ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prunus laurocerasus BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİKANSER AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE İNCELENMESİ

Melike AKDOĞAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Melike AKDOĞAN tarafından hazırlanan **"***Prunus laurocerasus* BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİKANSER AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE İNCELENMESİ" adlı tez çalışması 13/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Jüri Üyeleri

Başkan: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Tamer Keçeli
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "*Prunus laurocerasus* BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİKANSER AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE İNCELENMESİ" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (13/06/2019).

Melike AKDOĞAN

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Prunus laurocerasus BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİKANSER AKTİVİTE ÖZELLİKLERİNİN GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ SİSTEMİ İLE İNCELENMESİ

Melike AKDOĞAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

"*Prunus laurocerasus* Bitkisinin Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Antikanser Aktivite Özelliklerinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi İle İncelenmesi" isimli tez çalışması kapsamında *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyveleri, meyve ve çekirdek kısımlarına ayrılmıştır. Suda kaynatıp etil asetat ile ekstraksiyon ve kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] ile maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon olmak üzere iki farklı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrelerin kimyasal bileşen analizleri LC-MS/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu ekstrelerin insan rahim kanseri hücrelerine (HeLa), prostat kanseri hücrelerine (PC3) ve sıçan beyin tümörü hücrelerine (C6) karşı antikanser aktivite çalışmaları, xCelligence RTCA SP cihazı ile yapılmıştır. Sonuç olarak yapılan LC-MS/MS analiz sonucuna göre *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve ve çekirdek kısımlarının suyla kaynatılıp etil asetat ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstreler içerisinde ana bileşen klorojenik asit olarak belirlenmiştir. Aynı bitkinin meyve ve çekirdek kısımlarının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrelerin ana bileşeni ise kinik asit olarak belirlenmiştir. *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve ve çekirdek kısımlarının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerinin yüksek dozda HeLa ve C6 hücrelerine karşı oldukça kuvvetli antikanser aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstresinin yüksek dozda PC3 hücrelerine karşı güçlü antikanser etkiye sahip olduğu görülmüştür.

2019, 59 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Prunus laurocerasus*, antikanser aktivite, LC-MS/MS

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF CHEMICAL CONTENT OF *Prunus laurocerasus* PLANT AND INVESTIGATION OF ANTICANCER ACTIVITY PROPERTIES BY REAL-TIME CELL ANALYSIS SYSTEM

Melike AKDOĞAN

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisors: Assist. Prof. Dr. Muhammed ALTUN

Prunus laurocerasus plant is divided into fruit and seed parts within the scope of the thesis called Determination of Chemical Content of *Prunus laurocerasus* Plant and Investigation of Anticancer Activity Properties by Real-Time Cell Analysis System. Two different extraction processes were carried out, which were boiled in water and extracted with ethyl acetate and maceration with chloroform:methanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)]. Chemical component analyzes of the extracts were carried out by LC-MS/MS. Anticancer activity studies of these extracts against human cervical cancer cells (HeLa), human prostate cancer cells (PC3) and mouse brain tumor cells (C6) were performed with the xCelligence RTCA SP device. The main component of the extracts obtained by boiled in water and extraction with ethyl acetate was determined as chlorogenic acid. The main component of the extracts obtained by extraction with chloroform:methanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] was determined as quinic acid. It was found that the fruit and seed extracts obtained by the boiled in water and extracted with ethyl acetate method showed strong anticancer activity at high doses against to HeLa and C6 cells. In addition, the fruit portion of the *Prunus laurocerasus* plant was boiled in water and the extract obtained from the extraction of the aqueous with ethyl acetate had a strong anticancer effect at high-dose against PC3 cells.

2019, 59 pages

Keywords: *Prunus laurocerasus*, anticancer activity, LC-MS/MS

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a, kromatografik analiz çalışmalarının gerçekleşmesinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Abdullah YILMAZ'a, tez çalışmalarımda emek veren Öğr. Gör. Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye, hiçbir zaman desteklerini esirgemeden güvenerek sabırla ve inançla yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne ve her anımda benimle olup destek olan aileme, 15 Temmuz Şehitlerine ve Gazilerine teşekkürlerimi sunarım.

