



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİ ENGİNAR TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ela Nur ŞİMŞEK

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ela Nur ŞİMŞEK

Tarih: 09.08.2012

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

İKİ ENGİNAR TÜRÜNDEN ELDE EDİLEN BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ela Nur ŞİMŞEK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tuna UYSAL

2012, 64 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Cengiz AKKÖZ
Doç. Dr. Tuna UYSAL
Y. Doç. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Geleneksel olarak bitkilerin kullanımı ülkemizde uzun zamandan beri yaygın olarak tercih edilmekte, etnobotanik çalışmaların modern tıbbi çalışmalara olan katkısı her geçen gün artmakta ve değerli bilgiler elde edilmektedir.

Bu tez çalışması ile ülkemizde doğal olarak yetişen (*Cynara syriaca*) ve kültüre alınan (*Cynara cardunculus*) enginar türlerinden elde edilen bitkisel ekstraktların kolorektal kanser hücre hattı DLD-1 üzerine olan apoptotik ve sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kültür ve yabani enginarın vegetatif kısımlarından ve yenen kısmı olan resaptakulumdan hekzan kullanılarak ekstraklar elde edilmiştir. Bu ekstraktlar ve apigenin, MTT testi için DLD -1 hücreleri üzerine beş farklı dozda (0,1-1 mg/ml) ve üç farklı zaman aralığında (24-48-72 saat) uygulanmış, doza ve zamana bağlı değişen sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir. Elde edilen MTT verileri tek yönlü ANOVA ve Dunnett testleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş, anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Hücre ölümüne neden olan gerçek sebebin ne olduğunu belirlemek amacıyla, her ekstrakt için hesaplanan IC_{50} dozu hücre hatları üzerine uygulanmış ve bu hatlardan total RNA ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'lar (%1. 5) agaroz jele yüklenerek fragmantasyon analizi yapılmış, izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi ve sırasıyla p53, p21, Bcl-2, Bax gen bölgelerinin amplifikasyonları yapılmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri Image J programı kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar bu gen bölgelerinin ifade seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: cDNA, DLD-1, DNA fragmantasyonu, enginar, kolorektal kanser, MTT, RT-PCR.

ABSTRACT

MS THESIS

THE İNVESTİGATİON OF EFFECTS OF PLANT EXTRACTS OBTAİNED FROM TWO DİFFERENT ARTİCHOKE SPECİES AGAİNST TO COLORECTAL CANCER CELL LİNE

Ela Nur ŞİMŞEK

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Tuna UYSAL

2012, 64 Pages

Jury
Assoc. Prof. Dr. Cengiz AKKÖZ
Assoc. Prof. Dr. Tuna UYSAL
Assist. Prof. Dr. Meltem DEMİREL KARS

Traditionally, the using of plants has been commonly preferred for a long time and the conclusions to modern medical research from ethno botanical studies have rated day to day and very important information have been obtained from them.

By this master thesis, it was aimed to determine apoptotic and cytotoxic activity of plant extracts obtaining from naturally growing (*Cynara syriaca*) in our country and cultivated (*Cynara cardunculus*) *Cynara* species against to DLD1 colorectal cancer cells. By this aim, the extracts belonging to wild and cultivated *Cynara* species were obtained from their vegetative parts and receptaculum by using hexane. These extracts besides apigenin for MTT test were applied with five different dose (0,1-1 mg/ml) and by three time interval (24-48 and 72nd hours) upon DLD1 cancer cells and cytotoxic activities changed based on dose and time dependent manner were determined. The data obtaining from MTT test were evaluated statistically via One Way ANOVA and Dunnett test and meaningful differences from them were observed. After IC_{50} dose counted for each extract were firstly superimposed on cell lines and then total DNA and RNA were isolated from these lines for determination of the real reason causing cell deaths. Thereby the isolated DNAs were loaded to (1.5 %) agarose gel, fragmentation analyses were carried out. From isolated RNAs were synthesed cDNA and the amplifications of p53, p21, Bcl-2 and Bax gene regions were done respectively. The levels of gene expression were measured by using Image J programme. Results were associated with the expression levels of these gene regions.

Keywords: Artichoke, cDNA, colorectal cancer, DLD-1, DNA fragmentation, MTT, RT-PCR.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübe ve yardımlarını benden esirgemeyen, bilimsel ve manevi anlamda her zaman yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Tuna UYSAL'a,

Tez çalışmamı yapabilmem için bana her türlü laboratuar imkânını sağlayan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a,

Tezimin laboratuvar çalışmalarının önemli bir bölümünde verdikleri değerli bilgiler, teknik destek ve yardımlarından dolayı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Uğur URAL ve Doç. Dr. Ferit AVCU'ya,

Her türlü bilgisini benimle abla sıcaklığıyla paylaşan, her başım sıkıştığında yardıma koşan Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi, Tıbbi ve Kanser Araştırma Laboratuarı çalışanlarından Biyolog M. Pınar ELÇİ ve Biyolog Meral SARPER'e

Kullandığım ekstraktların hazırlanması aşamasında tecrübelerinden faydalandığım Y. Doç. Dr. Fatih DURMAZ'a,

Verilerimin değerlendirilmesi aşamasında tecrübelerinden faydalandığım Arş. Gör. Dr. Pembegül UYAR'a

Laboratuar çalışmalarımda benden desteğini esirgemeyen arkadaşım Uzman Meryem BOZKURT'a,

Tez çalışmam esnasında sürekli fikir alışverişinde bulunduğum arkadaşlarım Arş. Gör. Emrah ŞİRİN'e ve Yüksek Lisans öğrencisi Ahmet Yasin SEZER'e,

Hayatımın her anında yanımda olan, benden sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

Ela Nur ŞİMŞEK
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Bitki Türü ve Hücre Hattıyla İlgili Genel Bilgiler 10
2.1.1.*Cynara* L. (Enginar) 10
2.1.2.*Cynara* L. (Enginar) türlerinin etnobotanik kullanımı 11
2.1.3.*Cynara* L. (Enginar)' ın biyolojik aktivitesi ve klinik araştırmalar 12
2.1.4. DLD-1 hücre hattının özellikleri 13
2.2. Çalışmalarda Tercih Edilen Yöntemler ve Gen Bölgeleri İlgili Genel Bilgiler 14
2.2.1.Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi 14
2.2.2.DNA fragmantasyonu 15
2.2.3.RT-PCR tekniği 15
2.2.4.Çalışılan gen bölgeleri 16

3. MATERYAL VE METOT **22**

3.1.Materyal 22
3.1.1.Materyal eldesi 22
3.1.2. Kullanılan Hücre Hattı 22
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler 22
3.2.Metot 23
3.2.1.Bitkisel ekstraktların hazırlanması 23
3.2.2.Hücre kültürünün hazırlanması 23
3.2.3.Kullanılacak ekstrakt konsantrasyonlarının hazırlanması 24
3.2.4.Hücre sayımı 24
3.2.5.Hücrelerin testler için hazırlanması 25
3.2.6. Kandan mononükleer hücre eldesi 26
3.2.7.MTT testi 26
3.2.8.DNA izolasyonu 27
3.2.9.RNA izolasyonu ve RT-PCR 27
3.2.10.PCR optimizasyonu 28
3.2.11.PCR ürünlerinin analizi 28

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **30**

4.1.MTT Testi Sonuçları 30

4.2.Morfolojik Gözlemler 37
4.3.DNA Fragmantasyonu 39
4.4.RT-PCR Sonuçları 40
4.5.Gen Ekspresyon Sonuçları 42
4.5.1.GAPDH 42
4.5.2.P53 42
4.5.3.P21 44
4.5.4.BAX 46
4.5.6.BAX/BCL-2 oranları 48

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 50

5.1. Sonuçlar 50
5.2. Öneriler 52

KAYNAKLAR 53

ÖZGEÇMİŞ 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: yüzde
^{o}C	: santigrat derece
cm^2	: santimetrekare
mm^2	: milimetrekare
µg	: mikrogram
mg	: miligram
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre

Kısaltmalar

ACHN	: İnsan böbrek adenokarsinom hücre hattı
AIF	: Apoptotik uyarıcı faktör
ANOVA	: Varyans analizi
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
ATCC	: Amerikan Tip kültür koleksiyonu
ATP	: Adenozin tri fosfat
B95	: İnsan lenfoblastoid hücre hattı
BB58	: İnsan lenfoblastoid hücre hattı
BAX	: Bcl-2 ilişkili X proteini
BCL-2	: B- cell lenfoma 2
C32	: İnsan deri melanom hücre hattı
CAD	: Kaspaz yoluyla aktifleşen deoksiribonükleaz
c-AMP	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
CSap	: Kolon spesifik antijen
DED	: Ölüm etkili bölge
DG75	: İnsan lenfoblastoid hücre hattı
DISC	: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DLD-1	: İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FADD	: Fas bağlantılı ölüm bölgesi
FBS	: Fetal dana serumu
GADD45	: İndüklenen büyüme durması ve DNA hasarı genleri
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HCT-116	: İnsan kolorektal karsinom hücre hattı
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril -koenzim A
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotelyal hücre hattı
IAP	: Apoptoz inhibitörü
IBS	: İrritabl barsak sendromu
IC_{50}	: Hücre canlılığını %50 inhibe eden konsantrasyon

ICAD	:	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü
K562	:	Kronik miyeloid lösemi hücre hattı
LDL	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA- MB231	:	İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
MDM2	:	Murin çift dakika onkogeni
MOMP	:	Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
MRC	:	Mitokondriyal solunum zinciri
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PBS	:	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer saline)
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	:	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TNFR-1	:	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	:	Tümör nekroz faktör reseptörü bağlantılı ölüm bölgesi

1. GİRİŞ

Kanser yakın, hatta uzaktaki dokulara nüfus edebilen neoplazma haldeki hücrelerin anormal büyümeleri ile karakterize edilen sonuç olarak ölüme sebep olabilen bir seri malignant hastalık olarak ele alınabilir (Mathur ve ark., 2006). Son zamanlarda kanserin etiyolojisi, patogenezi ve tedavisindeki umut verici gelişmelere rağmen kanser, halen tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli ölüm nedenidir. Birçok kanser türü yaşla birlikte artış göstermekte ve gittikçe yaşlanan dünya nüfusu, gelecekte kanserin daha önemli bir hastalık nedeni olabileceğini düşündürmektedir. Gelişen tanı yöntemleri ve ortalama yaşam süresinin uzaması, yeni tespit edilen kanser olguları sayısında belirgin bir artışla sonuçlanmakta ve bu artışa bozulan ekolojik denge de katkıda bulunmaktadır (Yalçın ve ark., 2003).

Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4.sırada yer almakta ve erkek ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık % 10-15'ini oluşturmaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık bir milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve kolorektal kansere bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir. Dünya sağlık örgütü kayıtlarına göre her yıl teşhis konulan yeni vaka sayısı 800.000 civarındadır. 2003 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 147.500 yeni kolorektal kanser vakası tesbit edilmiş ve kolorektal kanser nedeniyle 57.000 ölüm bildirilmiştir. (Dobrucalı, 2012). Kolon kanseri insidansı (toplumda görülme sıklığı) coğrafik olarak değişkenlik gösterir. Endüstrileşmiş ülkelerdeki insidans gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir. Yağdan zengin ve düşük lifli gıdalarla beslenme kolondan geçiş süresini ve ko-karsinojenlerle teması arttırarak kolorektal kanser oluşumuna yol açabilecek değişikliklere neden olabilir (Abeloff ve ark., 1995). Kolorektal kanserin epidemiyolojisinde çevresel faktörler kadar genetik özellikler de etkili olmaktadır. Kalıtsal kolorektal kanserler tüm vakaların % 6-10'unu oluşturmaktadır ve bu vakaların yaklaşık % 35'inde kalıtımla geçen etmenlerin varlığı düşünülmektedir (Park ve ark., 2004).

Kanser vakalarındaki bu artış doğal olarak yeni tedavi yolları aranmasına yol açmıştır. Bu amaçla tedavi edici potansiyel etkileri bilinen ve halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılan bitkisel bileşikler ve türevleri son zamanlarda kanser tedavisi için yeni ilaç araştırmalarının birçoğuna konu olmuştur (Shi ve ark., 2006).

Geleneksel olarak tıbbi bitkilerin kullanımı ülkemizde ve Türk topluluklarında çok eski zamanlardan beri görülmekte olup, son zamanlarda etnobotanik kapsamlı çalışmaların modern tıbbi çalışmalara olan katkısı her geçen gün artmakta, değerli çalışmalar ve bilgiler elde edilmektedir. Buradan hareketle ülkemizde geleneksel olarak tedavi amaçlı kullanılan ve besin maddesi olarak da tüketilen Enginar (*Cynara*) bitkisinin kolorektal kanserli hücre hatlarına olan etkisinin belirlenmesine çalışılacaktır.

Bu çalışmadan elde edilecek verilerin kanser genetiği alanındaki çalışmalara bir katkısı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca beslenme yoluyla bu tip hastalıklardan korunma etkili bir stratejidir. Toplumumuzda oldukça yozlaşmış (deforme) diyet kelimesi yerine akıllı beslenme olarak tarif edebileceğimiz, beslenme yolu ile etken maddelerin alınması, kansere yakalanmamak için alınacak önlemlerde en az kanser hücrelerine karşı geliştirilebilecek ilaçlar kadar önemlidir. Bu bakış açısıyla, çalışmamızda günlük hayatta besin unsurlarımız içerisinde yer alan enginar bitkisinden elde edilen ekstraktların DLD-1 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi ve hücre ölümüne neden olan ana sebebin moleküler yöntemlerle saptanmasını amaçladık.

2.KAYNAK ARAŞTIRMASI

Kanser, ölüm nedeni olarak, dünyada ilk sıralarda yer almaktadır. Her yıl altı milyon insan kanserden hayatını kaybetmektedir (Jemal ve ark., 2011). Bu hastalık, çeşitli organlarda fonksiyon ve yapı bozukluğuna neden olmaktadır (Murray ve ark., 1998).

Kanserler normal dokudan ayrılma ve istila kabiliyeti kazanmış tümörlerdir; böyle lezyonlar vücudun herhangi bir dokusunda gelişebilmektedir. Kanser, ortak biyolojik özellik taşıyan heterojen hastalıklar grubudur. Bir tümör, doku homeostazını yok eden hücre klonal populasyonun hızlı gelişmesi ile başlamakta ve kitle büyümesi (tümörigenezis) ile artan invazif özelliği ile kansere dönüşmektedir. Kanser gelişiminin ileri evrelerinde kanserli hücreler, kan ve lenf sistemine girip farklı organ ve dokularda gelişmektedir; bu oluşum metastaz olarak bilinmektedir. Kanserin invazif ve metastatik özellikleri normal dokularda ölümcül yıkımlara neden olmaktadır (Offermanns ve Rosenthal, 2003).

Birçok farklı kanser türünde mutasyonlar somatik hücrelerde meydana gelmektedir ve gelecek nesillere aktarılamamaktadır. Ancak kanser vakalarının % 1' inde eşey-kök hücrelerinin, çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılmaktadır ve bu değişim yeni neslin kansere yatkınlığını da arttırmaktadır. Bazen ise kalıtsal mutasyonlar tek başlarına kanser oluşumunda etkili olmamaktadırlar. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için homolog lokuslarda oluşan somatik mutasyonların meydana gelmesi gerekmektedir. Bütün bu olasılıklardan hangisi etken olursa olsun, kanser, hücre seviyesinde genetik bir bozukluk olarak kabul edilmektedir (Klug ve Cummings, 2000).

Genomda meydana gelen değişiklikler, kanserin genel özelliğini oluşturmaktadır. Bu değişiklikler, hastalığın teşhisi, seyri ve şiddeti ile ilgili tahminlerde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, sinyal aktarım yollarının bulunması, genomiklerin kullanılması ve insan genlerinin dizi analizleri sonucunda potansiyel kanser tedavi hedeflerinin sayısında artış gözlenmiştir (McMahon ve Woods, 2001).

Kanser, epidemik boyutta ortaya çıkması ve gerek hastanın, gerekse yakın çevresinin morali ve davranışı üzerinde olumsuz yansımalar yapması nedeniyle çağımızın en önemli ve dramatik mediko sosyal sorunlarından bir tanesidir. Türkiye'de yıllık kanser insidansı Sağlık Bakanlığınca yüz binde yaklaşık 150 olarak tahmin

edilmiş ve her yıl yaklaşık 90.000- 100.000 civarında yeni kanser olgusu görülebileceği bildirilmiştir (Kayaalp, 2000).

Kanser, bir seri genetik hasarın birikimi ile çevresel etmenlerin bağımsız ya da işbirliği sonucu meydana gelmektedir. Genetik hasar olarak adlandırılan mutasyonların bazıları, hücre çoğalmasının kontrolünü etkilerken, bazıları da tümör hücrelerini bulundukları yerden uzak mesafelere taşınmaları ve gelişebilmeleri için gerekli işlemleri uyarmaktadırlar (Klug ve Cummings, 2000).

Kanser hücrelerinde proliferasyon, büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artış göstermektedir. Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler (Lowitz ve ark., 2003).

Kanser hücrelerinin en önemli özelliği metastaz yapabilmeleridir. Kanser hastalarının % 90' ı metastazdan ölmektedir. Bu nedenle kanser terapilerinde asıl amaç; primer tümör yerlerinden özel organlara kanserin yayılmasını engellemek ve böylece metastaz meydana gelmesini engellemeye çalışmaktır (Hayot ve ark., 2005).

Kanserin ilerlemesi, primer tümör kütlesinden, uzaktaki tümör hücrelerine kadar birçok basamakta gerçekleşmektedir ve bu olay metastazda başrol oynamaktadır. Eğer kanser erken teşhis edilirse; kanseri meydana getiren primer tümör hücresi başarılı bir şekilde yok edilerek, tedavi edilebilmektedir. Kanser hastalarında, ölüm oranının % 90' nından fazlası bu primer tümör hücresinin engellenememesinden ve metastazın ilerlemesinden ileri gelmektedir (Hayot ve ark., 2005; Entschladen ve ark., 2004; Sporn 1996).

Yeni ve modern kanser stratejileri çoğalma ve yayılma faktörlerini hedefleyerek, metastazı engellemektedir (Hayot ve ark., 2005). Bununla beraber bazı tümör hücreleri bu tip bir kemoterapiden etkilenmemektedir. Bazı hücreler, aylarca hatta yıllarca uyku halinde kalarak, daha sonra yeni tümör hücreleri yetiştirebilmektedirler (Hayot ve ark., 2005; Entschladen ve ark., 2004; Naumov ve ark., 2002).

Patolojik durumlarda, doğru olmayan hücre göçleri, tümör akınına ve metastaza neden olmakta, bu olay kanser oluşumuna yol açmaktadır. Bütün bu oluşumlarla birlikte; primer tümörler, hücrelerden ayrılarak, dokuları geçmekte ve kan yoluyla yeni organları istila etmektedir. Metastazın meydana gelmesinde aktin sistemi önemli bir yer tutmaktadır. Bu da kanserin ne kadar kompleks bir hastalık olduğunu göstergesidir (Lambrechts ve ark., 2004).

Kanserli dokunun büyüme profiline bakıldığında ise, katı (solid) tümörlerin birçoğunda (akciğer, mide ve uterus gibi) büyüme hızının tümör büyüdükçe azaldığı görülmektedir. Bir solid tümörün hücreleri 3 tabaka oluşturur: Üst tabaka bölünen hücreleri içerir ve bu hücreler muhtemelen sürekli olarak hücre siklusundadır; ara tabaka istirahat haldeki hücreleri (G0), yani bölünmeyen fakat potansiyel bölünme özelliği olan hücreleri içerir. Alt tabaka ise artık bölünmeyen ama tümör hacmine katkıda bulunan hücreleri içerir. Esas olarak bazı solid tümörlerin % 5'ini oluşturan üst tabakasındaki hücreler halen mevcut olan ilaçlara duyarlıdır. Alt tabakada bulunan hücreler bir sorun yaratmazken ara tabakada bulunan hücreler kanserin ilaçla tedavisini zorlaştırır. Çünkü bu hücreler sitotoksik ilaçlara karşı duyarlılık göstermezken, bir kemoterapi uygulanması sonrasında üst tabakaya geçme eğilimi gösterebilirler (Bökesoy ve ark., 2000).

