308.2004.
36. <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=65&cins=380&tur=3599>.
37. Al-Snafi E. Pharmacological Importance of *Haplophyllum* Species Grown In Iraq- a Review.2018; 54-62.
38. Zarkavelisa G, Boussiosa S, Papadakia A, Katsanos KH, Christodoulouc DK, Pentheroudakisa G. Current and Future Biomarkers in Colorectal Cancer. *Annals of Gastroenterology*. 2017; 30:613-621.
39. Jingchun S, Qiang W, Yubo Z, Jingqi W, Qi L, Hua X. A Systematic Analysis of FDA-Approved Anticancer Drugs. From the International Conference on Intelligent Biology and Medicine (ICIBM). 2017; 11:87.
40. Chapter 1 Introduction: DNA as a Therapeutic Target in Cancer. 1-13
41. Park GH, Song HM, Park SB, Son HJ, Um Y, Kim HS, Jeong JB. Cytotoxic Activity of the Twigs of *Cinnamomum Cassia* Through the Suppression of Cell Proliferation and the Induction of Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *BMC Complementary*. 2018; 18:28.
42. Singh H, Kumar R, Singh S, Chaudhary K, Gautam A, Gajendra PS. Raghava. Prediction of Anticancer Molecules Using Hybrid Model Developed on Molecules Screened Against NCI-60 Cancer Cell Lines. *BMC cancer*. 2016; 16:77.
43. Wu YS, Ngai SC, Goh BH, Chan KG, Lee LH, Chuah LH. Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery. 2017; 8:761.
44. Singh S, Sharma B, Kanwar SS, Kumar A. Disclaimer Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development. 2016; 7:1667.
45. Koçyigit A, Koyuncu I, Dikilitas M, Bahedori F, Türkkkan B. Cytotoxic Genotoxic and Apoptotic Effects of Naringenin Oxime Relative to Naringenin on Normal and Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016; 6:872-880.
46. Tauchen J, Hum L, Bort L, Doskocil I, Jarosova V, Marsik P, Frankova A, Mirella Z, Peralta C, Elena M, Zans C, Havlik J, Lapcik O, Kokoska L. Screening of Medicinal

- Plants Traditionally Used in Peruvian Amazon for in Vitro Antioxidant and Anticancer Potential. *Natural Product Research*. 2018; 18:1-28.
47. Mahania SE, Rasoul M, Bahrasemanc S, Yaghoobic MM. In-Vitro Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Properties of *Sutureja Khuzestanica* on Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7) and Its Synergic Effects with Anticancer Drug Vincristine. 2018; 17:343-352.
48. Emir S, Sözen S, Kanat BH, Özkan Z, Yazar FM, Kavlakoğlu B, Bozan MB, Erol F. Mekanik Bağırsak Tıkanıklığına Neden Olan Kolorektal Kanselerde Morbidite ve Mortaliteye Etki Eden Faktörler. *International Journal of Basic&Clinical Medicine*. 2014; 2:18-23.
49. Cassiem W, Kock M. The Anti-Proliferative Effect of Apricot and Peach Kernel Extracts on Human Colon Cancer Cells in Vitro. 2019; 19:1-32.
50. Baykan A, Zorluoğlu A, Geçim E, Terzi C: Kolon ve Rektum Kanseri. *Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Derneği*. İstanbul: 2010; 1-64.
51. Gönen Ö. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*. 2004; 9:11-14.
52. Allaoui A, Gascón S, Benomar S, Quero J, Osada J, Nasri M, Rodríguez-Yoldi MJ, Boualga A. Protein Hydrolysates from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) as Nutraceutical Molecules in Colon Cancer Treatment. 2019; 28:11-4.
53. Jyothi MV, Bhargav E, Babu CN, Reddy KS, Kumar BP, Rao RP. Apoptosis Mediated Cytotoxic Effect of *Caralluma Adscendens Attenuata* on Colon (HT29) and Hepatic (HepG2) Cancer Cell Lines. 2019; 11:38-42.
54. Becer E , Hanoğlu DY , Kabadayı H , Hanoğlu A , Vatanserver S , Yavuz DÖ , Meriçli F , Meriçli AH . The Effect of *Colchicum Pusillum* in Human Colon Cancer Cells Via Wnt/B-Catenin Pathway. 2019; 686:213-219.
55. Guesmi F, Ben MH, Sahdeo P, Amit KT, Landoulsi A. In Vivo Pathogenesis of Colon Carcinoma and its Suppression by Hydrophilic Fractions of *Clematis Flammula* via Activation of TRAIL Death Machinery (Drs) Expression. 2019; 2182-2191.
56. Chang L, Liu T, Chai Z, Jie S, Li Z, Liu M, Dong W, Wang X, Zhou B. LincRNA-p21 Mediates the Anti-Cancer Effect of Ginkgo Biloba Extract EGB 761 by Stabilizing E-Cadherin Protein in Colon Cancer. 2018; 24: 9488-9496.

7. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 16/05/2019-21190

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 06.05.2019
OTURUM	: 05
SAAT	: 13:00

HRÜ/19.05.33	<p>Karar: Üniversitemiz Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL'in yürüttüğü olduğu "Haplophyllum Buxbaumi Bitkisinin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkisinin İncelenmesi" başlıklı çalışma için Etik kurul iznine gerek duyulmadığına;</p> <p>Oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p style="text-align: right;"> ASLI GİBİDİR Prof. Dr. Zehra YILMAZ Etik Kurul Başkanı</p>
--------------	--



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin

Numarası : 165302010
Adı, Soyadı : Derya AKÇİÇEK
Anabilim Dalı (Bölümü) : TIBBİ BİYOKİMYA
Programı : Yüksek Lisans Doktora
Tezin Adı: Haplophyllum Buxbaumii Bitkisinin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkisinin İncelenmesi

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen ‘‘Haplophyllum Buxbaumii Bitkisinin Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkisinin İncelenmesi’’ adlı çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 55 sayfalık kısmına ilişkin, 05/04/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %19’ dur.

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 aşmadığımı 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 almadığımı, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

10/04/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: Derya AKÇİÇEK

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım.

10/04/2019

Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Ataman GÖNEL

İmzası:

ID: 1109602852
Word Count: 10670
Submitted: 1

tez By Derya Ak

Similarity Index	Similarity by Source	
19%	Internet Sources:	13%
	Publications:	8%
	Student Papers:	11%

[exclude quoted](#) [exclude bibliography](#) [exclude small matches](#) [download](#)
[refresh](#) [print](#) mode: [quickview \(classic\)](#) [report](#)

3% match (student papers from 20-Dec-2017) Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University on 2017-12-20	☒
1% match (Internet from 11-Jun-2015) http://www.istanbulsaglik.gov.tr	☒
1% match (Internet from 11-Dec-2018) https://www.journalagent.com/bsbd/pdfs/BSBD-93823-REVIEW-BAYKARA.pdf	☒
1% match (Internet from 09-May-2016) http://www.turkcerrahi.com	☒
1% match (Internet from 10-Jan-2019) https://www.bilgihanemiz.com/2014/05/bagrsak-kanseri-neden-olur.html?showComment=1524883257536	☒
<1% match (Internet from 13-Jun-2016) http://docplayer.biz.tr	☒
<1% match (Internet from 26-Sep-2017) http://www.jbc.org	☒
<1% match (student papers from 22-Mar-2017) Submitted to Harran Üniversitesi on 2017-03-22	☒
<1% match (publications) Abhayraj Shrikrishna Joshi, Virender Singh, Avinash Yashwant Gahane, Ashwani Kumar Thakur. "Biodegradable nanoparticles containing mechanism based peptide inhibitors reduce polyglutamine aggregation in cell models and alleviate motor symptoms in Drosophila model of Huntington's disease", ACS Chemical Neuroscience, 2018	☒
<1% match (publications) Ching-Han Yu, Shu-Chen Chu, Shun-Fa Yang, Yih-Shou Hsieh, Chih-Yi Lee, Pei-Ni Chen. " Induction of apoptotic but not autophagic cell death by extracts on human oral cancer cells ", Journal of Cellular Physiology, 2019	☒
<1% match (Internet from 25-Aug-2018) http://www.mdpi.com	☒

https://www.turnitin.com/newreport_classic.asp?lang=en_us&oid=1109602852&ft=1&bypass_cv=1

1/36

Bu form iki nüsha olarak düzenlenecek ve orijinal raporlar (bir nüsha) eklenecektir.



Scanned with
CamScanner

18.06.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10255694
Yazar Adı / Soyadı	DERYA AKÇİÇEK
T.C.Kimlik No	16556873012
Telefon	5424333215
E-Posta	deryaakcicek94@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	HAPLOPHYLLUM BUXBAUMII BİTKİSİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF THE ANTIANMAL EFFECTS OF HAPLOPHYLLUM BUXBAUMII PLANT ON COLON CANCER CELLS
Konu	Biyokimya = Biochemistry ; Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
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	59
Tez Danışmanları	DR. ÖĞR. ÜYESİ ATAMAN GÖNEL
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

18.06.2019

İmza:.....