Melike AKDOĞAN
Çankırı, Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ…….....i
ÖZET…...……ii
ABSTRACT…...……...…….…iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR…….……..iv
SİMGELER VE KISALTMALAR..……....vii
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...……..……...viii
ÇİZELGELER DİZİNİ…….……...…….…….....x
1. GİRİŞ……..…….……..1
2. KURAMSAL TEMELLER……..……..3
2.1. Kanser…….…….…4
2.2. Kanser türleri…….…….…..4
2.3. Kanser risk faktörleri…….……..…6
2.3.1. Davranışsal risk faktörleri ..……..……...……6
2.3.2. Biyolojik risk faktörleri…….……...……6
2.3.3. Çevresel risk faktörleri.....7
2.3.4. Genetik risk faktörleri…….……...……...……7
2.4. Türkiye'deki bitki çeşitliliği……..…..…..…7
2.5. Biyokaçakçılık…….…..8
2.6. Bitkiler ve sekonder metabolitler……..…..……..…..……9
2.7. *Prunus laurocerasus* (Taflan)...……..…….……..……10
3. MATERYAL VE METOT……....14
3.1. Materyal ……..……...……...14
3.1.1. Kullanılan kimyasallar…….…...14
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar…….……14
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması…….……..…….....…15
3.1.3.1. DMEM (-) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) çözeltisi……15
3.1.3.2. DMEM (+) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) çözeltisi……15
3.1.3.3. Tripsin-EDTA Çözeltisi……..……..…….15

3.1.3.4. Penicilin-Streptomycin Çözeltisi ……..…….…...…16
3.2. Metot……...…….16
3.2.1. Hücre kültürü ……...…….…….…….16
3.2.2. Örneklerin hazırlanması……..……..…..17
3.2.3. Antikanser aktivite testleri…….……..……...…….17
3.2.4. Hücrelerin sayılması……..……..……23
3.2.5. Hücrelerin dondurulması ve saklanması……..……...……..24
3.2.6. Numunelerin kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi……...……...…...……24
4. BULGULAR ……...……...26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..……...….50
KAYNAKLAR……...……54
ÖZGEÇMİŞ……..…….…….59

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-FU	5-Florourasil
C6	Fare beyin tümörü hücresi
CI	Cell index
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (besi yeri)
DMSO	Dimetil sülfoksit
HeLa	İnsan rahim kanseri hücresi
PC3	İnsan prostat kanseri hücresi
PEAÇ	*Prunus laurocerasus* bitkisinin çekirdek kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstre
PEAM	*Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstre
PMeChÇ	*Prunus laurocerasus* bitkisinin çekirdek kısmının kloroform:metanol (1:1) çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstre
PMeChM	*Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve kısmının kloroform:metanol (1:1) çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstre
RTCA SP	Real time cell analyzer single plate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye'de kanser gelişimine bağlı maliyet artışı……..….4
Şekil 2.2 Türkiye'de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü……..…5
Şekil 2.3 Türkiye'de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü……..5
Şekil 2.4 Dünyada erkekler üzerinde görülen ilk 5 kanser türü…….....5
Şekil 2.5 Dünyada kadınlar üzerinde görülen ilk 5 kanser türü……..……6
Şekil 2.6 Biyokaçakçılık……9
Şekil 2.7 Taflan bitkisinin yaprağı……...……...11
Şekil 2.8 Taflan bitkisinin meyvesi……..12
Şekil 2.9 Taflan bitkisinin çekirdeği……...…..……13
Şekil 3.1. xCELLigence RTCA SP cihazı……..18
Şekil 3.2. E-Plate 96……18
Şekil 3.3. E-Plate 96 kuyucuklarının yakından görünümü ve tek bir kuyucuk……19
Şekil 3.4. E-Plate 96 kuyucuğu ve empedans değişimine bağlı ölçüm sisteminin şematik gösterimi……..19
Şekil 3.5. E-Plate 96 kuyucuklarının zemininde yer alan mikroelektrotların ve hücrelerin neden olduğu empedans değişimi ölçümünün şematik gösterimi…….....20
Şekil 3.6. Hücre örneklerinin E-Plate 96'ya eklenmesi ve fizyolojik şartların sağlandığı CO_2 inkübatöründe bulunan RTCA istasyonuna yerleştirilmesi…...…...…...21
Şekil 3.7. A) E-Plate 96 kuyucuklarının zemininde bulunan elektrotların şematik gösterimi B) E-Plate 96'nın tek bir kuyucuğunun fotoğrafı C) Elektrotların ve hücrelerin siyah beyaz fotoğrafı (monochrome) D) Altın elektrotlar ve E-Plate zeminine tutunmuş hücreler……21
Şekil 3. 8. Hücre sayım cihazı…..……..……..……..23
Şekil 3.9. *Prunus laurocerasus* bitkisinin iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre eldesinin şematik gösterimi……..……...24
Şekil 3.10. *Prunus laurocerasus* bitkisinin iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre eldesi……...25
Şekil 4.1. Standartlara ait LC-MS/MS kromatogramı……27
Şekil 4.2. PMeChÇ ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı.…….…….…….…28
Şekil 4.3. PMeChM ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı…….……..…..…28
Şekil 4.4. PEAÇ ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı..……..……28
Şekil 4.5. PEAM ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı.……..…..29
Şekil 4.6. PMeChÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……..……..…….……30
Şekil 4.7. PMeChM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……...……...31
Şekil 4.8. PEAÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……..32
Şekil 4.9. PEAM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……..……..…..34
Şekil 4.10. 5-FU'in HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği…..……..……...…36
Şekil 4.11. PMeChÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği…..……..……..….37