Günümüzde kansere karşı mücadele de kullanılabilme potansiyeli olan bitkisel kökenli ekstraktların malign hücreleri ölüme yöneltebilmeleri beklenmektedir. Bu şekilde hücre ölümüne neden olan mekanizmalardan biri apoptoz, diğeri ise nekrozdur.

Apoptosis apo-TOE-sis kelimelerinden kökenlenmekte olup eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Apoptoz, genetik olarak programlanmış hücre ölümüdür ve gelişim, dokulardaki homeostazın korunması ve çok hücreli canlılarda istenmeyen veya hasar görmüş hücrelerin elimine edilmesinde oldukça önemlidir (Evans, 1993).

Apoptoz düzenlenmesinden yoksunluk, nöronal rahatsızlıklar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığa zemin hazırlayabilir (Fulda ve ark.,2004). Bu nedenle apoptoz mekanizmalarının anlaşılması çoğu hastalıktan korunma ve tedavi aşamasında oldukça önemlidir (de Almeida ve ark., 2005).

Tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesi birçok kanser terapisinde hedeflenen en çok bilinen antikanser mekanizmalarındandır. Bu nedenle güçlü ve selektif etki gösteren, potansiyel terapötik anti tümör ilaçların bulunması gerekmektedir. Birçok epidemiyolojik çalışma, meyve ve sebzelerin düzenli olarak tüketiminin kanser gelişiminde inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu inhibisyon fitokimyasallar olarak bilinen farklı birçok bileşiğe dayandırılır (Dwyer ve ark., 1988; Riboli ve ark., 2003).

Komşu hücrelere hasar vermeden, onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrenin yok edilmesi apoptozun temel işlevi ve amaçları

kapsamındadır. Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir (Gültekin ve ark., 2008).

Gültekin ve ark., 2008'e göre apoptoz ;

a) Embriyo gelişimi ve başkalaşım (metamorfoz) sırasında olduğu gibi, gelişim sürecinde organizmaya şekil verir.

b) Organizmanın toplam hücre sayısını düzenler.

c) Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler (ki bunlar otoimmün hastalıklara yol açabilir) gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılmasını ve bunlara karşı savunma oluşturulmasını sağlar.

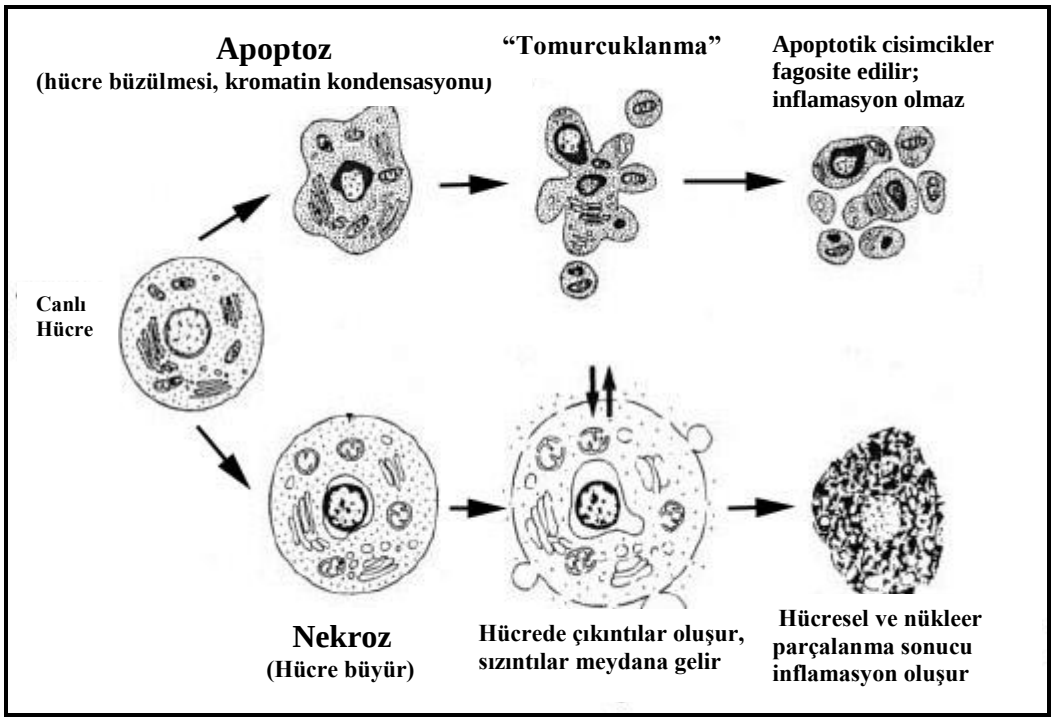
Apoptoz, plazma membranında oluşan çıkıntılar, mitokondri depolarizasyonu, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi morfolojik farklılıklarla karakterize edilir. Çeşitli genler apoptozu artıran ve baskılayan olarak tanımlanabilir. Özellikle kaspazların hücre ölümünün düzenlenmesi fazında, farklı apoptotik uyarıcılar olarak anahtar rol oynadıkları bilinmektedir (Stennicke ve ark., 1998; Harada ve ark., 2003).

Apoptozda hücre içi sinyal iletimi ve metabolik değişikliklere bakıldığında hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyumun (Ca^{++}) apoptozda da etkin rol oynadığı görülmektedir. Hücre içindeki kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir (Geoffey ve Robert, 2004). Sitoplâzmadaki kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirirerek, hücrenin apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Kalsiyum; adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir. c-AMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler (Bellamy ve ark., 1995). Sitoplâzmada artan kalsiyum inaktif durumdaki kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoza özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (Gerschenson ve Rotello, 1993).

Organizma sürekli bir denge halindedir. Hücre bölünmeleri sonucu yeni hücreler oluşurken, var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Ama hücreleri ortadan kaldırmanın tek yolu apoptoz değildir. Hücre ölümünün diğer bir tipi de nekrozdur. Nekrozla apoptoz arasındaki ilk fark, apoptozun, nekrozdan farklı olarak, ölen hücrenin aktif katılımı ile meydana gelmesidir. Yani, "intihar et" komutu alan hücre bu olayı gerçekleştirmek için bazı gen ürünleri (proteinler, enzimler) sentezler ve gerekli fizyolojik düzenlemeleri

gerçekleştirir. Apoptozu gerçekleştiren genler hayvanlarda ve bitkilerde mevcuttur. Bu genlerin bir kısmı apoptozda indükleyici bir kısmı bir inhibitör gibi davranır. Değişik organizmalardaki apoptoz ile bağlantılı genler arasında, DNA dizilimi açısından, benzerlik bulunması evrimsel açıdan canlılar arasında korunmuş ortak bir programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının varlığını akla getirmiştir (Çalışkan, 2000).

Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç olması nedeniyle hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozla mı veya nekrozla mı öleceğine yön verir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölüm yoluna gidecektir.



Şekil 2. 1. Apoptotik ve nekrotik hücre ölüm yolaklarının karakteristik özellikleri (Van Cruchten, 2002)

Apoptozun moleküler düzeyde belirlenebilmesi, birçok molekülün farklı şekilde çalışmasını gerektirir. Apoptozda rol oynayan proteinlerden en bilinenleri, kaspazlar, Bcl-2 ailesi ve p53'tür.

Apoptozun uyarılması ile genomik DNA'nın 50-200 kb parçalar halinde kırılması, proteinlerin parçalanması, fosfotidilserinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması gibi değişiklikler proteolitik sistem tarafından gerçekleştirilir. Bu sistem içinde proteaz ailesi olarak bilinen kaspazlar (Chang ve Yang, 2000), inaktif

prekürsörler olarak sentezlenen ve başka kaspazların katalizlediği proteolitik bölünmelerle aktif formuna bölünen zimojen yapılardır (Donepudi ve Grütter, 2002). Kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ve sitokinleri aktive eden kaspazlar (kaspaz 1) olmak üzere 3 grupta toplanmıştır. Kaspazların aktivasyonu, Bcl-2 ve apoptoz protein inhibitörleri (IAP) ailesinin üyeleri gibi bazı moleküller tarafından düzenlenebilir. Birçok durumda apoptoz mekanizması mitokondriden sitokrom c salınımına yol açar (Rosse ve ark., 1998; Deveraux ve ark., 1999).

Kaspazların apoptozdaki rolleri sentetik veya doğal inhibitörler kullanılarak tanımlanmış olup (Chang ve Yang, 2000; Schierie ve ark., 1999; Miura ve ark., 1993) bu inhibitörler varlığında apoptozun tamamen bloke edildiği yada mekanizmanın işleyişinde aksaklıkların olduğu tespit edilmiştir (Chang ve Yang, 2000; Kuida ve ark., 1996; Kuida ve ark., 1998; Varfolomeev ve ark., 1998).

Apoptozda rol oynayan proteinlerden bir diğeri Bcl-2 ailesidir.Bcl-2 proteinleri apoptoz regülasyonunda; hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozom oluşum safhasında ve kaspaz kaskadının aktivasyonunda önemli rol oynar (Sato ve ark., 1994; Burlacu, 2003).

Apoptozu tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her üçünü bulunduranlar (BAX, BAK) ve sadece BH3 içerenler (BİD, BAD, BİM, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozu baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin hepsine sahiptirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozisi indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozu başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apoptozu baskılayan üyeler ise inaktif durumdadırlar (Griffiths ve ark., 1999).

Apoptoz süreci hücre içi veya hücre dışı uyaranlarla tetiklenmesine göre değerlendirilebilir. Hücreler, hücre içi veya hücre dışı çevrede meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyaranları ile tetiklenerek iki ayrı yol ile apoptoza giderler. Bu ana yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyaranları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptoz, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyaranlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozdur.

Ekstrinsik yolda apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir. Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hekzamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan FADD (Fas associated death domain) ile TNF-R1 ise kendi intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan TRADD (TNF-R1 associated death domain) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (death- inducing signalling complex: DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (death effector domain: DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur. Kaspaz 8; ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozun intrinsik yola doğru ilerlemesine neden olur (Hung ve Chow, 2004).

İntrinsik yolda sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (BİD, BAD, BİM, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır. İntrinsik yolun en önemli bölümü, mitokondri dış membran geçirgenliğinde oluşan artıştır (MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization). Hangi yol ile olursa olsun ölüm sinyalinin, MOMP oluşumunu gerçekleştirebilmesi, başta mitokondriden apoptozun aktivasyonuna neden olan sitokrom-c 'nin salınımına neden olur (Barnes, 2004).

Sitokrom-c; Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksi (Apaf-1 + sitokrom-c + ATP + Prokaspaz 9)'nin oluşumunu sağlar. Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD: inhibitor of caspase- activated deoxyribonuclease) inaktif hale getirir. Böylece ICAD'ın başladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD: caspase activated deoxyribonuclease) serbestleşir. CAD, apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz)

polimerazı (PARP)) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar (Kuhn ve ark., 1976).

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Bitki Türü ve Hücre Hattıyla İlgili Genel Bilgiler

2.1.1.*Cynara* L. (Enginar)

Çok yıllık bitkiler olan *Cynara* L. cinsi dikenli yaprakları ve yine dikenli çiçek durumları ile karakterizedir. Gövde sağlam yapılı, dik olarak yükselmiş, boyuna yollu seyrek olarak dallara ayrılmış, dikenli veya dikensiz olabilir. Yapraklar alternat, genellikle kanatlı orta damarla pinnatisekt (loblar laminanın orta damarına kadar derin) olarak bölünmüş, dikenli veya dikensizdir. Kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeyde, geniş, tek ve disk biçiminde, bir veya daha fazla başlı korimboz biçimindedir. İnvolukrum (brakte halkası) oval veya küreseldir. Çiçekler mavi-mor ya da beyazımsı renktedir (Davis, 1975).

Enginar birçok ülkede geleneksel olarak tüketilen bir sebzedir (Lutz ve ark., 2011). Sebzenin gıda olarak tüketilen kısmı reseptakulum (çiçek tablası)'dur (Romani ve ark., 2006). Çiçek tablası etli yapıda olup küçük brakte yapraklarının bir araya toplanması ile oluşan topluluktur. Çiçek tablasının gıda olarak yaygın bir kullanımı olmakla beraber bitkinin tedavide kullanılan kısmı gövde ve yapraklarıdır (Aktay ve ark., 2000).

Enginar % 85 su, % 10 karbonhidrat, % 3 protein ve % 1 vitamin ve mineral maddeler içermektedir (Şinik, 2008). Enginar, çoğunlukla bitkinin yeşil kısımlarında bulunan ve cynarin adı verilen bir bitki kimyasalına dayandırılan hoş acı tadı ile bilinir. Cynarin, enginarda bulunan aktif biyolojik kimyasallardan biri olup, bitkinin yapraklarında yüksek oranda bulunur, buda özellikle yapraklarının neden bitkisel ilaç olarak kullanıldığını açıklamaktadır. Enginarda bulunan bir diğer önemli bileşen ise apigenin flavinoididir.

Apigenin aynı zamanda maydanoz, soğan, portakal, çay, papatya, buğday filizi ve bazı baharatlar gibi birçok sebze ve meyvede oldukça fazla oranda bulunan ve en iyi bilinen flavinoidlerden biridir (Duthie ve Crozier, 2000). Apigeninin anti inflamatuar, anti karsinojen ve serbest radikalleri uzaklaştırma gibi özelliklere sahip olduğu birçok in vitro çalışmada kanıtlanmıştır (Kim ve ark., 1998).

Son yapılan araştırmalar apigeninin, hücre büyümesi, hücre siklusu düzenlenmesi ve apoptoz gibi hücre için anahtar rol oynayan düzenlemelerden sorumlu nuklear transkripsiyon faktörünün (NF-nB) potansiyel inhibitörü olduğunu göstermiştir (Hastak ve ark., 2003).

Göğüs kanseri hücreleri, kolon kanseri hücreleri ve lösemi hücreleri gibi insan kanserleri üzerinde yapılan çalışmalar, apigeninin büyümeyi inhibe ettiği, hücre siklusunu durdurduğu ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Wang ve Kurzer, 1997; McVean ve ark., 2000; Wang ve ark., 2000).

Enginarda bulunan diğer aktif kimyasallar flavonoidler, seskiterpenler, laktonlar, polifenoller ve kafeolikuinik asitlerdir.

Bitkide birçok farklı bileşik yer almasına karşın, yapılan farmakolojik çalışmalar doğrultusunda, etkiden sorumlu bileşiklerin kafeik asit türevleri ve flavinoidler ile flavinoid glukozitleri olduğu düşünülmektedir. Biyolojik etki çalışmaları da daha çok bu bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır (Hausler ve ark., 2002). *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarla enginarın antikolesterol, antifungal, antibakteriyel, antikanser ve antioksidan etkileri kanıtlanmıştır (De Paolis ve ark., 2008).

2.1.2.*Cynara* L. (Enginar) türlerinin etnobotanik kullanımı

Enginar, özellikle karaciğer ve safra kesesi üzerinde olmak üzere yüzyıllardır bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Brezilya bitkisel ilaç yöntemlerinde, yaprak preparatları, karaciğer ve safra kesesi problemleri, diyabet, yüksek kolesterol, hipertansiyon, anemi, diyare, yüksek ateş, ülser ve gut hastalığı gibi birçok rahatsızlıkta kullanılmaktadır. Avrupa'da yine karaciğer ve safra rahatsızlıkları üzerine kullanılır ve bu amaçla bazı ülkelerde standardize edilmiş bitkisel ilaçlar imal edilmekte ve satılmaktadır. Bu ilaçlar daha çok yüksek kolesterol, sindirim problemleri ve karaciğer rahatsızlıklarında tercih edilmektedir. Dünya çapında bir başka kullanımı ise dispepsi ve kronik albuminüri tedavisi üzerinedir. Fransa'da enginardan elde edilen ekstraktlar, karaciğer rahatsızlıkları, yüksek kolesterol seviyeleri ve böbrek yetmezliği üzerine kullanılmaktadır. Hangi ülkede uygulanırsa uygulansın tüm bitkisel ilaç yöntemlerinde, enginarın karaciğerdeki safra üretimini, safra kesesinde safra akışını ve öd yolunda ödün emilimini arttırdığı görülmüştür. Bu safra aktiviteleri birçok sindirim olayı, karaciğer ve safra için oldukça faydalıdır. Enginarın, karaciğerdeki yağ depolarını

harekete geçirerek detoksifikasyonun yanı sıra kolesterolün düşmesine de yardımcı olduğu bilinmektedir (Anonymus, 2012).

2.1.3.*Cynara* L. (Enginar)' ın biyolojik aktivitesi ve klinik araştırmalar

Enginarın karaciğer ve safra kesesi faydalı etkileri üzerine yapılan araştırmalar devam etmektedir. Son olarak rapor edilen bir çalışmada zararlı kimyasallarla fare karaciğerinde oluşturulan hasarın, enginar yaprak ekstreleri uygulanarak geri döndürülebilir olduğu görülmüştür ve ekstrenin bunu safra salgısını arttırarak gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Saenz Rodriguez ve ark., 2002).

Speroni ve arkadaşları (2003), sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin karaciğer üzerindeki koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda enginarın karaciğer hücrelerinde koruyucu ve rejenere edici etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

Enginar yaprak ekstresinde bulunan polifenolik yapıdaki maddelerin ve flavonoitlerin, sıçan karaciğer kültüründe lipit peroksidasyonuna yol açan malondialdehit oluşumunu azalttıkları belirlenmiştir (Gebhardt, 1997).

Enginar yapraklarında bulunan bileşikler HMG-CoA redüktaz üzerinde inhibitör etki göstererek kolesterol oluşumunu önlemektedir (Fritsche ve ark., 2002; Juzyszyn ve ark., 2008a).

Huber ve arkadaşları (2009), yaptıkları bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan ekstraktların kronik Hepatit C üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hepatit C üzerinde anlamlı bir pozitif etki gözlenmemiştir.

Enginar bitkisi antioksidan bileşikler açısından oldukça zengin bir kaynaktır. Enginarın antioksidan özelliği üzerine yapılan bir çalışmada 3 hafta boyunca erkek sıçanlara enginar yaprak ekstraktı verilmiştir. Çalışma sonunda enginar yaprak ekstraktının oksidasyona sebep olan ajanlar üzerinde anlamlı bir azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür. (Jimenez-Escrig ve ark., 2003).

Enginarın karaciğeri koruyucu etkisi antioksidan özelliğine dayandırılmaktadır. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, enginar ekstraktları lökositler üzerine uygulanarak ekstrelerin antioksidan özelliği rapor edilmiştir (Perez-Garcia ve ark., 2000). 2002 yılında yapılan bir çalışmada enginarın kültüre alınan kan damarı hücreleri üzerinde antioksidan özellikleri araştırılmış ve olumlu yanıt alınmıştır (Zapolska-Downar ve ark., 2002).

Goni ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada enginar yaprak ekstraktının kolon bakteriyel enzimlerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Enginar kullanımının çekum içeriği ağırlığını artırdığı ve çekum duvarında hipertropiye neden olduğu saptanmıştır. Enginar ekstraktının bakteriyel enzim aktivitelerini modifiye ederek (b-glukoronidaz, b-glukosidaz, nitroredüktaz aktivitesini arttırarak, nitrat redüktaz ve azoredüktaz aktivitesini azaltarak), glikozitler ve azotlu bileşikleri metabolize edecek mikrobiyal enzim kapasitesini güçlendirdiği rapor edilmiştir.

Yapılan bir klinik çalışmada standardize (piyasada bulunan ve belirli dozlarda satılan ürünler) enginar yaprak ekstraktlarının hazımsızlık şikâyeti olan sağlıklı gönüllülerdeki irritabl kolon sendromu semptomları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak enginar yaprak ekstresinin hastaların bağırsak hareketleri normale döndürmede ve değişken diyare/ konstipasyon şikayetlerini azaltmada etkili olduğu tespit edilmiştir (Bundy ve ark., 2004).

Enginardan elde edilen ekstraktın dispepsi, birçok sindirim bozukluğu örneğin, özefagus, duodenum ve üst gastrointestinal sistem üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Ek olarak enginar bitkisinden elde edilen ekstraktın irritabl barsak sendromu (IBS) üzerine etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada bir grup hasta üzerinde ilaç, diğer grupta ise ilacın yanı sıra ektraktlar uygulanmıştır. 6 hafta sonunda ilacın yanında ekstrakt uygulanan bireylerin % 96’ sında olumlu sonuç alındığı rapor edilmiştir (Walker ve ark., 2001).

2.1.4. DLD-1 hücre hattının özellikleri

Kolorektal kanser dünyada üçüncü en yaygın kanser türü olup, en sık ölümle sonuçlanan dördüncü kanser çeşididir (Steward ve Kleihues, 2003). Bu kanser türü gelişmiş ülkelerde, gelişmekte olan ülkelere nazaran daha sık görülmektedir (Steward ve Kleihues, 2003; Jemal ve ark., 2004). Kolorektal kanserlerin çoğu sporadik olup, genetik ve çevresel faktörler büyük önem taşımaktadır (Steward ve Kleihues, 2003). Bu tip kanser hastalarının yaklaşık % 20’ si kalıtsal kolorektal kanser için kesin kriterlere tam olarak uymaksızın, bazı ailesel risk faktörlerine sahiptirler (Lynch ve de la Chapelle, 2003). Bunun yanında sporadik kolorektal kanserler % 88-94 oranında görülmekte olup, ileri yaş, erkek cinsiyeti, çeşitli hormonal (ilk gebelik yaşı, erken menapoz vb.) ve çevresel faktörler (et ve yağdan zengin, folat ve kalsiyumdan fakir

diyet vb.), obezite, diyabet, sigara, yüksek alkol alımı, kolorektal polip hikayesi gibi pek çok faktör hastalık riskinde önem taşımaktadır (Weitz ve ark., 2005).

DLD-1 hücre hattı D. L. Dexter tarafından izole edilen iki adenokarsinomal kolorektal hücre hattından bir tanesidir. Hücreler, 1977-1979 yılları arasında izole edilmiştir. DNA fingerprinting ve sitogenetik analizleri ATCC (American Type Culture Collection) tarafından yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu aynı bireyden izole edilen HTC-15 hücre hattıyla farklı klonal orjine sahip oldukları tespit edilmiştir. DLD-1 hücre hattı CSap (CSAp-) negatiftir. DLD-1 hücreleri p53 antijen ekspresyonu ve keratinle immunoperoksidaz bağlama açısından pozitif özellik gösterir. Ek olarak hücre hattı c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis ve fos onkogenleri ekpresyonu göstermektedir. Tümör spesifik nuklear matrix proteinleri CC-2, CC-3, CC-4, CC-5 ve CC-6 ekspresse edilmektedir (ATCC).

2.2. Çalışmalarda Tercih Edilen Yöntemler ve Gen Bölgeleri İlgili Genel Bilgiler

2.2.1.Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT testi

Kültürde yaşayan hücre sayısını belirlemek için direk ve indirek olmak üzere iki yöntem vardır. Direk yöntemde tüm hücreler sayılırken, indirek yöntemde ise yaşayan hücrelerin kültür parametrelerinde oluşturduğu değişikliklere bakılır (Genç ve ark., 2002). Tetrazolyum boyasının (MTT) hücre sayısını belirleyen bir indikatör olarak kullanımı ilk olarak 1980'li yılların başında rapor edilmiştir (Langdon, 2004). MTT deneyi, sık sık hücre poliferasyonunu ölçen indirekt indikatör olarak kullanılmasına rağmen aslında MTT mitokondriyal aktivasyonu ölçen bir indikatördür (Wu ve ark., 1999). MTT testi hücre kültürü esasına dayanan indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testi olarak değerlendirilebilir (Doğan ve ark., 2004). Birçok araştırmacı tarafından sitotoksisite araştırmalarında tercih edilmektedir (Mohamed ve ark., 2000; Ali ve ark., 2001).

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Genç ve ark., 2002).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolyum bromür) bu amaçla

kullanılan sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olup sağlam mitokondrilerde süksinat dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur (Shi ve ark., 2006; Langdon, 2004; Korkmaz, 2002).

Bu yöntemde hücreler üzerine uygulanan ekstrakt veya ilacın etkisine göre renklenmeler görülmektedir. Eğer kullanılan madde hücreler üzerinde güçlü sitotoksik etki gösteriyorsa renk yoğunluğu azalmakta, sitotoksik etki az veya yoksa renk yoğunluğu artmakta ve hücreler koyu mor renkte görülmektedir.

Formazan kristalleri DMSO, izopropanol ya da formazan ürünlerinin çözülebildiği ve rapor edilen diğer uygun çözücülerde çözüldükten sonra çözünen boyanın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak Eliza okuyucu da 540nm'de ölçülür (Barile, 1994; Subhashini, 2005). Oluşan formazan tuzlarının miktarı direk olarak canlı hücre sayısının oranını gösterir (Holst ve Oredsson, 2005) Bu teknik düşük maliyetli, hızlı, hassas, güvenilebilir ve çok sayıda örnekle çalışılma imkânı sağladığından tercih edilmektedir (Collier ve Pritsos, 2003; Yano ve ark., 2005).

2.2.2.DNA fragmantasyonu

Apoptoz hücre ölümünün genetik olarak programlanmış bir mekanizmasıdır ve sıklıkla internukleozomal DNA fragmantasyonuyla karakterize edilir (Szondy, 1997).

DNA fragmantasyonu apoptozun belirgin bir göstergesidir ve bu süreç yüksek moleküler ağırlıklı (300-700 kbp) DNA'nın yaklaşık 120- 200 bp' lik eşit fragmentlere ayrılmasıyla gerçekleşir (Tan ve ark., 2000; Bicknell ve ark., 1994; Zhiyotovski ve ark., 1994). Apoptozun ilerleyen safhalarında intranükleozomal bölgelerdeki DNA'da da fragmantasyon meydana gelir. Bu fragmantasyon fragmentlerin agaroz jel elektroforezinde "ladder" şeklinde görülmesi ile karakterize edilir (Wyllie, 1980).

2.2.3.RT-PCR tekniği

PCR yöntemi, bir gen veya DNA bölgesinin bu bölgeye bağlanan oligonükleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması işlemidir. PCR yönteminde sözü edilen her replikasyon döngüsü; i) DNA'nın denatürasyonu, ii) Primerlerin bağlanması ve iii) Primerlerin uzaması, olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilir. Her döngüde

oluşan ürün bir öncekinin 2 katıdır. Böylece yaklaşık 20 döngülük bir reaksiyon sonucunda yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilir (Durmaz, 2004).

RNA PCR olarak da adlandırılan RT-PCR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (geri transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. *T. thermophilus* (Tth) DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar Mangan varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilmektedir. RT-PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında kullanılan oldukça duyarlı bir yöntemdir. Aynı zamanda "Message amplification phenotyping-MAPPing-'' olarak da bilinen bu yöntem az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizini de olası kılmaktadır. Ayrıca RNA PCR, hücresel bir RNA örneğindeki tüm mRNA' lardan PCR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için de yararlı bir yöntemdir. Böylece, çok az sayıdaki, hatta tek bir hücreden ya da çoğaltılamayan hücrelerden bile cDNA kitaplıklarının kurulması gerçekleştirilebilir. cDNA sentezinde kullanılabilecek çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ters transkriptaz (revers transkriptaz) enzimleri vardır. Bunlara örnek olarak "avian myeloblastosis virus'' (AMV) ve "Moloney murine leukemia virus'' (MMLV) revers transkriptaz enzimleri verilebilir (Temizkan ve ark., 2004; Howe, 1997).

2.2.4.Çalışılan gen bölgeleri

GAPDH

Hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde eksprese olan ve ekspresyon seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genlere housekeeping genler adı verilir. Bu genler, nükleik asit ve protein sentezi, besinlerin taşınması ve kullanımı, hücresel iskeletin ve organellerin biyosentezi gibi temel hücresel ve metabolik işlevler için gereklidir. Housekeeping genler hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak da ifade edilmektedir (Thompson& Thompson, 2005). Kantitatif RT-PCR uygulamalarında standart amacı ile çeşitli koşullarda ekspresyonu değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (Bustin, 2002).

En yaygın olarak bilinen housekeeping genler, beta-aktin, tata proteini, GAPDH, hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz genleridir.

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni gen ekspresyon verilerini kıyaslama amaçlı olarak en sık kullanılan housekeeping genlerden biridir (Barber ve ark., 2005).

Bir çalışma için hangi housekeeping genin daha iyi sonuç vereceği birçok raporda belirtilmiştir. Örneğin; ribozomal 23-kDa proteini, kronik pankreatitte (Jesnowski ve ark., 2002), asidik ribozomal protein pulmoner tüberkülozda (Dheda ve ark., 2004) ve GAPDH ise apoptoz gen ekspresyonu çalışmalarında oldukça kullanışlıdır (Ullmannova ve Haskovec, 2003).

Çalışmalarda kullanılacak housekeeping genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır.

P53

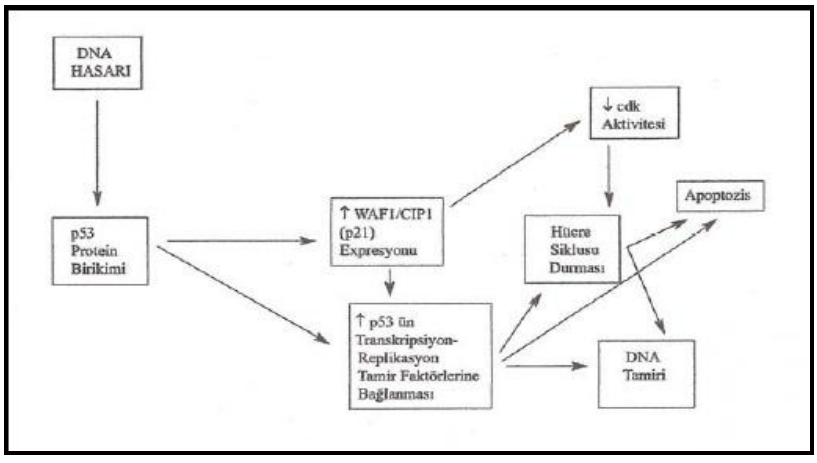
Programlı hücre ölümünde etkili olan en önemli gen tümör baskılayıcı *p53*'dür. Normal hücrelerde *p53* replikasyon sırasında DNA tamirini kolaylaştırarak hücre siklusunu G1'de durmasına veya hücrenin apoptoza (programlanmış hücre ölümü) gitmesinde rol oynar. Kanserli hücreler ise bu kontrol noktasını geçerler (Durhan, 2006).

p53; apoptozu tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini artıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezlerini arttırdığı apoptozu tetikleyen gen ürünleri; hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stres mediatörleri, ölüm reseptör sinyal yolunun komponentleri ve bcl-2 ailesinin apoptozu tetikleyen proteinleridir. p53 aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozu tetikleyebilir. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı oluştuğu zaman hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse, apoptozu tetiklemekle görevlidir (Erster ve Moll, 2005).

P21

P21 geni p53'ün indüklediği hücre siklus ölümünün primer düzenleyicisidir (Harper ve ark., 1993). P53 insan kanserlerinde en sık görülen mutant gen olup, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. P53 proteininin hücre fonksiyonlarındaki rolü; gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genetik stabilitenin korunması, hücre siklusunun devamlılığı, büyümeyi sonlandırma ve programlı hücre ölümüdür (Hussain ve Haris, 2000). DNA hasarı ya da hipoksemi p53 üretimini uyarır. P53, DNA hasarına verilen yanıtı regüle eden bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. DNA hasarı ile aktive olur ve bir dizi genin regülasyonuna neden olur. Bunlar, p21, MDM2, BAX ve GADD45'tir. Bu proteinler G1/S hücre siklus geçişini, G2/M DNA hasar kontrol noktasını ve apoptozisi düzenlemeye yardımcı olurlar. p53 fonksiyon kaybı sonucunda bu fonksiyonlar yerine getirilemez. Normal bir hücrede DNA hasarı olduğunda, p53 geni genomik stabiliteyi sağlar ve hücre siklusunu G1'de inhibe eder. Böylece hücreye tamir için zaman kazandırır. Eğer hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptozise uğratılır (Fong ve Minna, 2002; Hussain ve Haris, 2000; Spivack ve ark., 1997) .

WAF–1/CIP–1 gen ürünü olan p21 proteini G1 siklin bağımlı kinazları inhibe eder ve DNA replikasyonunu önleyerek hücrelerin S fazına girmesini engeller (Harper ve ark., 1993). Kolon, beyin ve akciğer kanseri hücre kültürlerinde p21 aşırı ekspresyonunun büyümeyi yavaşlattığı gözlemlenmiştir (El-Deiry ve ark., 1993; Yang ve ark., 1995; Chen ve ark., 1995). Ayrıca p21'den yoksun farelerde enjeksiyon yoluyla p21 aşırı ekspresyonu sağlandığında kolon kanser hücrelerinde tümör seyrinin yavaşladığı görülmüştür (Chen ve ark., 1995).



Şekil 2. 2. Hücrede p53 ve p21 yolağı (Özdemir, 1998)

BCL-2

Apoptozla ilişkili genlerden olan Bcl-2 ailesinin üyelerinin çoğu, farklı kanserlerde farklı şekillerde ifade edilir ve genlerin bazıları tanı amaçlı kanser belirteci olarak kullanılır. Bu aileye ait proteinler, mitokondriye ait programlı hücre ölümü yolunda oldukça önemli rol oynar. Bcl-2 proteini bir antiapoptotik proteindir (Tsujimoto, 1998; Gross ve ark., 1999). Bcl-2 proteini mitokondri dış zarının sitoplazmik yüzeyinde, endoplazmik retikulum zarında ve çekirdek zarında lokalize olmaktadır (Gren ve Kroemer, 1998). Bcl-2 proteini anti-apoptotik etkisini, mitokondri proteinlerinin, örneğin sitokrom c veya AIF'nın (apoptotik uyarıcı faktör) mitokondriden çıkmasını engelleyerek göstermektedir (Yang ve ark., 1997; Kluck ve ark., 1997; Susin ve ark., 1999). Bu engellemeyi de mitokondri zarının potansiyelinin korunmasını sağlayarak başarmaktadır (Susin ve ark., 1999).

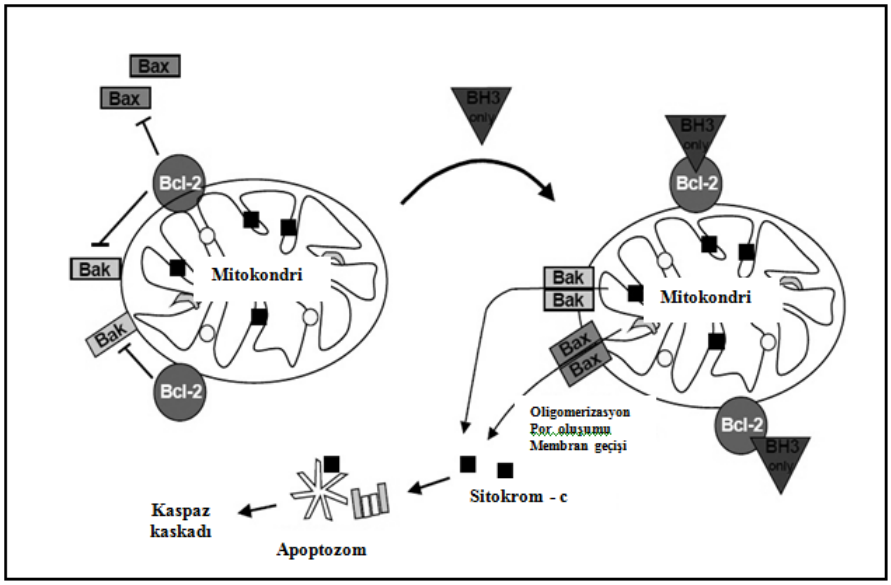
Pankreas (Talar-Wojnarowska ve ark., 2002), meme, prostat (Iervolino ve ark., 2002), kolorektal (Hague ve ark., 1994) ve akciğer (Ben Ezra ve ark., 1994) gibi kanser türlerinde bcl-2 proteinin aşırı sentezlendiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, pro-sağkalım (Bcl-2 benzeri) ve pro-apoptotik proteinlerin göreceli oranının, hücrenin duyarlılığına ve apoptotik uyaranlara karşı direncine bağlı olduğu söylenebilir (Thomadaki ve Scorilas 2006; Zong ve ark. 2001; Cheng ve ark. 2001; Wei ve ark., 2001).

BAX

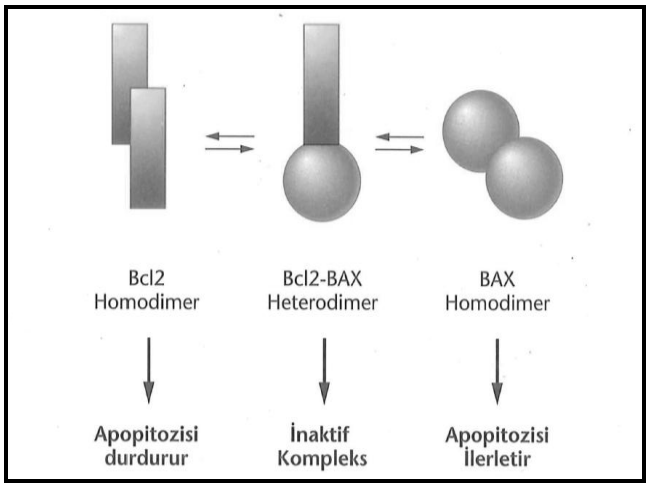
Bcl-2 gen ailesinin proapoptotik bir üyesi olan Bax, insan kromozomu 19'un q13.3-q13.4 bölgesinde lokalizedir. 21 kDa ağırlığındaki Bax, Bcl-2 ile homolog yapıya sahiptir ve Bcl-2 'nin baskın inhibitörüdür. Her iki proteinin biri diğeriyle homo- ya da heterodimer formdadır. Bcl-2 'nin artışı hücreyi apoptoza gitmekten korurken, Bax'ın artışı apoptotik hücre ölümünü stimüle eder. Normal dokularda Bax ekspresyonu Bcl-2 ekspresyonundan çok daha fazladır. Bax ekspresyonu lenfoid ve çeşitli epitelyal dokularda tesbit edilmektedir (Bilim ve ark., 1998). Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri, sağlıklı bir hücrede sitozol ya da hücre iskeletinde konumlanır. Bir ölüm sinyali oluştuğunda ise, anti-apoptotik proteinlerle etkileşime girerek onların baskılanmasına ve

apoptoz mekanizmasının başlamasına neden olur (Thomadaki ve Scorilas 2006; Zong ve ark., 2001; Cheng ve ark., 2001; Wei ve ark., 2001).



Şekil 2. 3. Apoptozun BCL-2 ailesi tarafından düzenlenmesi (Gewies, 2003).

Bcl-2 ve Bax proteinlerinin bağıl yoğunlukları apoptozu düzenler. Normal bir hücrede Bcl-2 ve Bax proteinlerinin inaktif heterodimerlerini meydana getirerek miktarlarını dengeleyen bir mekanizma bulunur. Bcl-2 'nin bağıl artışı ya da fazlalığı, Bcl-2 homodimerlerinde bir artışa yol açar ve hücreyi apoptozdan korur. Bcl-2 proteini çok fazla artmış olan kanser hücreleri radyasyon ve kemoterapiye dirençlidirler. Bax'ın nin bağıl artışı ya da fazlalığı, Bax homodimerlerinde bir artışa yol açar ve hücreyi apoptoza yönlendirir (Klug ve Cummings, 2011).