Şekil 4.12. PMeChM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği...…….38
Şekil 4.13. PEAÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……..……..……...39
Şekil 4.14. PEAM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği…….……..…41
Şekil 4.15. 5-FU'in PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……...……...42
Şekil 4.16. PMeChÇ ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği …..…….…….….43
Şekil 4.17. PMeChM ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği …..……..….44
Şekil 4.18. PEAÇ ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği…….…….46
Şekil 4.19. PEAM ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği…….…….47
Şekil 4.20. 5-FU'in C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği……..……48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. *Prunus laurocerasus* bitkisinin kısımlarına verilen kodlar ve elde edilen ekstre miktarları..……..……..26

Çizelge 4.2. *Prunus laurocerasus* bitkisinden elde edilen ekstrelerin LC-MS/MS analiz sonuçları…….……..……..27

1. GİRİŞ

İnsanlar yüzyıllardan beri hastalıklarla mücadele için tıbbi ve aromatik bitkilerden faydalanmışlardır. Bitkilerin tedavi edici özelliği, içerdikleri etkili maddelerden kaynaklanmaktadır. Bu maddelerin yapısının aydınlatılması ve fizyolojik özellikleri üzerindeki çalışmalar sonucu pek çok bitkisel ürün; kozmetikte, tıpta, eczacılıkta, gıdaların muhafazasında, zirai mücadelede, günlük diyette ve çeşitli sanayi kuruluşlarında kullanılmaktadır.

Günümüzde çoğu kanser türü tedavi edilememektedir. Tedavi edilebilenlerin maliyeti ise hayli yüksektir. Kanser tedavisindeki en büyük sorunlardan biri kemoterapi ilaçlarının sağlıklı hücreleri de etkilemesidir. Sağlıklı hücrelerde minimum toksik etki gösterip asıl kanser hücrelerini hedef alan yeni bileşiklerin keşfedilmesi önem arz etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, birçok doğal bileşiğin normal hücrelerde düşük toksisite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Ülkemizde her sene yaklaşık 200.000, dünya genelinde ise 12.700.000 kişi, çağımızın en önemli hastalıklarından biri olan kansere yakalanmakta ve yarısından fazlası bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Dünya Sağlık Örgütü kaynaklarına göre, kanser hastalıklarına karşı önlem alınamazsa, dünya çapında 26.000.000 insanın, 2030 yılına kadar kansere yakalanacağı ve bu hastaların yarısından fazlasının hayatlarını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Özkan vd., 2015).

Kanser tedavisinde kullanılan doğal bileşiklerin büyük bir kısmı bitkilerden sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalar; yeni maddelerin izolasyonunun, biyolojik ve fizyolojik aktivitelerinin belirlenmesinin ve kullanım sahalarının araştırılmasının önemini daha çok artırmıştır. Bu durum, yeni ilaç kaynağı olarak yüksek bitkilerin potansiyelinin büyüklüğünü ortaya koymaktadır.

Bitkilerde, primer ve sekonder metabolitler olarak çok sayıda organik bileşikler sentezlenir. Primer metabolitler fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi önemli

olaylarda görev alırlar (fitosteroller, lipitler, aminoasitler gibi). Sekonder metabolitler ise anabolizma ve katabolizmada yer almayan ancak sentezlendiği organizmaya avantaj sağladığı tahmin edilen fitokimyasallardır. Sekonder metabolitler, son zamanlarda yoğun çalışılan kemotaksonomik potansiyele sahip doğal moleküllerdir. Doğal ürünler, kompleks karışımlardan oluşan ve çok miktarda potansiyel aktif bileşik içeren oldukça önemli maddelerdir. Bitkinin kimyasal olarak değerlendirilmesi ve kalite kontrolü için bazı ana bileşenler "belirleyici bileşikler" olarak seçilebilir, oysa aktif bileşiklerin çoğu az miktardaki ikincil bileşenlerdir.

Prunus laurocerasus, Spermatopyta bölümü, Angiospermaea alt bölümü, Magnoliatae sınıfı, Rosaceae familyası Rrunoideae alt familyası Laurocerasus Duhamel cinsine ait bir bitkidir (Orhan *et al.* 2011, Elmastaş vd. 2013, Kolaylı vd. 2003). *Laurocerasus officinalis* Roemer ismiyle de bilinmektedir. Ülkemizde taflan, karayemiş, laz yemişi, laz kirazı gibi isimlerle de anılmaktadır. *Prunus laurocerasus* meyveleri fenolik ve flavonoid içerikler barındırmaktadır. Taze, kurutulmuş veya marmelat/pekmez şeklinde tüketilir (Alasalvar vd. 2005, Ayaz vd. 1997). Yaprakları siyanojenik glikozidler içerir. Anadolu'da geleneksel tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan, iyileştirici etkilere sahip bir bitkidir (Halilova vd. 2010, Karahalil vd. 2011, Karabegović vd. 2014, Sahan vd. 2012).