Şekil 2. 4. Bax Bcl-2 homodimer heterodimer yapısı (Klug ve Cummings, 2011)

Bax / Bcl -2 dengesi hücre için çok önemlidir ve bu oranın değişmesi hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirler. Bax sitokrom c salınımını indüklediğinden artışı hücre için ölümcül, Bcl-2 ise anti apoptotik olması nedeniyle sit-c salınımını bloke ettiğinden artışı hücre için hayatta kalım anlamına gelmektedir (Hengartner, 2000).

3. MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

3.1.1.Materyal eldesi

Çalışmamızda kullandığımız *Cynara* türlerinden kültür olan çeşit (*Cynara cardunculus*) pazarlardan, yabanil olan çeşit (*Cynara syriaca*) ise, Kayseri; Yahyalı – Çamlıca köyü, Dönberi yaylası, meyilli düzlükler, 1550 metreden toplanmıştır. Toplama numarası TU-2580-HDem olarak verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Hücre Hattı

Elde edilen ekstraktların etkisel denemelerinin yapıldığı DLD-1 hücre hattı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi Tıbbi ve Kanser Araştırma laboratuvarından temin edilmiştir. DLD -1 hücreleri insan kolorektal kanser hücreleridir, 1977-1979 yılları arasında erkek bir hastadan izole edilmiştir. RPMI-1640 besiyerinde kültüre edilmektedir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

RPMI -1640 Medium (Sigma), Fetal Bovine Serum (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Dulbecco's Phosphate Buffer (PBS) (Gibco),Trypsin-EDTA Solution (10X) (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Merck), İzopropanol (Riedel de Haen), MTT (Sigma), Trypan Blue (Merck), Biocoll Seperating Solution (Biological Industries), Taq Polimeraz (Promega), DNTP (Fermentas) Nukleaz-Free su (Dr. Zeydanlı).

3.2.Metot

3.2.1.Bitkisel ekstraktların hazırlanması

Elde edilen *Cynara* türlerinin toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuştur. Kurutulan bitkilerin amaca uygun kısımları değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Daha sonra elde edilen bitki tozları 110 ºC'de 5 saat pastör fırınında tutularak uçucu yağlar uzaklaştırılmıştır. Bu işlemden sonra bitki tozları tartılarak kartuşa yerleştirilmiş ve soklest apareyi kullanılarak n-hekzan ile 6-8 saat ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon sonucu ele geçen ekstrakt 1 gece +4 º C' de tutulduktan sonra, çözücüsünden uzaklaştırmak amacıyla rotari evoporatörde 40 º C'de buharlaştırılmıştır. Ele geçen ham ekstrakt kullanılıncaya kadar herhangi bir aktivite kaybını önlemek amacıyla -20 º C'de tutulmuştur. Bu şekilde kültür *Cynara* türünün vegetatif kısımları ve kapitulasından (E1), yabanil *Cynara* türünün vegetatif kısımları ve kapitulasından (E2) ve kültür *Cynara* türünün sadece yenen kısım olan resaptakulumundan (E3) olmak üzere 3 farklı ekstrakt elde edilmiştir.

3.2.2.Hücre kültürünün hazırlanması

DLD-1 hücrelerinin in vitro ortamda, in vivo ortamdaki gibi çoğalma ve büyümelerini sağlamak amacıyla, uygun besiyeri ortamı hazırlanmıştır. Bu amaçla; ısıyla inaktif hale getirilmiş % 10 Fetal dana serumu (FBS) ve % 1 penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 (Sigma) hücre mediyum (ortam)u kullanılmıştır. Sıvı azot tankından kryoviyal içinde alınan DLD-1 hücrelerinin hızlı çözünmesini sağlamak amacıyla 37 ºC' de birkaç dakika bekletilmiştir. Çözünen hücreler bir falkon tüpüne alınarak DMSO'yu uzaklaştırmak için üzerine FBS eklenmiş ve birkaç kez pipetleme yapılmıştır. Daha sonra 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve altta kalan hücre pelleti hazırlanan besiyeriyle dilüte edilerek 25 cm^2'lik flasklara ekim yapılmıştır. Hücreler 25 cm^2'lik flasklarda % 95 nem ve % 5 CO_2'li gaz ortamında ve 37 °C'de CO_2 inkübatöründe kültüre edilmiştir. CO_2 inkübatöründe bekletilen flask içindeki DLD-1 hücrelerinin yoğunluğuna invert mikroskopta zaman zaman bakılmış ve yoğun görünen flasklardan hücreler pasajlanarak çoğaltılması sağlanmıştır.

3.2.3.Kullanılacak ekstrakt konsantrasyonlarının hazırlanması

Ekstraktlar için uygun konsantrasyonun saptanması

Ekstraktların hangi dozda daha etkin olduğunu tespit etmek ve hangi konsantrasyonu kullanacağımıza karar vermek amacıyla ilk aşamada 5µg/ml ve 500µg/ml konsantrasyonları denenmiştir. 1,5 ml'lik ependorf tüpü içerisine her bir ekstraktan ayrı ayrı 5µg ve 500µg tartılarak konulmuş, daha sonra % 1 oranını geçmeyecek şekilde DMSO kullanılarak çözülmüş ve taze hücre mediyum (ortam)u eklenerek gereken miktara tamamlanmıştır. Ekstraktlar aynı zamanda mediyum ve PBS ile de çözülmeye çalışılmış ancak çözünme olmamıştır.

Etkin konsantrasyonların hazırlanması

Konsantrasyon denemesi yapıldıktan sonra 100µg/ml ve 1000 µg/ml arası konsantrasyonların uygun olacağı saptanmıştır. Bu amaçla her bir ekstrakt için 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlar tartılarak, ayrı ayrı ve eşit miktarda DMSO ile çözülerek hazırlanmış ve taze hücre mediyum (ortam)uyla gereken miktara tamamlanmıştır. Bu aşamadaki tüm çalışmalar; -20 ^{o}C'den çıkarılan ekstraktların aktivitelerinin kaybolmasını engellemek amacıyla buzlu rak üzerinde yapılmıştır. Ekstraktları çözerken DMSO kullandığımız için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO tercih edilmiştir. Aynı zamanda daha önce farklı hücre hatlarında çalışılmış olan ve enginarda bulunan bir flavinoid olan apigeninde temin edilerek aynı dozlarda hazırlanmıştır. Tüm ekstraktlar hazırlandıktan sonra 0,22'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan dozlar kullanılıncaya kadar +4 º C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.Hücre sayımı

Daha önce ekimi yapılmış ve yeterli hücre yoğunluğuna ulaşan flasklardan hücre sayımı yapılmıştır. Bu amaçla; önce 25 cm²'lik flasklardan hücre mediyum (ortam)u aspire (uzaklaştırmak) edilmiş, daha sonra flask yüzeyinden hücresel kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla PBS kullanılarak yıkanmış ve PBS aspire edilmiştir. Kullandığımız hücre hattı flask yüzeyine yapışarak büyüme gösterdiği için sayım

yapabilmek için hücrelerin yüzeyden kaldırılması gereklidir. Bu amaçla tripsin-EDTA kullanılarak hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlanmıştır. İnvert mikroskopta hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edilmiştir. Tüm hücreler ayrıldıktan sonra tripsinin olumsuz etkisini azaltmak amacıyla flaska hücre mediyumu (ortam) eklenerek, flasktaki tüm içerik bir falkon tüpüne alınmış daha sonra santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan kısım atılmıştır. Bu işlem sonrasında falkon tüpüne 1 ml besiyeri eklenmiş ve hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu hücre süspansiyonundan, hücre sayısı ve canlılık oranını tespit etmek için 10 µl alınarak, thoma lamı üzerine 10µl hücre + 10µl trypan blue koyulmuş, ışık mikroskobunda (Nikon) boya almayan hücreler sayılarak 1ml'de bulunan canlı hücre sayısı belirlenmiştir.

Formül; 1ml'de bulunan hücre sayısı = $5mm^2$'de sayılan hücre sayısı x 2 x 1000

3.2.5.Hücrelerin testler için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini % 70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır.

Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak, MTT testi için gereken hücre sayısında süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 100 µl hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37 ° C'de 24 saat inkübasyon sağlanmıştır. 24 saat sonra hücrelerin üzerine ekstraktların sitotoksik etkilerini belirlemek üzere ekstraktların istenen final konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri (100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml ve 1000 µg/ml) ilave edilip 24, 48 ve 72 saat 37 ° C'de CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonu elde etmek üzere stok çözeltilerden alınacak miktarlar kullanılacak hücre kültürü ortamının miktarı da göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Her deneme için iki adet kontrol grubu kullanılmıştır. Bir kontrol grubu sadece ortamı (RPMI-1640) ve kullanılan hücreyi (DLD-1) içermektedir. Diğer kontrol grubu ise (vehicle kontrol) ilave olarak ekstraktın uygulama esnasında içerisinde çözündüğü çözücünün (DMSO) maksimum konsantrasyonunu içermektedir.

3.2.6. Kandan mononükleer hücre eldesi

İlk olarak 20ml insan kanı, 1'e 1 hacimde serum fizyolojikle sulandırılmıştır. Falkon tüpü içerisine elimizdeki son hacmin üçte biri olacak şekilde fikoll konduktan sonra üzerine kan ve SF karışımı yavaşça tabakalandırılmıştır. 25 dakika santrifüj yapıldıktan sonra beyaz renkli tabaka yeni bir falkon tüpüne alınıp, 10 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp, dipteki pellet dolu medyayla (5ml) sulandırılarak thoma lamıyla hücre sayımı yapılmıştır. Daha sonra MTT testi için gereken hacimde ve sayıda hücre hazırlanıp, pleytlere dağıtılmıştır. DLD-1 hücreleri üzerine uygulanan ekstraktlar, aynı dozlarda mononükleer hücreler üzerine de uygulanmıştır.

3.2.7.MTT testi

Test maddeleri ile 24 – 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözülmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için ışık almayan bir yerde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünür hale gelmesi için her bir kuyucuğa 100 µl izopropanol ilave edilmiştir. Yaklaşık 10 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test 3 kez tekrar edilmiştir (Mosmann, 1983).

% viyabilite = (test kuyucuğunun adsorbansı / kontrol kuyucugunun adsorbansı) x 100

Kontrole göre % 50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir (IC_{50}).

3.2.8.DNA izolasyonu

Yapılan MTT testi sonucu her bir ekstrakt için 24, 48 ve 72 saatlik uygulama için IC_{50} konsantrasyonu (hücre canlılığını % 50 inhibe eden konsantrasyon) hesaplanmıştır. Daha sonra bu sonuçların ortalaması alınarak optimal IC_{50} konsantrasyonu saptanmıştır.

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 25 $cm^{2'}$lik flasklara aynı sayıda hücre ekimi yapılmış ve hücreler gereken % 70 yoğunluğa ulaştığında flasklara her bir ekstraktın final IC_{50} konsantrasyonu ve konrol grubuna ise sadece ekstraktların hazırlanmasında kullanılan miktar kadar DMSO eklenerek 48 saat inkübe edilmiştir. Bu esnada zaman zaman invert mikroskopla hücreler izlenerek farklılıklar gözlenmiştir. 48 saatin sonunda tüm flasklardaki mediyum (ortam) aspire edilmiş ve sonra flasktaki hücreler kaldırılarak santrifüjle dibe çöktürülmüştür. Pelletlerden Fermentas Genomic DNA purification kiti aracılığıyla üreticinin verdiği basamaklar takip edilerek DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar % 1,5 (w/v) agaroz jelde marker yüklenerek görüntülenmiş, DNA'da fragmantasyon olup olmadığı saptanmaya çalışılmıştır.

3.2.9.RNA izolasyonu ve RT-PCR

Her bir ekstrakt ve kontrol grubu için 25 $cm^{2'}$lik flasklara aynı sayıda hücre ekimi yapılmış ve hücreler gereken % 70 yoğunluğa ulaştığında flasklara her bir ekstrenin final IC_{50} konsantrasyonu (DNA izolasyonunda hesaplanan konsantrasyon) ve kontrol grubuna ise sadece ekstraktların hazırlanmasında kullanılan miktar kadar DMSO eklenerek 48 saat inkübe edilmiştir. Bu esnada zaman zaman invert mikroskopla hücreler izlenerek farklılıklar gözlenmiştir. 48 saatin sonunda tüm flasklardaki mediyum (ortam) aspire edilmiş ve sonra flasktaki hücreler kaldırılarak santrifüjle dibe çöktürülmüştür. Pelletlerden, Axygen RNA isolation Kiti aracılığıyla üreticinin verdiği basamaklar takip edilerek total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'lar -86 °C'de saklanmıştır. Total RNA'ların, konsantrasyonları ve saflık dereceleri Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Alınan konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurularak PCR sonuçlarının daha objektif olabilmesi için eşit konsantrasyonda (0,5 mikrogram) total RNA, Fermentas First Strand cDNA kit aracılığıyla ters transkripsiyona uğratılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA'ların 1

mikrolitresi çalışacağımız gen bölgelerine özgü primerlerinde içinde bulunduğu 25µl'lik PCR karışımına eklenerek, istenen gen bölgeleri amplifiye edilmiş ve gen ifade seviyeleri belirlenmiştir (PCR amplifikasyonları 3 kez tekrar edilmiştir).

Primer baz dizilimleri	Ürün uzunluğu (bp)
GAPDH F 5'- CAAGGTCATCCATGACAACTTTG – 3'	**496**
GAPDH R 5'- GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3'	
P21 F- 5'-AGC AGA GGA AGA CCA TGT GGA C -3'	**107**
P21 R- 5' - TTT CGA CCC TGA GAG TCT CCA G - 3'	
BCL -2 F 5'- GGA TTG TGG CCT TCT TTG AG - 3'	**219**
BCL-2 R 5'- TCT TCA GAG ACA GCC AGG AGA - 3'	
BAX-F 5'- TCT GAC GGC AAC TTC AAC TG -3'	**188**
BAX -R 5'- TTG AGG AGT CTC ACC CAA CC -3'	
P53 - F 5'- TGC GTG TGG AGT ATT TGG ATG- 3'	**300**
P53- R 5'- TGG TAC AGT CAG AGC CAA CCAG- 3'	

Tablo 3.1. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri

3.2.10.PCR optimizasyonu

İlk olarak seçilen primerlerden her biri için kullanılması gereken $MgCl_2$, Primer ve Taq polimeraz enzimi miktarlarını belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda primerlerin annealing sıcaklıkları göz önüne alınarak gradient sıcaklık denemeleri yapılmış ve uygun sıcaklık derecesi tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.2.11.PCR ürünlerinin analizi

PCR işlemi sonunda ürünler %1,0 (w/v) agaroz jelde marker (Fermentas 1kb ladder) yüklenerek görüntülenmiştir. Elde edilen bantların dansitometrik analizi Image J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çıkan sonuçlar housekeeping gen sonuçlarıyla kıyaslanarak yorumlanmıştır.

3.2.12.İstatistiksel analiz

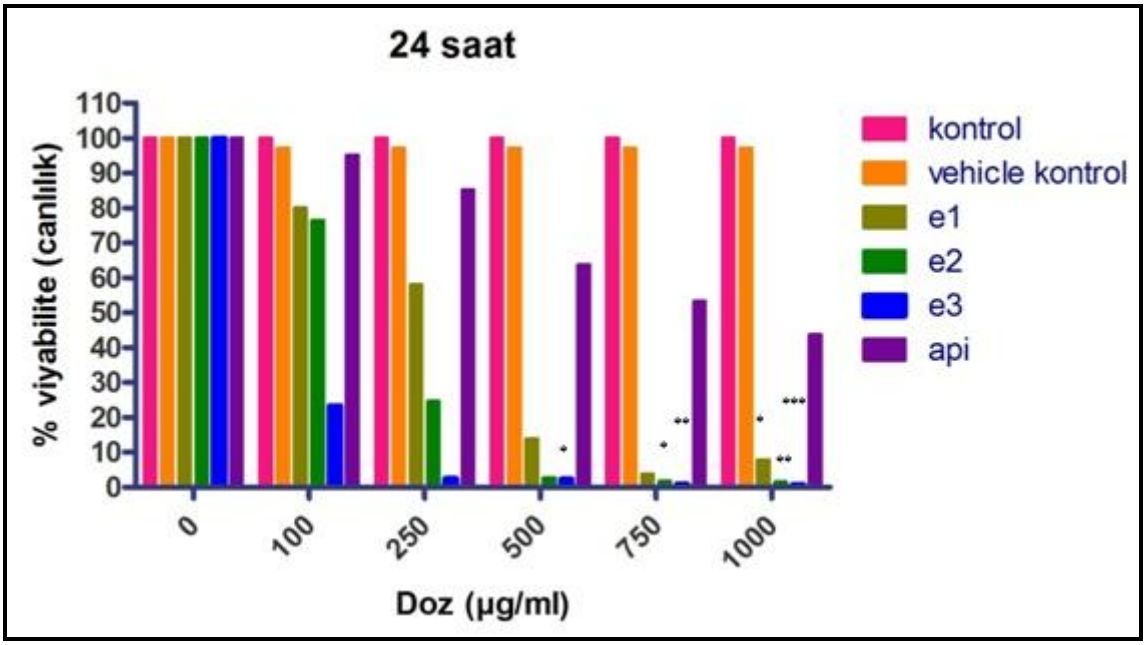
Absorbans ölçümlerine ait değerler her grubun kendi kontrolünün absorbans değerine oranlanarak % viyabilite olarak ifade edilmiştir. Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde Graph Prism 5 (Version 5.04) programı kullanılmıştır. Ayrıca, ham verilerin bilgisayarda toplanması ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmış verilerden grafiklerin hazırlanmasında Microsoft Excel (Office 2007) programından yararlanılmıştır. Deney grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve Dunnett testi uygulanarak istatistiksel değerlendirme altına alınmıştır. $p < 0.05$ düzeyinde sonuçlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretler ile gösterilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1.MTT Testi Sonuçları

4.1.1.Ekstraktların DLD-1 hücre hattı üzerine etkileri

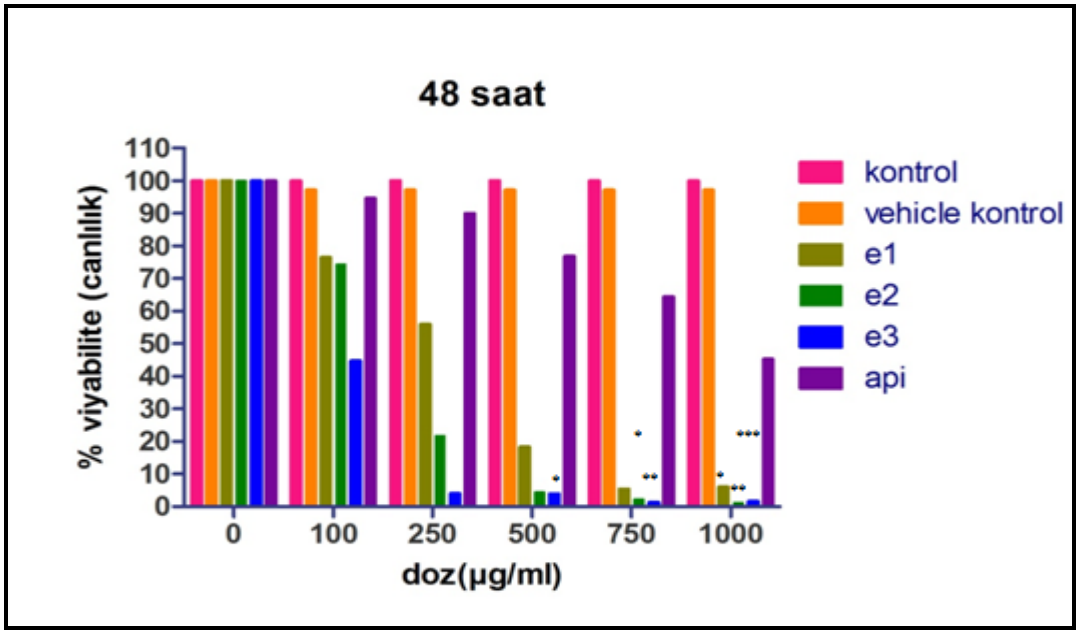
Yabani ve kültüre alınan enginar türlerinin vejatatif ve reseptakulum kısımlarından elde edilen ekstraktlar (E1, E2, E3) ve kıyaslama yapabilmek amacıyla enginarda bulunan apigenin flavinoidi DLD-1 hücre hattı üzerine uygulandıktan sonra, 24, 48, 72 saat zaman aralıklarında ölçülen MTT testi verileri doğrultusunda elde ettiğimiz % viyabilite grafikleri şöyledir;



Grafik 4. 1. Elde edilen ekstraktlar ve apigeninin DLD-1 hücre hattına 24 saatlik etkileri (*** P<0,001,** 0.001<P<0.01, * 0.01<P<0.05).

24 saatlik uygulama sonunda eşit hücre sayısıyla başlanan pleytlerdeki mitokondriyal aktivite % viyabilite olarak değerlendirildiğinde E1 ekstraktı sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 20, 250 µg/ml dozda % 42, 500 µg/ml dozda % 87, 750 µg/ml dozda % 97 ve 1000 µg/ml dozda % 93 oranında hücre ölümüne, E2 ekstraktı, 100 µg/ml dozda % 24, 250 µg/ml dozda % 76, 500 µg/ml dozda % 98, 750 µg/ml dozda % 99, 1000 µg/ml dozda % 99 oranında hücre ölümüne, E3 ekstraktı ise, 100 µg/ml dozda % 77, 250 µg/ml dozda % 98, 500 µg/ml dozda % 98, 750 µg/ml dozda % 99, 1000 µg/ml dozda % 99 oranında hücre ölümüne neden olmuştur. % viyabilite değerleri göz

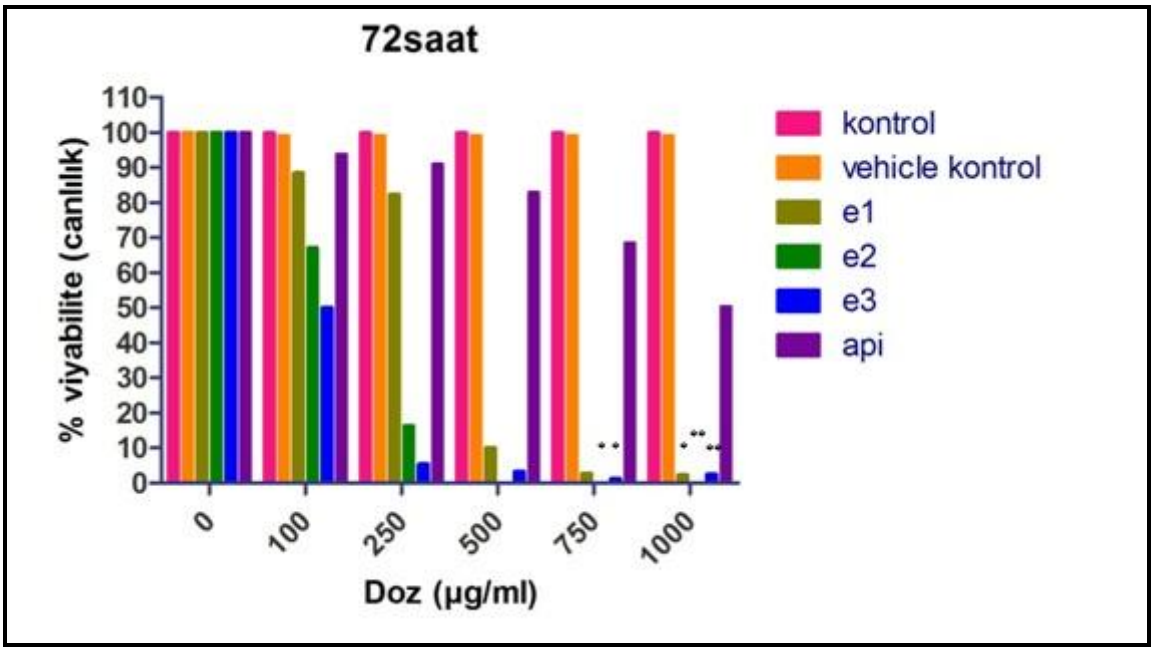
önüne alındığında ekstraktlarımızdan E2 ve E3'ün DLD-1 hücrelerini etkili bir biçimde ölüme götürdüğü gözlenmiştir. Apigenin uygulanan DLD-1 hücrelerinde ise sırasıyla 100 µg/ml dozda % 5, 250 µg/ml dozda % 15, 500 µg/ml dozda % 36, 750 µg/ml dozda % 47 ve 1000 µg/ml dozda % 56 oranında hücre ölümü saptanmıştır. Apigenin flavinoidi de hücreyi ölüme götürmede etkilidir ancak elde ettiğimiz enginar ekstraktlarına nazaran çok daha az etki göstermiştir.



Grafik 4. 2. Elde edilen ekstraktlar ve apigeninin DLD-1 hücre hattına 48 saatlik etkileri(*** P< 0,001,** 0.001<P<0.01, * 0.01<P<0.05).

48 saatlik ekstrakt uygulama sonuçlarımızı, 24 saatlik uygulamayla kıyasladığımızda çok anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. E1 ekstraktının sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 24, 250 µg/ml dozda % 45, 500 µg/ml dozda % 82, 750 µg/ml dozda % 95, 1000 µg/ml dozda % 94 oranında hücre ölümüne neden olduğu, E2 ekstraktının, 100 µg/ml dozda % 26, 250 µg/ml dozda % 79, 500 µg/ml dozda % 96, 750 µg/ml dozda % 98, 1000 µg/ml dozda ise % 99 oranında hücre ölümüne neden olduğu, E3 ekstraktının, 100 µg/ml dozda % 56, 250 µg/ml dozda % 96, 500 µg/ml dozda % 97, 750 µg/ml dozda % 99 ve 1000 µg/ml dozda % 99 oranında hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. En az sayıda canlı hücre yine E2 ve E3 ekstraktlarının uygulandığı kuyucuklarda saptanmıştır. Apigeninin sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 6, 250 µg/ml dozda % 11, 500 µg/ml dozda % 24, 750 µg/ml dozda % 36, 1000 µg/ml dozda % 55

oranında hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Tüm ekstraktların ve apigeninin uygulandığı pleytlerde doza bağlı olarak sitotoksik etki görülmüştür.



Grafik 4. 3. Elde edilen ekstraktlar ve apigeninin DLD-1 hücre hattına 72 saatlik etkileri (*** P<0,001,** 0.001<P<0.01, * 0.01<P<0.05).

72 saatlik uygulama sonucunda E1 ekstraktının sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 12, 250 µg/ml dozda % 18, 500 µg/ml dozda % 90, 750 µg/ml dozda % 98, 1000 µg/ml dozda % 98 oranında, E2 ekstraktının sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 33, 250 µg/ml dozda % 84 oranında hücre ölümüne neden olduğu ve 500 µg/ml ve sonrasındaki dozlarda hiç canlı hücre kalmadığı saptanmıştır. E3 ekstraktının sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 50, 250 µg/ml dozda % 95, 500 µg/ml dozda % 97, 750 µg/ml dozda % 98, 1000 µg/ml dozda % 99 oranında, apigeninin ise sırasıyla, 100 µg/ml dozda % 5, 250 µg/ml dozda % 10, 500 µg/ml dozda % 18, 750 µg/ml dozda % 32, 1000 µg/ml dozda % 50 oranında hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. 72 saatlik uygulamamız sonucunda en etkili ekstraktın E2 ekstraktı olduğu saptanmıştır. E2 ekstraktının etkisine % viyabilite olarak bakıldığında 500 µg/ml dozu ve sonrasında hiç canlı hücre kalmadığı görülmüştür.

Kullanılan ekstraktların DLD1 hücreleri için IC_{50} konsantrasyonları	24 saat	48 saat	72 saat
E1	294,4 µg/ml	283,7 µg/ml	297,5 µg/ml
E2	175 µg/ml	167 µg/ml	150 µg/ml
E3	65 µg/ml	78 µg/ml	100 µg/ml
Api	960 µg/ml	850 µg/ml	990 µg/ml

Tablo 4. 1. DLD-1 hücreleri üzerine ekstraktlar uygulandıktan sonra 24-48-72 saat zaman aralıklarında hesaplanan IC_{50} konsantrasyonları

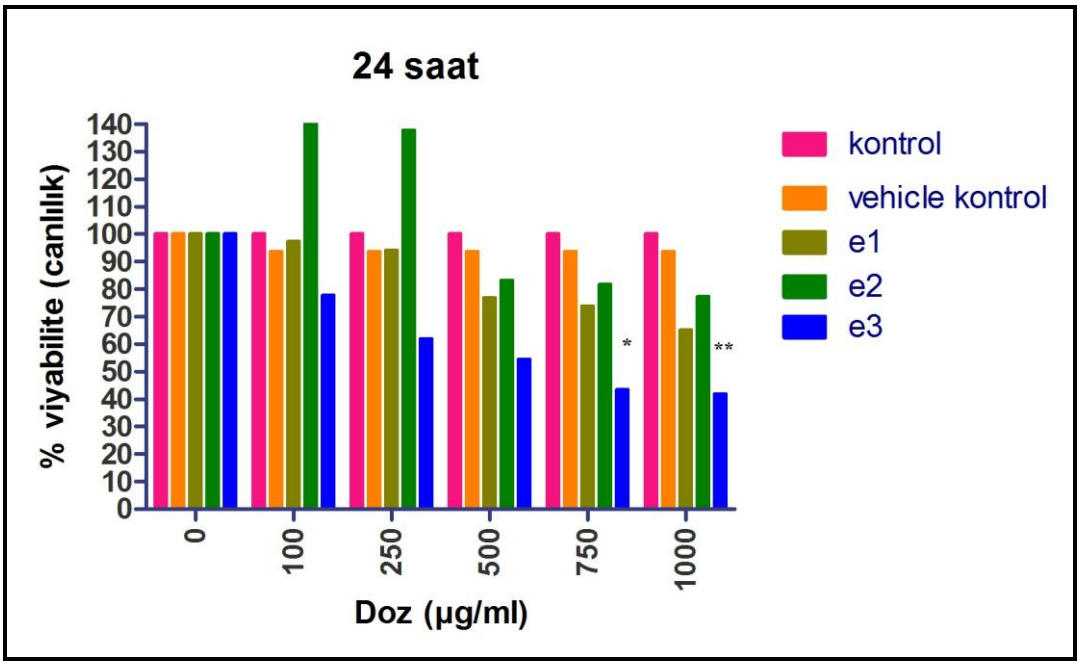
Genel olarak MTT verilerine baktığımızda E2 ekstraktının doza ve zamana bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Ekstraktlarımız için kanser hücrelerini en yüksek seviyede ölüme götüren, kontrol olarak kullanılan kan hücreleri üzerinde göz ardı edilebilir seviyede etki gösteren ideal doz ve zaman 48 saat 250-500 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Atasever ve arkadaşlarının (2003), yaptığı çalışmada enginardan elde edilen flavinoidler ALL (akut lenfoblastik lösemi) hastalarından elde edilen hücrelere ve standardize lösemi hücre hatlarına (DG75, B95, BB58, K562) uygulanmış ve özellikle ALL hastalarında apigeninin sitotoksik etkisi rapor edilmiştir. Enginardan elde edilen flavinoidler ALL hastalarından elde edilen hücreler üzerine 0,005-500 µg/ml dozlarında uygulandığında % 8-20 oranında sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar elde ettiğimiz sonuçlarla pozitif sitotoksik etki açısından uyuşmakla birlikte oransal açıdan farklılık göstermektedir. Çalışmamızda apigenin flavinoidi % 5-50 oranında sitotoksik etki göstermiştir.

Conforti ve arkadaşları (2008), bazı Akdeniz bitkilerinin tümör hücreleri üzerinde toksik etkilerini araştırmış ve en etkili ekstraktın *Cynara'dan* elde edilen hidroalkolik ekstrakt olduğu gözlemlenmiştir. Cynara ekstraktı özellikle C32 ve ACHN hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik etki göstermiştir. C32 hücreleri için IC_{50} dozu 18 µg/ml, ACHN hücreleri için ise IC_{50} dozu 21 µg/ml olarak bulunmuştur. Bizim bulduğumuz IC_{50} dozları ortalama, E1 için 292 µg/ml, E2 için 164 µg/ml, E3 için 81 µg/ml olarak saptanmıştır. Bulunan IC_{50} dozları bizim elde ettiklerimize oranla düşüktür fakat bu farklılık kullandığımız ekstraktın biyokimyasal içeriğinden, ekstraksiyon için tercih edilen çözücüden veya kullandığımız hücre hattının farklı olmasından kaynaklanabilir. Sonuç olarak enginar ekstraktlarının tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi, elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermektedir.

Mileo ve arkadaşları (2012), çalışmalarında insan meme kanseri hücre hattı olan MDA- MB231 üzerine enginardan elde edilen polifenolleri uygulamış ve sonuç olarak enginardan elde edilen polifenollerin MDA- MB231 üzerinde apoptozu indükleyici ve yayılmayı engelleyici etkisini rapor etmişlerdir. Enginardan elde edilen polifenollerin MDA- MB231 hücrelerinde canlılık oranını düşürdüğü ve hücre büyümesini inhibe ettiği sonucuna ulaşmışlardır. Bu çalışmada MDA- MB231 hücreleri 600µM dozunda % 60 oranında hücre ölümü gözlenmiştir. Artan dozlarda hücre ölümünün % 80'lere ulaştığı rapor edilmiştir. Bizde çalışmamızda artan dozlarda hücre ölümünün arttığını ve % 90'lara ulaştığını tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde yer alan sonuçlarla uyum göstermektedir.

Enginardan elde ettiğimiz ekstraktlar DLD1 kolorektal kanser hücrelerinde anlamlı hücre ölümüne sebep olurken, normal hücrelere zararı, kanser hücrelerine kıyasla oldukça az düzeydedir. Elde ettiğimiz ekstraktları kandan izole ettiğimiz mononükleer hücreler üzerine uygulayarak etkisine bakılmıştır. Sonuç olarak hücrelere dışarıdan bir müdahale olduğu için bir miktar hücre ölümü görülmüştür ancak bu durum kanser hücrelerini öldürme oranına kıyasla göz ardı edilebilir düzeydedir.



Grafik 4. 4. Elde edilen ekstraktların mononukleer hücreler üzerine 24 saatlik etkileri (** 0.001<P<0.01, * 0.01<P<0.05).

Kandan elde edilen mononukleer hücreler üzerine uygulama sonucunda E2 ekstraktı uygulanan hücrelerde belirli dozlara kadar % viyabilite miktarında artış saptanmıştır. Mononukleer kan hücrelerinde görülen bu artış vücudun dışarıdan gelen maddeye karşı gösterdiği bir reaksiyon dolayısıyla immün sistemin verdiği tepki olarak yorumlanabilir.

Enginar ekstraktlarının normal hücreler üzerindeki pozitif etkileri daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir.

Juzyszyn ve arkadaşlarının (2008), yaptığı çalışmada HUVEC hücrelerinde farklı uyaranlarla indüklenen radikal oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun, enginar ekstraktları kullanılarak azaltıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışma sonucunda alınan veriler enginardan elde edilen ekstraktların antioksidan özelliğinin yanı sıra endotel hücreleri üzerine koruyucu etki gösteren bir ajan olduğunu ortaya koymuştur. HUVEC hücrelerinde LPS kullanılarak indüklenen ROS aktivitesi % 58' e ulaşmış daha sonra enginar ekstraktlarının uygulanmasıyla ROS aktivitesi % 17' lere kadar düşmüştür. Aynı şekilde Oxi-LDL indüklemesi ile % 98' lere çıkan ROS aktivitesi enginar ekstraktı uygulanmasıyla % 22' lere kadar düşmüştür. Bu da enginar ekstraktlarının normal hücreler üzerinde antioksidan etkide bulunduğunu göstermektedir. Normal hücrelerde bulunan oksidan maddelerin uzaklaştırılması hücrenin daha sağlıklı ve uzun yaşamasına olanak sağlamaktadır.

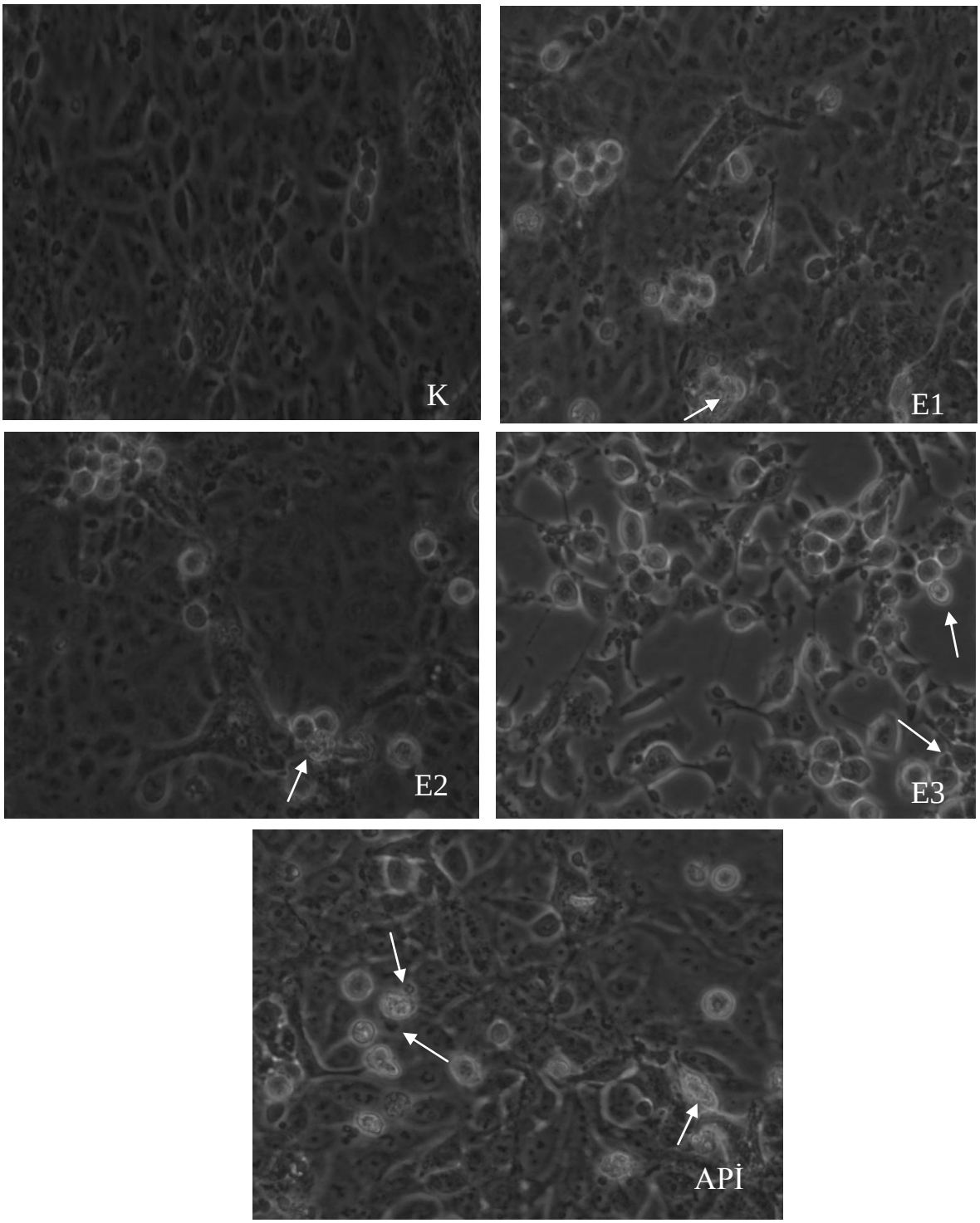
Juzyszyn ve arkadaşlarının (2010), yaptığı bir diğer çalışmada enginar ekstraktlarının rat karaciğerine uygulanması sonucunda mitokondriyal solunum zincirinin (MRC), inhibe olduğu ve ROS oluşumunun azaldığı görülmüştür. Enginar ekstraktlarının zararlı ROS gibi oksidanlara karşı antioksidan olarak kullanılabileceği ve böylece normal hücrelerin yapısını bozabilecek oksidan oluşumunu en aza indirgediği rapor edilmiştir. 5,4 µg/ml'den büyük dozlarda MRC aktivitesinin etkili olarak inhibe olduğu gözlenmiştir.

Jimenez- Escrig ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2003), erkek sıçanlara 3 hafta boyunca enginar ekstresi verilmiş ve 3 hafta sonunda enginar yaprak ekstresinin, oksidasyona sebep olan ajanlar üzerinde anlamlı bir azaltıcı etki gösterdiği rapor edilmiştir. Enginar ekstreleri in vitro ortamda LDL oksidasyonunu verimli bir şekilde inhibe etmiştir. Eritrositlerde ölçülen farklı antioksidan enzimler (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz) arasında sadece glutatyon peroksidaz aktivitesinde kontrol grubuna oranla yükselme saptanmıştır. Bu artış

oksidasyona sebep olan zararlı oksidan bileşikleri nötralize ederek hücre üzerine olumlu etki göstermektedir.

Literatür taramalarımız sonucunda enginar ekstraktları tümör hücrelerine büyük miktarlarda zarar verirken, normal hücreler üzerindeki zararlı etkisinin az olduğu hatta antioksidatif özelliği sayesinde daha çok hücreler üzerinde olumlu etki gösterebileceği sonucuna varılmıştır.

4.2.Morfolojik Gözlemler



Şekil 4.1. DLD-1 hücrelerine farklı ekstraktlar (E1, E2, E3) ve apigenin uygulanmasından 48 saat sonra (40x) flask içinde görünümleri (oklar apoptotik cisimciklere işaret etmektedir)

DLD-1 hücreleri üzerine ekstrakt uygulandıktan 48 saat sonra aldığımız görüntüler yorumlandığında kontrol grubuna oranla hücre sayısında belirgin bir azalma görülmektedir. Hücre sayısında tespit edilen bu azalmanın hücre ölümüne neden olan mekanizmalardan hangisi vasıtasıyla gerçekleştiğini morfolojik olarak saptamak pek kolay olmasa da apoptozla nekroz arasında belirgin morfolojik farklar mevcuttur.

Apoptoz ve nekroz arasındaki farklara bakıldığında apoptoz ile nekroz arasında birçok fiziksel farklılık olduğu görülmektedir. Nekrozda komşu hücre grupları etkilenirken (Cummings ve ark., 1997), apoptozda sadece hücrenin kendisi etkilenir (Spencer ve ark., 1996). Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlarken (Lu ve ark., 2000), apoptoz fizyolojik uyaranla da başlayabilir. Örnek olarak hormonal dengenin bozulması verilebilir (Wyllie, 1980). Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir (Lu ve ark., 2000). Apoptoza uğrayan hücrede ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuar cevap vardır, apoptozda böyle bir cevap söz konusu değildir (Wyllie, 1980).Nekrozda zar bütünlüğü bozulurken (Geoffey ve Robert, 2004), apoptozda zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (Spencer ve ark., 1996). Nekroz esnasında sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar (Cummings ve ark., 1997), apoptozda ise tersine, sitoplazma büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (Geoffey ve Robert, 2004). Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptoz hücrenin daha ufak fragmanlara ayrılması ile sonlanır (apoptotik cisimler) ve devamında hücre tümüyle dağılır (Cummings ve ark., 1997). Nekrozda hücre zarında vezikül oluşumu yoktur; oysa apoptozda zara bağlı veziküller oluşur (Cohen, 1993). Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptozda, apoptozu başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği, por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (Geoffey ve Robert, 2004; Cohen, 1993).

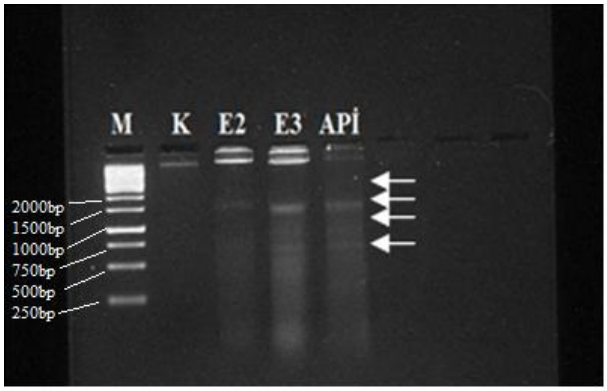
Biyokimyasal farklılıklar göz önüne alındığında ise ilk fark, nekrozda iyon dengesi kaybolurken, apoptozda sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olayların mevcudiyeti söz konusudur (Wyllie, 1980). Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptoz ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4° C'de gerçekleşemez (Cohen, 1993). Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur (Wyllie, 1980). Oysa apoptozda rastgele olmayan, mono-oligonükleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptoz için karakteristik *"ladder pattern"* denen merdiven şeklinde

kırılmalar meydana getirir (Eastman, 1995). Nekroz sırasında hücre ölümünün geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptozda mitokondri tarafından sitoplâzmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c v.b.) (Eastman, 1995). Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptozda zar asimetrisinde değişiklikler olur fakat zar büyünlüğü bozulmaz (örn: fosfotidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuar reaksiyon oluşturmadan lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar (Cohen, 1993).

Apoptozla nekrozu ayıran farklılıklara ve elde ettiğimiz mikroskop görüntülerine bakıldığında ilk dikkati çeken ekstrakt uygulanan deney gruplarındaki hücrelerde zar bütünlüğünün bozulmamış olmasıdır bunun yanı sıra hücrelerde hacimce azalma, sitoplâzmalarında büzülme ve kromatin yoğunlaşması gözlenmiştir. Morfolojik gözlemlerimiz ekstrakt uygulanan DLD1 kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla ölüme götürülmüş olduğu kanaatini oluşturmaktadır. Ancak morfolojik gözlemlerimiz sonucu ortaya atmış olduğumuz kanaatimizi moleküler açıdan desteklemek amacıyla DNA fragmantasyon analizinin yanısıra apoptoz için belirleyici olan gen bölgeleri amplifikasyonları yapılmış ve ilgili gen bölgelerinin ifade seviyelerine göre değerlendirmeler yapılmıştır.

4.3.DNA Fragmantasyonu

Hem kontrol grubundan hemde ekstrakt uygulanan ve MTT sitotoksisite testiyle en fazla etki gösterdiği saptanan gruplardan izole edilen DNA'lar % 1,5' luk agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir.



Şekil 4. 2. İzole edilen DNA'ların agaroz jelde görünümü (M: marker, K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri)

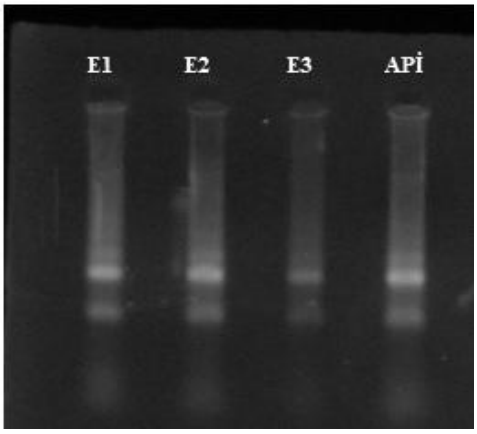
Apoptotik hücre ölümünde, endonükleazlar tarafından DNA'da fragmentler meydana getirilmesi apoptozun en belirgin göstergelerinden bir tanesidir.

DNA'da meydana gelen düzenli oligonükleozomal kırıklar hücre ölümünün apoptoz yolu ile gerçekleştiğini göstermektedir. Yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda ekstraktlarımızdan E2, E3 ve apigeninin DLD-1 kolorektal kanser hücrelerini apoptotik olarak ölüme götürdüğü saptanmıştır. E2, E3 ve apigeninde DNA fragmantasyonu net olarak görülmektedir (Şekil 4. 2).

4.4.RT-PCR Sonuçları

Elde ettiğimiz ekstraktların ve apigeninin 48 saat için IC_{50} dozları hesaplanmış ve bu dozlar DLD-1 hücreleri üzerine uygulandıktan sonra total RNA izolasyonu yapılmıştır.

Elde edilen RNA'lar % 1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir.(Şekil 4.3.) Daha sonra RNA kaliteleri nanodrop cihazıyla ölçülmüştür.(Tablo 4.2.)



Şekil 4. 3. İzole edilen RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi

Deney Grubu	**Nükleik asit konsantrasyonu**	**Birim**	**A_{260}**	**A_{280}**	**A_{260}/A_{280}**
Kontrol	177,3	ng/µl	4,433	2,238	2,00
E1	106,0	ng/µl	2,650	1,342	1,98
E2	47,5	ng/µl	1,188	0,603	1,97
E3	96,4	ng/µl	2,411	1,217	1,98
Apigenin	169,5	ng/µl	4,138	2,096	1,97

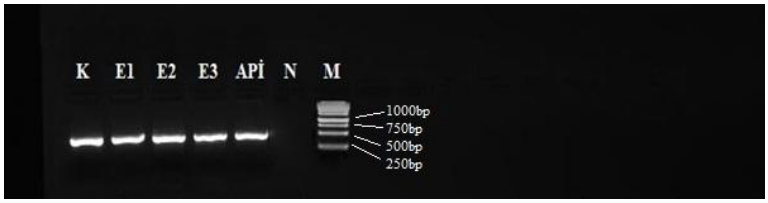
Tablo 4. 2. İzole edilen RNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları

İzole ettiğimiz RNA'ların A_{260}/A_{280} absorbans değerleri kaliteli RNA diyebileceğimiz aralıktadır (A_{260}/A_{280} >1,95). Gen ekspresyon sonuçlarını kıyaslarken konsantrasyon farkından kaynaklanabilecek hata payını azaltmak amacıyla eşit konsantrasyonda RNA alınarak cDNA'ya çevrilmiştir. En düşük konsantrasyondaki RNA, E2 ekstraktını uyguladığımız hücrelerden elde edildiği için konsantrasyon eşitlemesi bu gruba göre yapılmıştır.

4.5.Gen Ekspresyon Sonuçları

4.5.1.GAPDH

Housekeeping gen olarak tercih ettiğimiz GAPDH geni PCR amplifikasyonu yapıldıktan sonra % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 4. 4. GAPDH ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi (K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri, N: Negatif kontrol, M: marker)

GAPDH geninin, hücrelerin tümünde eksprese olduğu ve ekspresyon seviyelerinin dokudan dokuya değişiklik göstermediği agaroz jel görüntümüzde de görülmektedir.

İnternal kontrolümüz olan GAPDH gen ürünlerinin jele yüklenmesi sonucunda GAPDH gen ekspresyonu seviyelerinde bir farklılık olmayışı bize bundan sonraki PCR ürünlerimizin ekspresyon düzeyleri hakkında daha iyi yorum yapabilme olanağı sağlamıştır.

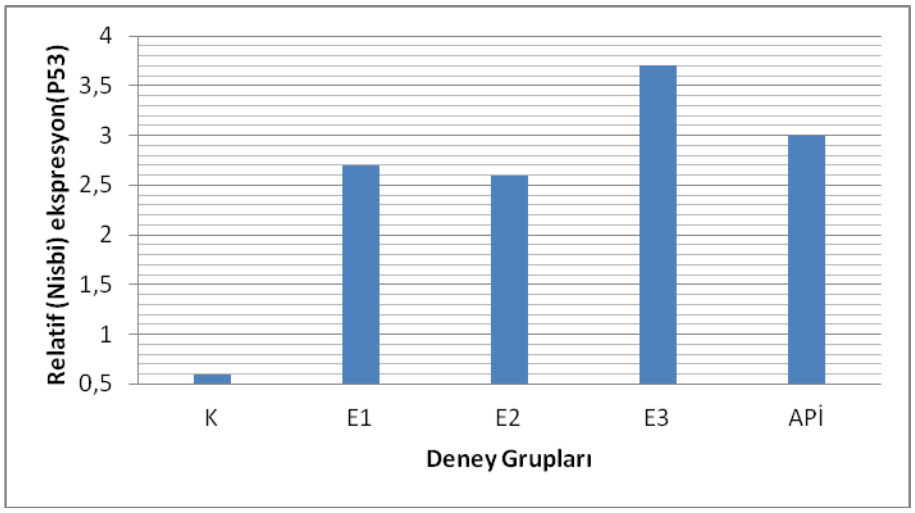
4.5.2.P53

Tümör baskılayıcı P53 geni PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen bantların dansitometrik analizi yapılmıştır.



Şekil 4. 5. P53 gen ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi(M: marker, K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri)

P53 geni PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülerine bakıldığında kontrol grubuna oranla P53 gen ekspresyonunda gözle görülür bir artış saptanmıştır. Bantların dansitometrik analiz sonuçlarını internal kontrolümüz GAPDH geni PCR ürünlerine oranladığımızda P53 geninin relatif ekspresyon düzeyinin arttığı görülmüştür.



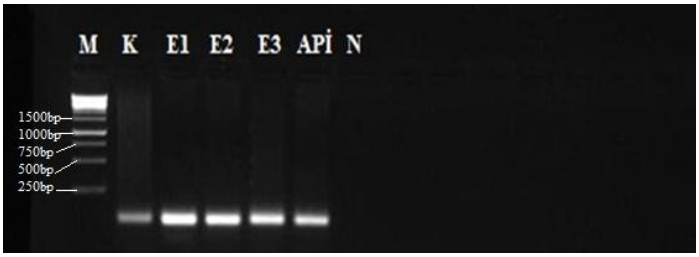
Grafik 4. 5. P53 geninin relatif (nisbi) ekspresyon düzeyleri (Gen/GAPDH)

Çalışmamızda P53 gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede artış gösterdiği saptanmıştır. P53 gen ekspresyon seviyeleri yüksekten aza doğru sırasıyla E3, apigenin, E1, E2 ve kontrol grubunda gözlenmiştir. P53 gen ekspresyon seviyesinde E3 ekstraktını uyguladığımız DLD1 hücrelerinde kontrole oranla 3 kat, apigeninde 2.5 kat, E1 ve E2'de yaklaşık 2 kat artış saptanmıştır.

Zhong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HCT-116 hücreleri üzerine apigenin uygulaması sonrası P53 ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede değişmediği ancak translasyonel seviyede arttığı rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2010). Biz çalışmamızda P53 gen aktivitesinin transkripsiyonel seviyede arttığını tespit ettik. Bu da uygulamış olduğumuz ekstraktların DLD-1 kolorektal kanser hücrelerini apoptozis yoluyla ölüme götürdüğü düşüncemizi desteklemektedir.

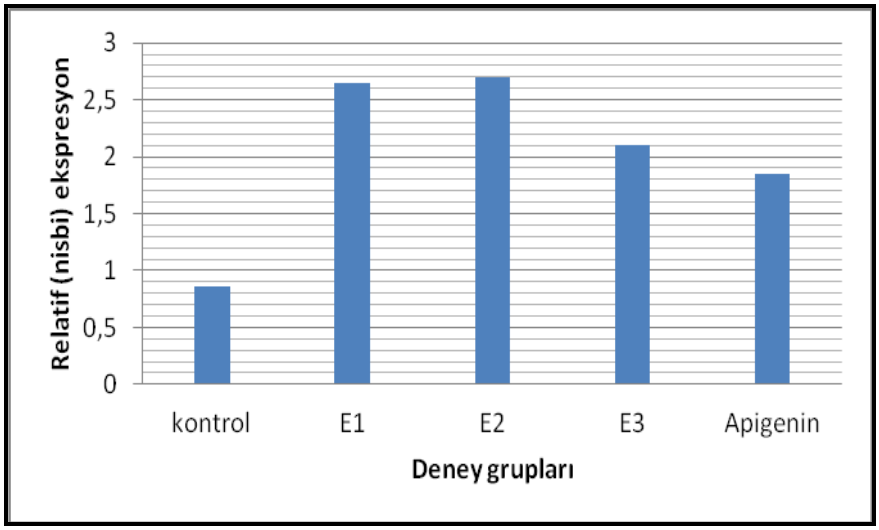
4.5.3.P21

Tümör baskılayıcı P21 geni PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen bantların dansitometrik analizi yapılmıştır.



Şekil 4. 6. P21 gen ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi (M: marker, K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri, N: negatif kontrol)

P21 gen ürünleri agaroz jel sonuçlarına bakıldığında kalitatif olarak P21 gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmektedir. Kontrol grubumuza oranla, ekstrakt uygulamış olduğumuz hücrelerde P21 ekspresyonunda belirgin bir artış saptanmıştır. Ancak elde edilen bantların kantitatif olarak yorumlanabilmesi için dansitometrik olarak analiz edilmesi gerekmektedir. Hem internal kontrolümüz olan GAPDH gen ürünlerinin bantları hemde P21 gen ürünlerinin bantları dansitometrik olarak ölçüldükten sonra P21 geninin nisbi ekspresyon düzeyleri hesaplanmıştır.



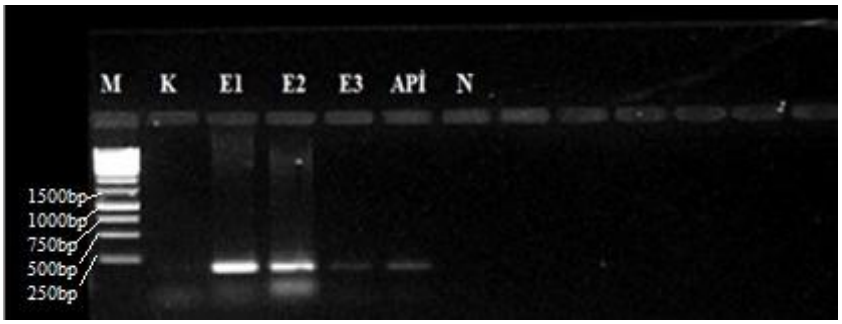
Grafik 4. 6. P21 geninin relatif (nisbi) ekspresyon düzeyleri (Gen/GAPDH)

P21 gen ekspresyonunu GAPDH housekeeping gen sonuçlarımıza oranladığımızda P21 geninin relatif (nisbi) ekspresyonunun, kontrol grubu olan DLD-1 hücrelerindekine oranla transkripsiyonel seviyede arttığı gözlenmiştir. P21 gen ekspresyon seviyesinde kontrole oranla, E1 ekstraktını uyguladığımız DLD1 hücrelerinde 2.2 kat, E2'de 2.3 kat, E3'te 2 kat, apigeninde ise 1.6 kat artış saptanmıştır.

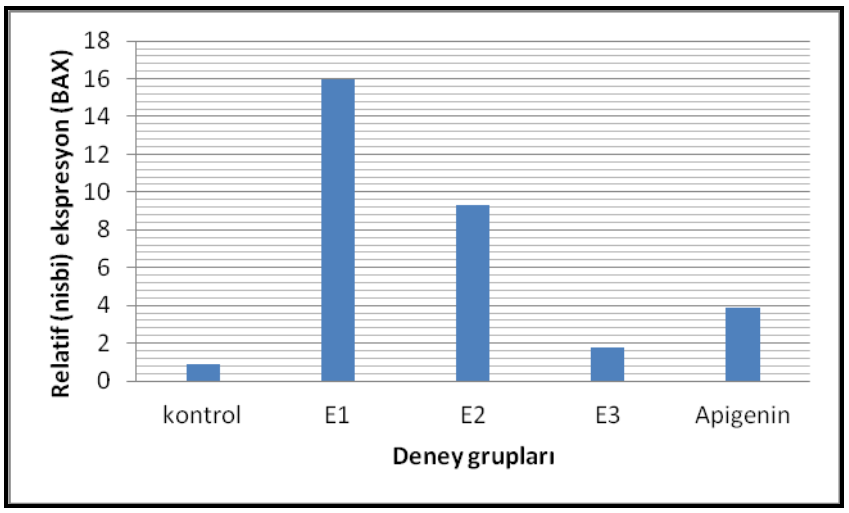
Zhong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HCT-116 hücreleri üzerine apigenin uygulaması sonrası P21 ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede değişmediği ancak translasyonel seviyede arttığı rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2010). Biz çalışmamızda P21 gen aktivitesinin transkripsiyonel aşamada farklılık gösterdiğini saptadık. Kontrol grubuna oranladığımızda kullandığımız ekstraktların bir hücre siklusu inhibitörü olan P21 geni aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Ancak P21 gen aktivitesindeki bu artış tümör hücrelerini apoptoza götürmede kendi başına yeterli değildir. Hücre siklusu sürecinde negatif düzenleyici olarak işlev gören p21, siklin bağımlı kinazları inhibe ederek hücre siklusunun G1 safhasında durmasına neden olmaktadır. Bu aşamada hasarın onarılmasına olanak tanınmakta eğer DNA'daki hasar onarılamayacak düzeydeyse yardımcı yolaklarla hücre apoptoza yönlendirilmektedir.

4.5.4.BAX

Proapoptotik BAX geni PCR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir. Daha sonra görüntülenen bantların dansitometrik analizleri yapılmıştır.



Şekil 4. 7. BAX gen ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi **(**M: marker, K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri, N: negatif kontrol)



Grafik 4. 7. BAX geninin relatif (nisbi) ekspresyon düzeyleri (Gen/GAPDH)

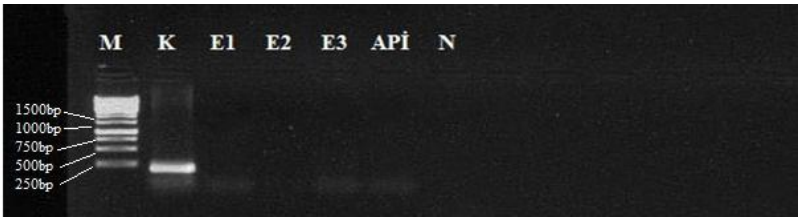
BAX gen ürünlerinin dansitometrik analizleri sonucunda ekstrakt uygulamış olduğumuz DLD-1 hücrelerinde kontrole oranla pro-apoptotik BAX geni ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Özellikle E1 ve E2 ekstraktı uygulanan DLD-1 hücrelerinde BAX gen ekspresyonunda belirgin artış saptanmıştır. BAX gen ekspresyon seviyesinde kontrole oranla, E1 ekstraktını uyguladığımız DLD1 hücrelerinde 8 kat, E2'de 5 kat, E3'te 1.6 kat, apigeninde ise 2.9 kat artış saptanmıştır.

BAX gen ekspresyonunda saptanan artış kanserli hücrelerin membran geçirgenliğini artırmakta ve sonuçta sitokrom c salınımına yol açmaktadır. Bu da

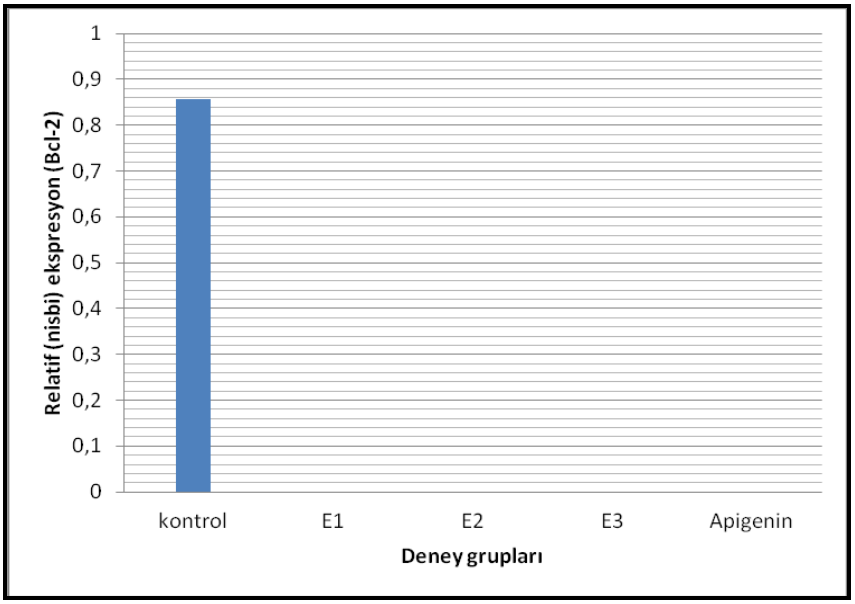
ekstraktlarımızın kanserli hücreleri apoptotik olarak ölüme götürdüğünün bir göstergesidir.

4.5.5.BCL-2

Antiapoptotik BCL-2 geni PCR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir. Daha sonra görüntülenen bantların dansitometrik analizleri yapılmıştır.



Şekil 4. 8. BCL-2 gen ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi (M: marker, K: ekstrakt uygulanmayan DLD1 hücreleri, N: Negatif kontrol)



Grafik 4. 8. BCL-2 geninin relatif (nisbi) ekspresyon düzeyleri (Gen/GAPDH)

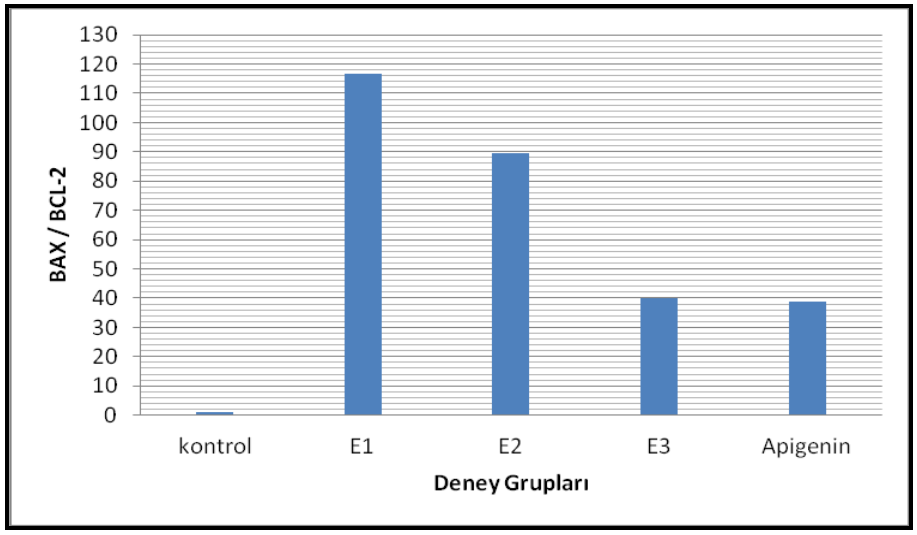
Kontrol grubu olarak amplifikasyonu yapılan antiapoptotik BCL-2 gen bölgesine ait yüksek gen ifadesi DLD-1 hücre hattının apoptoza dirençli olduğunu göstermektedir.

Farklı konsantrasyonlarda denenen ekstraktlarımızın hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkilerinin yanında bu hücre hatları üzerinde amplifikasyonları yapılan BCL-2 gen amplifikasyonlarına dayalı ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna oranla oldukça

düşük bulunmuştur. Bu sonuca göre ekstraktlarımızın BCL-2 engelini kaldırarak programlı hücre ölümü (apoptoz) yolağını etkinleştirmiş olabileceğini söyleyebiliriz.

4.5.6.BAX/BCL-2 oranları

BAX geni için ölçtüğümüz dansitometrik ekspresyon sonuçlarını, BCL-2 geni için ölçtüğümüz dansitometrik ekspresyon sonuçlarıyla kıyasladığımızda kontrol grubuna oranla BCL-2 gen ekspresyonunda yüksek oranda azalma, BAX gen ekspresyonunda ise belirgin seviyede artış saptanmıştır. Proapoptotik BAX geni ekspresyonundaki bu artış hücrelerin apoptotik olarak ölüme sürüklendiğinin bir göstergesidir. Aynı şekilde kontrol grubunda oldukça yüksek olan antiapoptotik BCL-2 ekspresyonunda görülen azalma sitokrom c salınımındaki engeli kaldıracağından hücreler apoptotik olarak ölüme yönelmişlerdir.



Grafik 4. 9. BAX/ BCL-2 genlerinin relatif (nisbi) ekspresyon düzeyleri oranı

Mileo ve arkadaşları (2012), çalışmalarında insan meme kanseri hücre hattı olan MDA- MB231 üzerine enginardan elde edilen polifenolleri uygulamış, BAX ve BCL-2 gen ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. BAX gen ekspresyonunun doza dayalı olarak arttığı, aynı şekilde BCL-2 gen ekspresyonunda doz arttıkça azalma gösterdiği rapor edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında artış gösteren BAX/ BCL-2 oranı hücre ölüm nedeninin apoptoz olduğunu göstermektedir.

Bizde çalışmamızda ekstraktlarımızın artan dozlarda hücre ölümüne neden olduğunu ve IC_{50} (81 µg/ml - 292 µg/ml) dozları uygulandığında, kontrol grubuna

oranla BAX/ BCL-2 oranında artışa sebep olduğunu saptadık. Sonuç olarak bulgularımız daha önce rapor edilen çalışmalarla bu açıdan uyum göstermektedir.

Gupta ve arkadaşları (2002), çalışmalarında LNCap hücreleri üzerine apigenin uygulayarak hücre siklusunu durdurma ve BAX/BCL-2 proteini oranına bağlı olarak apoptoza götürme etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda apigeninin hücre siklusunu durdurduğu ve 10-20 mM konsantrasyonları uygulandığında BAX proteininde artış bunun yanı sıra aynı dozlarda BCL-2 proteininde azalma saptanmıştır. Çalışmamızda BAX ve BCL-2 oranına ve elde ettiğimiz RT-PCR verileri doğrultusunda 81 µg/ml - 292 µg/ml dozlarında, transkripsiyonel seviyede BAX gen ekspresyonunda artış, BCL-2'de ise azalma saptadık. Gelecekte devam edecek çalışmalarımızda Western blotting analizleri ile post-translasyonel seviyedeki farklılıklar belirlenecektir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Günümüzde kanser tedavisinde kemoterapik ilaçlar geniş bir spektrumda kullanılmakla birlikte yan etkileri ve immün sisteme vermiş olduğu hasar nedeniyle sürekli tedavi amaçlı yeni arayışlar ilgili alanda devam etmektedir. Bu hedef doğrultusunda bitkisel kaynaklı birçok bileşen son zamanlarda kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan ve potansiyel olarak sağlık üzerinde faydalı etkileri olan doğal ürünler arasında özellikle polifenol yapıda antioksidanlar içeren enginar oldukça zengin bir kaynak olarak görülmektedir (Wegener ve Fintelmann, 1999; Wang ve ark., 2003). Şimdiye kadar enginardan çeşitli yollarla elde edilmiş ekstrakt veya çay nevindeki süzüntülerin farklı doku ve organlara şifa amaçlı uygulamaları ve olumlu birçok etkisi hem klinik hemde etnobotanik kaynaklı araştırmalarda rapor edilmiştir (Gebhardt, 1997; Saenz Rodriguez ve ark., 2002; Speroni ve ark., 2003; Conforti ve ark., 2008; Juzyszyn ve ark., 2010; Mileo ve ark., 2012). Çoğunlukla karaciğer ve safra kesesi üzerinde olumlu etkisi olduğu rapor edilen ve besin kaynağı olarak da tüketilen enginar bitkisinin kolorektal DLD1 kanser hücreleri üzerine olan apoptotik etkisi dünyada ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Ayrıca ekstraklarımızın kanser hücrelerinin sürekli bölünmesini yavaşlatması ayrı bir önem arz etmektedir. Yeni anti kanser ilaç araştırmalarında kanser hücrelerine karşı en çok tercih edilen metot sitotoksisite testleridir. Ancak bazı durumlarda anti kanser ilaçları tümör hücrelerine seçici olması gerekirken, tüm hücreleri öldürebilir. Bu durum göz önüne alındığında sadece kanser hücreleri üzerinde selektif etki gösteren, aynı zamanda da normal hücreler üzerindeki etkisi göz ardı edilebilir düzeyde olan fitokimyasallara gereksinim duyulmaktadır.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda yabanil formdan elde ettiğimiz ekstraktın DLD-1 kanser hücreleri üzerine etkisinin diğer ekstraktlara oranla daha fazla olması yabanil gen kaynaklarının korunması, etkili ve sürdürülebilir kullanımı üzerine ilgi çekmektedir. Yabanil gen kaynaklarımızı kültüre alınan soylarla genetik açıdan kıyasladığımızda yapay seçilim ve gen ayıklaması sebebiyle ekimi dikimi yapılan çeşitlerin çok dar bir gen havuzuna sahip olduğunu görmekteyiz. Bu çalışma ile yabanil türden elde edilen ekstraktların DLD1 kolorektal kanser hücreleri üzerine olan sitotoksik ve apoptototik etkisinin daha yüksek olmasını biz bu sebebe bağlamaktayız. Yabanil türlerden elde edilen ekstraklar daha fazla aktif gen ve dolayısıyla gen

ürününden kaynaklanan daha geniş yelpazede bir içeriğe ve sekonder metabolitlere sahipken kültüre alınanlar nispeten daha sınırlı etken madde ve içeriğe sahip olacaktır. Dolayısıyla çalışmamızda belirlenen sitotoksik ve apoptotik aktivite açısından yabani türlerden elde edilen ekstraktlar kanser hücreleri üzerine daha etkili olmuştur. Sonuçlarımız yaban gen kaynaklarının ne denli önemli olduğunu, koruma ve çeşit geliştirme çalışmalarında ne kadar dikkatli olmamız gereğini bir kez daha gözler önüne sermektedir.

Bu tez çalışması süresince DLD1 kolorektal kanser hücreleri üzerine uygulanan ekstraktların P53 ve P21 gen aktivitesini arttırdığının belirlenmesi önemli bir sonuçtur. Tümör baskılayıcı genler içerisinde en önemlilerinden birisi olan P53 geninin ifadesinin ekstrakt uygulanan kanser hücre hatlarında kontrole kıyasla belirgin seviyelerde artmış olması hücrelerin programlı hücre ölümüne yönlendiğini göstermektedir. Tedavide kanseri yok etmek kadar hastalığın seyrinin yavaşlatılması da o derece önemlidir. Artan P21 aktivitesi ekstraktların hücre siklusunu G1 safhasında durdurduğunu göstermektedir. Normal hücrelerde siklusun G1 safhasında durdurulması hasarın onarımına olanak tanımaktadır. Kanser hücrelerinde genellikle böyle bir onarım mümkün olamadığından, ekstraktlar kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünmeyi nispeten durdurarak etki göstermişlerdir.

Bu etkinin yanı sıra ekstrakt uygulanan kanser hücre hatlarında Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonunda anlamlı ölçüde farklılık saptanmıştır. Kontrol grubuna oranla Bax geninde görülen artış hücre membran permeabilitesini artırarak sitokrom c salınımına yol açmış ve bu sayede hücreleri apoptotik olarak ölüme yönlendirilmiştir. Aynı şekilde Bcl-2 geninde kontrol grubuna oranla yüksek ölçüde azalma saptanmıştır. Bcl-2 geninde saptanan bu azalma membran sağlamlığını azaltarak sitokrom c salınımının önündeki engeli kaldırmaktadır. Bax/ Bcl-2 oranı apoptoz için belirleyici bir parametredir. Kontrol grubuna oranla ekstraktlarımızın uygulandığı kanser hücre soylarında artan Bax/ Bcl-2 oranı hücre ölümünün apoptoz vasıtasıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

5.2. Öneriler

Uygulamış olduğumuz ektraktlarımızın sitotoksik aktivitelerinin yüksek olması ve kanser hücrelerini programlı hücre ölümüne götürmesi gelecekte yapılacak anti kanser ilaç geliştirme programları ve araştırmaları için temel bir destek ve bilgi kaynağı olacaktır. Bu durum göz önüne alındığında sadece kanser hücreleri üzerinde selektif etki gösteren fitokimyasallara gereksinim duyulmaktadır. Bu açıdan da uygulamış olduğumuz ekstraklarımızın normal kan hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin oldukça düşük seviyede; hatta kanser hücreleri üzerinde yüksek seviyede toksik etki gösteren bazı dozlarda normal kan hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin sıfır seviyesinde olması nedeniyle antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında enginar bitkisinden elde edilecek etken maddelerin önemli bir yeri olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında kullanılan enginar türlerinden özellikle yabani enginarın kolorektal kanserle ilgili antikanser ilaç geliştirme programları ve araştırmalarında önemli bir gen kaynağı olacağını düşünmekteyiz. Öncede vurguladığımız gibi kansere yakalandıktan sonra mücadele yerine, kansere yakalanma riskine karşı akıllı beslenme yolu ile korunma daha etkili bir stratejidir. Özellikle sofra kültürümüzde önemli bir yeri olan enginar gibi antioksidan nitelikli sebzelerin tüketilmesi çağımızın vebası olan kanser oranının belli seviyelerde azalmasında etkili olacaktır.

KAYNAKLAR

Anonymous, 2012, http://www.rainforest-database.com/plants/artichoke.htm. [Ziyaret Tarihi: 22 Mart 2012].

Abeloff, M. D., Armitage, J. O., Lichter, A. S. and Niederhuber, J. E., 1995, Clinical Oncology, *Edinburg: Churchill Livingstone Inc*., 1267-1287.

Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yeşilada, E. ve Çevik, C., 2000, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology,* 73: 121-129.

Ali, A. M., Umar-Tsafe, N., Mohamed, S. M., Inayat-Hussain, S. H., Oo, K. T., Yusoff, K., Osman, A. N., Din, L. B., 2001, Apoptosis induction in CEMSS T-Lymphoblastic leukemic cell line by goniothalamin, *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys.,* 5, 227-235.

Atasever, B., Akgün-Dar, K., Erdem Kuruca, S., Turan, N., Seyhanlı, V., Meriçli, A., 2003, *Cynara syriaca'dan* elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi, *Ankara Ecz. Fak. Derg*. 32(3)143-150.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., Clark, B. J., 2005, GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, *Physiol Genomics* 21: 389–395.

Barile, F. A., 1994, Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods, *CRC Pres,* Florida, USA.

Barnes, P. J., 2004, Alveolar Macrophages as orchestrators of COPD, *J COPD*. 1: 59–70.

Bellamy, C. O., Malcomson, R. D., Harrison, D. J., Wyllie, A. H., 1995, Cell death in health and disease, The biology and regulation of apoptosis, *Cancer Biology*, 6: 3-16.

Ben Ezra, J. M., Kornstein, M. J., Grimes, M. M., Krystal, G., 1994, Small cell carcinomas of the lung express the bcl-2 protein, *Am. J. Pathol.,* 145, 1036–40.

Bicknell, G. R., Snowden, R. T., Cohen, G. M., 1994, Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937, *J. Cell Sci.* 107 (Pt 9) 2483–2489.

Bilim, V. N., Tomita, Y., Kawasaki, T., Takeda, M., Takahashi, K., 1998, Variable bcl-2 phenotype in benign and malign lesions of urothelium, *Cancer Lett,* 128:87-92.

Bökesoy, A., Çakıcı, İ., Melli, M., 2000, Farmakoloji Ders Kitabı, *Gazi Kitabevi,* Ankara.

Bundy, R., Walker, A. F., Middleton, R. W., Marakıs, G., Booth, J. C. L., 2004, Artichoke Leaf Extract Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome and Improves Quality of Life in Otherwise Healthy Volunteers Suffering from Concomitant Dyspepsia: A Subset Analysis, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine,* 10(4): 667-669.

Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cel. Mol. Med.,* 7: 249-257.

Bustin, S. A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.

Çalışkan, M., 2000, Apoptosis: Programlanmış hücre ölümleri, *Turk J Zool*., 24, Ek Sayı, 31-35.

Chang, H. Y. and Yang, X., 2000, Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases, *Microbiology and Mol. Biol. Rev.,* 64, 821–846.

Chen, Y. Q., Cipriano, S. C., Arenkiel, J. M., Miller, F. R., 1995, Tumor suppression by p21 (wAF), *Cancer Res*., 55: 4536-4539.

Cheng, E. H. Y. A., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., Korsmeyer, S. J., 2001, BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis, *Molecular Cell*, 8, 705-711.

Cohen, J. J., 1993, Apoptosis, *Immunol Today.*, 14:126-130.

Collier, A. C. and Pritsos, C. A., 2003, The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT, *Biochemical Pharmacology*, 66(2): 281 - 287.

Conforti, F., Ioele, G., Statti, G. A, Marrelli, M., Ragno, G., Menichini, F., 2008, Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants, *Food and Chemical Toxicology,* 46, 3325–3332.

Cummings, M. C., Winterford, C. M., Walker, N. I., 1997, Apoptosis, *Am J Surg Pathol.*, 21:88-101.

Davis, P. H., 1975, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 5, Edinburgh: Edinburgh University Press.

De Almeida, C. J., Linden, R., 2005, Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance, *Cell Mol. Life Sci.,* 62, 1532-1546.

De Paolis, A., Pignone, D., Morgese, A., Sonnante, G., 2008, Characterization and differential expression analysis of artichoke phenylalanine ammonia-lysase-coding sequences, *Physiologia Plantarum*, 132: 33-43.

Deveraux, Q. L., Reed, J. C., 1999, IAP family proteins–suppressors of apoptosis, *Genes Dev*., 13, 239-252.

Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., Zumla, A., 2004, Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *Biotechniques* 37: 112–119.

Dobrucalı, A., 2012, Kalın barsak kanseri [online], http:// http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser/ [Ziyaret Tarihi:25 Temmuz 2012].

Doğan, A., Doğan, A. L., Canpınar, H., Demirpençe E., 2004, Hidroksi ürenin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkileri, *Türk Biyokimya Dergisi*, 29(3), 232-236.

Donepudi, M. and Grütter, M. G., 2002, Structure and zymogen activities of caspases, *Biophysical Chemistry*, 101-102: 145-53.

Durhan, E., 2006, Kolon kanser tanılı olgularda PCR-RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması konulu Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Afyon.

Durmaz, R., 2004, "Uygulamalı Moleküler Biyoloji", İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

Duthie, G. and Crozier, A., 2000, Plant-derived phenolic antioxidants, *Curr. Opin. Lipidol*., 11: 43 - 47.

Dwyer, J. T., 1988, Health aspects of vegetarian diets, *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 712–738.

Eastman, A., 1995, Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis, *Cancer Biology*, 6: 45-52.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 1993, WAFl, a potential mediator of ~53 tumor suppression, *Cell*, 75:817-825.

Entschladen, F., Drell, T. L., Lang, K., Joseph, J., Zaenker, K. S., 2004, Cell-Cell Migration, Invasion and Metastasis: Navigation By Neurotransmitters, *Lancet Oncol.*, 5, 254-258.

Erster, S., Moll, U. M., 2005, Stress induced p53 runs a transcription-independent death programme, *Biochem Biophys Res Commun.*, 331:843-850.

Evans, V. G., 1993, Multiple pathways to apoptosis, *Cell Biol. Int.*, 17, 461 - 476.

Fritsche, J., Beindorff, M. C., Dachtler, M., Zhang, H., Lammers, G. J., 2002, Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds, *European Food Research and Technology*, 215: 149-157.

Fong, K. M., Minna, J. D., 2002, Molecular Biology Of Lung cancer, Clinical İmplication, *Clinics İn Chest Medicine*, 23: 83-101.

Fulda, S., Debatin, K. M., 2004, Apoptosis signaling in tumor therapy, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1028, 150 - 156.

Gebhardt, R., 1997, Antioxidative and Protective Properties of Extracts from Leaves of the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) against Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Cultured Rat Hepatocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144: 279-286.

Gewies, A., 2003, Introduction to Apoptosis, *ApoReview*,1-26.

Genç, S., Akhisaroğlu, M., Genç, K., 2002, Eritropoetin'in PC12 hücre Hattında Amiloid-Beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, *Turkish Journal of Geriatrics*, 5(1), 1-6.

Geoffey, M. C., Robert, E. H., 2004, The Cell a molecular approach, *Boston, ASM Press.*

Gerschenson, L. E., Rotello, R. J., 1993, Apoptosis: a different type of cell death, *FASEB J*., 6: 2450-2455.

Gren, D., Kroemer, G., 1998, The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?, *Trends Cell Biol.*, 8, 267–271.

Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., Hickman, J. A., 1999, Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis, *J Cell Biol.*, 144: 903-914.

Goni, I., Jimenez-Escrig, A., Gudiel, M., Saura-Calıxto, F. D., 2005, Artichoke (*Cynara scolymus* L) modifies bacterial enzymatic activities and antioxidant status in rat cecum. *Nutrition Research*, 25: 607-615.

Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J., 1999, Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev*., 13, 1899–1911.

Gupta, S., Afaq, F., Mukhtar, H., 2002, Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells, *Oncogene*, 21, 3727- 3738.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., 2008, New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies, *Turk Kardiyol Dern Ars*., 36: 120- 130.

Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M., Paraskeva, C., 1994, Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas, *Oncogene*, 9, 3367–3370.

Harada, H., Grant, S., 2003, Apoptosis regulators, *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, 7, 117-138.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., 1993, Keyomarsi, K., Elledge, S. J., The p21 interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases, *Cell*, 75: 805-816.

Hastak, K., Gupta, S., Ahmad, N., Agarwal, M. K., Agarwal, M. L., Mukhtar, H., 2003, Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells, *Oncogene*, 22, 4851–4859.

Hausler, M., Ganzera, M., Abel, G., Popp, M., Stuppner, H., 2002, Determination of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in *Cynara scolymus* L. by High Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia*, 56**:** 407-411.

Hayot, C., Debeir, O., Van Ham, P., Van Damme, M., Kiss, R., Decaestecker, C., 2005, Characterization of the Activities of Actin-Affecting Drugs On Tumor Cell Migration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 211,30.

Hengartner, M. O., 2000, The Biochemistry of apoptosis, *Nature*, 12: 407 (6805) :770-776.

Holst, C. M., Oredsson, S. M., 2005, Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines, *Toxicology in Vitro*, 19, 379-387.

Howe, C., 1997, Gene Cloning and Manipulation, *Cambridge University Pres.*

Huber, R., Muller, M., Naumann, J., Schenk, T., Ludtke, R., 2009, Artichoke leave extract for chronic hepatitis C – A pilot study, *Phytomedicine*, 16(9): 801-4.

Hung, R. W. Y, Chow, A. W., 2004, Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis, *Clin Invest Med*., 27: 324-44.

Hussain, S. P., Harris, C. C., 2000, Molecular Epidemiology and Carcinogenesis: Endogenous and exogenous carcinogens, *Mutation Research*, 311-322.

Iervolino, A., Trisciuoglio, D., Ribatti, D., Candiloro, A., Biroccio, A., Zupi, G., Del Bualo, D., 2002, Bcl-2 over expression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity, *The Faseb J.*, 16, 11453-11455.

Jemal, A., Tiwari, R. C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E. J., Thun, M. J., 2004, American Cancer Society: Cancer Statistics, *CA Cancer J. Clin.*, 54: 8-29.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Formad, D., 2011, Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, 61:69–90.

Jesnowski, R., Backhaus, C., Ringel, J., and Lohr, M., 2002, Ribosomal Highly Basic 23-kDa Protein as a Reliable Standard for Gene Expression Analysis, *Pancreatology*, 2: 421-424.

Jiménez-Escrig, A., Dragsted, L. O., Daneshvar, B., Pulido, R., Saura-Calixto, F., 2003, In Vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Effect on Biomarkers of Antioxidants in Rat, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (18), 5540–5545.

Juzyszyn, Z., Czerny, B., Pawlik, A., Droździk, M., 2008, The effect of artichoke (Cynara scolymus L.) extract on ROS generation in HUVEC cells, *Phytother Res.* ;22(9):1159-61.

Juzyszyn, Z., Czerny, B., Pawlik, A., Drozdzik, M. 2008a. Effect of artichoke extract (*Cynara scolymus* L.) on palmitic-1-^{14}C acid oxidation in rats, *Molecular Nutrition & Food Research*, 52**:** 589-594.

Juzyszyn, Z., Czerny, B., Myśliwiec, Z., Pawlik, A., Droździk, M., 2010, The effect of artichoke (Cynara scolymus L.) extract on respiratory chain system activity in rat liver mitochondria, Phytother Res., ;24 Suppl 2:S123-8.

Kayaalp, S. O., 2000, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, *Hacettepe Tas,* Cilt 1, Ankara.

Kim, H. P., Mani, I., Iversen, L., Ziboh, V. A., 1998, Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs, Prostaglandins, *Leukot Essent Fatty Acids*, 58:17–24.

Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D., 1997, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis, *Science*, 275, 1132–1136.

Klug, S. W., Cummings, M. R., *Concepts of Genetics*, 6 th Ed., Printice Hall, Oxford 2000.

Klug, S. W., Cummings, M. R., *Concepts of Genetics*, 8 th Ed., Printice Hall, Oxford 2011.

Korkmaz, S., 2002, Paklitaksel, kesretin, ve berberinin A549, HeLa, HT-29, NIH3T3 hücre kültürlerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.

Kuhn, C., Yu, S. H., Chraplyvy, M., Linder, H. E., Senior, R. M., 1976, The induction of emphysema with elastase II. Changes in connective tissue, *Lab Invest*. 34: 372–380.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R. A., 1996, Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice, *Nature*, 384, 368–372.

Kuida, K., Haydar, T. F., Juan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., Flavell, R. A., 1998, Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase-9, *Cell*, 94, 325–337.

Lambrechts, A., Troys, M. V., Ampe, C., 2004, The Actin Cytoskeleton in Normal and Pathological Cell Motility, *The Int. Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36, 1890-1909.

Langdon, S. P., 2004, Cancer Cell Culture, Methods and Protocols, *Humana Press, Totowa*, New Jersey.

Lowitz, B. B., Casciato, A. D., "Cancer Biology and Oncogens" , Medical Oncology and Principles Of Cancer Biology, 2003.

Lu, J., Ashwell, K., Ken, W. S., Waite, P., 2000, Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis, *Spine*, 25:1859-1866.

Lutz, M., Henrı´quez, C., Escobar, M., 2011, Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.*),* raw and cooked, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 49–54.

Lynch, H. T., de la Chapelle, A., 2003, Hereditary colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.,* 348: 919–32.

Mathur, R., Gupta, S. K., Singh, N., Sandeep, M., Kochupillai, V., Velpandian, T., 2006, Evaluation of The Effect of *Withania somnifera* Root Extract On Cell Cycle and Angiogenesis, *J. of Ethnopharmacology*, 105(3), 336-344.

Mcmahon, M., Woods, D., 2001, Regulation of The p53 Pathway by Ras, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1471, 63-71.

McVean, M., Xiao, H., Isobe, K., Pelling, J. C., 2000, Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes, *Carcinogenesis*, 21, 633–639.

Mileo, A. M., Di Venere, D., Linsalata, V., Fraioli, R., Miccadei, S., 2012, Artichoke Polyphenols Induce Apoptosis and Decrease the Invasive Potential of the Human Breast Cancer Cell Line, MDA-MB231, *J. Cell. Physiol.,* 227: 3301–3309.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. A., Yuan, J., 1993, Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C.elegans cell death gene ced-3, *Cell*, 75, 653–660.

Mohamed, S. M., Ali, A. M., Rahmani, M., Wiart, C., Dhaliwal, J. S., Yusoff, K., 2000, Apoptotic and necrotic cell death manifestations in leukemic cells treated with methylgerambullin a sulphone from Glycosmis calcicola, *J.Biochem. Mol. Biol. & Biophys*, 4, 253–261.

Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**,** *Journal of Immunological Methods*, Volume 65, Issues 1–2, 16, Pages 55-63.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 1998, *Harper'ın Biyokimyası,* Barış Kitabevi, İstanbul.

Naumov, G., Macdonald, I., Weinmeister, P., Kerkvliet, N., Nadkami, K. V., Wilson, S. M., Morris, V. L., Groom, A. C., Chambers, A. F., 2002, Persistence Of Solitary Mammary Carcinoma Cells in a Secondary Site: A Possible Contributor to Dormancy, *Cancer Res*., 62, 2162-2168.

Offermanns, S., Rosenthal, W., 2003, Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology, *Springer*, Berlin, Heidelberg.

Özdemir, E., 1998, P53 as a key in the understanding of urethelial carcinogenesis, *T. Klin Med Sci*., 18: 277 - 284.

Park, C. S., Kim, S. I., Lee, M. S., Youn, C., Kim, D. J., Jho, E., Song, W. K., 2004, Modulation of Catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2, *J Biol Chem*, 19: 19592-19599.

Perez-Garcia, F., Adzet, T., Canigueral, S., 2000, Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen in human leukocytes, *Free Rad. Res.*, 33(5): 661–65.

Riboli, E., Norat, T., 2003, Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk, *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 559-569.

Romani, A., Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A., Heimler, D., 2006, Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.), *Food Chemistry*, 95: 221-225.

Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner C., 1998, Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c, *Nature* (London), 391, 496-499.

Saenz Rodreguez, T., Garcia Gimenez, D., de la Puerta Vazquez, R., 2002, Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichole leaf extract in rats, *Phytomedicine;* 9, 8.

Sato, T., Irie, S., Krajewski, S., Reed, J. C., 1994, Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein, *Gene*, 140:291-292.

Schierie, G. S., Hansson, O., Leist, M., Nicotera, P., Widner, H., Brundin, P., 1999, Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants, *Nat. Med.*, 5, 97–100.

Shi, M., Cai, Q. Y. L., Mao, Y., Ming, Y., Ouyang, G., 2006, Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian canser cells, *Cell Biology International*, 30, 221-226.

Spencer, S., Cataldo, N. A., Jaffe, R. B., 1996, Apoptosis in the human female reproductive tract, *Obstet Gynecol Survey*. 5: 314-323.

Speroni, E., Cervetallati, R., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C., Guerra, M. C. 2003. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints, *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 203-211.

Spivack, S. D., Fasco, M. J., Walker, V. E., Kaminsky, L. S., 1997, The molecular epidemiology of Lung Cancer, *Crit. Rev., Toxicology* 27: 319-365.

Sporn, M. B., 1996, The War On Cancer, *Lancet*, 347, 1377-1381.

Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., 1998, Properties of the caspases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1387, 17-31.

Steward, B. W., Kleihues, P., 2003, Colorectal Cancer, World Cancer Report, *Lyon: IARC Press*, 198–202.

Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Reddanna, P., 2005, Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro,*Cancer Letters*, 224; 1, 31-43.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M.,Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G., 1999, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, 397, 441–446.

Szondy, Z., 1997, Methylprednisolone and 2-chloroadenosine induce DNA fragmentation at different stages of human T-lymphocyte development, *Immunol Lett.*, 58: 59–65.

Şinik, A., 2008, Enginarda (*Cynara scolymus* L.) sulama; azot form ve dozlarının yaprak oluşumu ve aktif içerik maddeleri üzerinde etkileri konulu Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*,İzmir.

Talar-Wojnarowska, R., Sasor, A., Strzelczyk, J., Janiak, A., Maltecka - Panas,E., 2002, p53, c-erbB-2, bax and bcl-2 expression in Pancreatic Cancer (PC) and Chronic Pancreatitis (CP), *Pancreatology*, 2, 217–361.

Tan, X., Hu, D., Li, S., Han, Y., Zhang, Y., Zhou, D., 2000, Differences of fourcatechins in cell cycle arrest and induction of apoptosis in LoVo cells, *Cancer Letters*, Volume 158, Issue 1, 29, 1–6.

Temizkan, G. , Yılmazer, S., Öztürk, M., Arı, S., Etan, H., Sarıkaya, A. T., Arda, N., 2004, "Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler", İstanbul Üniversitesi *BİYOGEM yayınları*, İstanbul.

Thomadaki, H., Scorilas, A. 2006, BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43, 1-67.

Thompson & Thompson, 2005, Tıbbi Genetik, 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.

Tsujimoto, Y., 1998, Role of bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, *Genes Cells*, 3, 697–707.

Ullmannova, V., Haskovec, C., 2003, The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR, *Folia Biol (Praha)*, 49: 211–216.

Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W., 2002, Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis, *Anat Histol Embryol.*, 31(4): 214-23.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannilkulchai, N., Beckmann J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., Wallach, D., 1998, Targeted disruption of the mouse caspase-8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally, *Immunity*, 9, 267–276.

Wang, C., Kurzer, M.S., 1997, Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells, *Nutrition and Cancer*, 28, 236–247.

Wang, W., Heideman, L., Chung, C. S., Pelling, J. C., Koehler, K. J., Birt, D. F., 2000, Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines, *Molecular Carcinogenesis*, 28, 102–110.

Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q. Y., Tadmor, Y., 2003, Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 51: 601–608.

Walker, A. F., Middleton, R. W., Petrowicz, O., 2001, Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a post-marketing surveillance study, *Phytother. Res.*, 15(1): 58-61.

Wegener, T., Fintelmann, V., 1999, Pharmacological properties and therapeutic profile of artichoke (*Cynara scolymus* L.), *Wien Med Wochenschr*, 149: 241–247.

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y. A., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J., 2001, Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death, *Science*, 292, 727-730.

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle Peter, R., Büchler Markus, W., 2005, Colorectal Cancer, *Lancet*, 365: 153–65.

Wyllie, A. H., 1980,Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, *Nature*, 284:555-556.

Wu, F., Lukinius, A., Bergström, M., Eriksson, B., Watanabe, Y., Lagström, B., 2005, A Mechanism behind the antitumour effect of 6-diazo-5-oxo-Lnorleucine (DON): disruption of mitochondria, *European Journal of Cancer*, 35(7), 1155-1161.

Yalçın, A., Nevruz, O., Arpacı, F., Gülhan, Ö., Hasde, M., Beyan, C., 2003, GATA Hastanesi 2001 yılı malignite olgularının incelenmesi, *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(2), 196-200.

Yang, Z. Y., Perkins, N. D., Ohno, T., Nabel, E. G., Nabel, G. J., 1995, The p21 cyclin dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo, *Nat. Med* 1: 1052-1056.

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., Wang, X., 1997, Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science*, 275, 1129–1132.

Yano, C. L., Marcondes, M. C. C. G., 2005, Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro, *Free Radical Biology & medicine*, 39(10), 1378-1384.

Zapolska-Downar, D., Zapolski-Downar, A., Naruszewicz, M., Siennicka, A., Krasnodebska, B., Koldziej, B., 2002, Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes, *Life Sci.*, 71(24): 2897.

Zhivotovsky, B., Wade, D., Gahm, A., Orrenius, S., Nicotera, P., 1994, Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation, *FEBS Lett.* 351: 150–154.

Zhong, Y., Krisanapun, C., Lee, S. H., Nualsanit , T., Sams, C., Peungvicha, P., Baek ,S. J., 2010, Molecular targets of apigenin in colorectal cancer cells: Involvement of p21, NAG-1 and p53, *European Journal Of Cancer*, 46 ; 3365-3374.

Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., 2001, BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak, *Genes and Development*, 15, 1481-1486.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : ELA NUR ŞİMŞEK
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA 26.06.86
Telefon : 5313791658
Faks : -
e-mail : elasimsek@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Akın Gönen Anadolu Lisesi,Bor,Niğde	2004
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Konya	2009
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2007	Gülhane Askeri Tıp Akademisi/Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Stajyer
2008	Gülhane Askeri Tıp Akademisi/Tıbbi Genetik Laboratuvarı	Stajyer
2011	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİLLER: İngilizce, Almanca