Prunus laurocerasus bitkisinin kimyasal içeriğinin ve antikanser aktivite potansiyelinin çalışılması ve literatüre kazandırılması, ilaç etken maddesi araştırmaları için önem arz etmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser

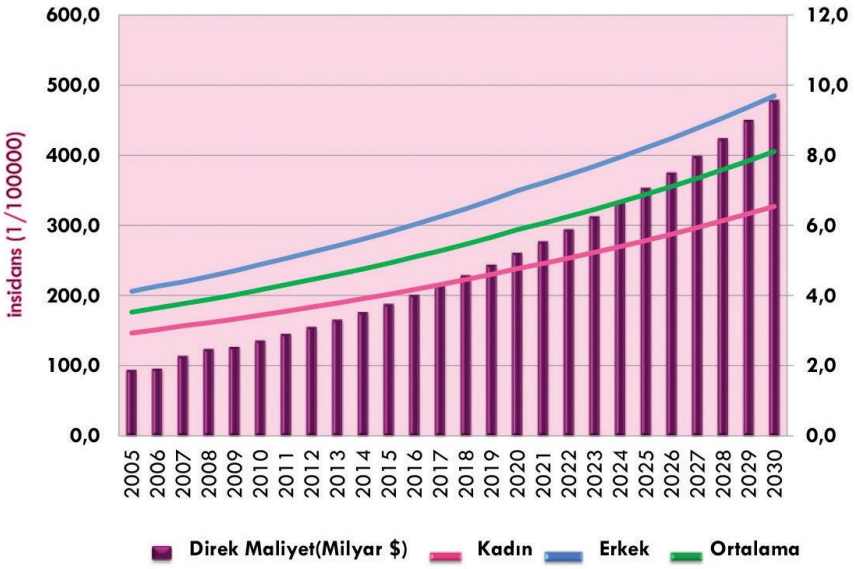
Kanser yüzlerce farklı dokunun moleküler mekanizmalarla ortaya çıkmış proliferatif ve invazif yapıya sahip hastalıkların tümüne denmektedir. Kanser genel bir addır ve içinde değişik klinik seyirleri ve farklı tedavi cevapları olan yüzlerce hastalıktan oluşmaktadır. Kanser, tüm dünyada sebebi bilinen ölüm vakaları sıralamasında kalp ve damar hastalıklarının ardından ikinci sırada yer almakta ve önemli bir toplum sağlığı problemi olarak daha tehlikeli boyutlara ilerlemektedir. Fakat 2030 yılına kadar süratle artış göstereceği ve birinci sıraya yükseleceği öngörülmektedir. Kansere karşı gerekli tedbirlerin alınmadığı, sürekli ve etkili bir kontrol programının uygulanmadığı taktirde 2030'lu yıllarda tedavi maliyetlerinin karşılanamaz miktarlara ulaşacağı öngörülmektedir. Kanserdeki artışın aynı şekilde arttığı varsayıldığında yine 2030 yılında yıllık 22 milyon yeni kanser vakasının meydana gelmesi beklenmektedir. Bu durum da 2008 yılı verilerine göre yeni kanser tanısı olarak %75'lik bir artış anlamına gelmektedir. Dünya genelinde her yıl yaklaşık olarak 4 milyonu genç yaşta (30-69 yaş) olmak üzere 7.6 milyon kişi kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir (Özkan vd. 2014, Tuncer vd. 2009, Gültekin vd. 2016, Jemal vd. 2014, Özkan vd. 2015, Demirer vd. 2014).

Kanser, onlarca farklı dokuda meydana gelebilen, hücrelerdeki DNA molekülünde hücrenin bölünme ve çoğalma fonksiyonlarını kontrol eden belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucunda mutant hücrenin sonsuz ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla, komşu dokuları istila etmesiyle veya uzak organlara sıçramasıyla karakterize edilen bir hastalıktır.

2002 yılında ülkemizde kanser nedeniyle gerçekleşen ölümler, tüm ölümlerin %12'sini oluşturmaktayken bu oranın 2009 yılında % 21'e yükseldiği görülmektedir. Kanser insidansı erkekler için yüzbinde 269,7 kadınlar için yüz binde 173,3'dür. Son yıllarda gözlemlenen insidans oranlarındaki yükselişin temel nedeni kanser kayıtçılığında son

yıllarda toplanan sağlıklı verilerle ilerleme sağlanmış olması ve daha önce kaydedilmeyen vakaların kayda alınmasıdır.

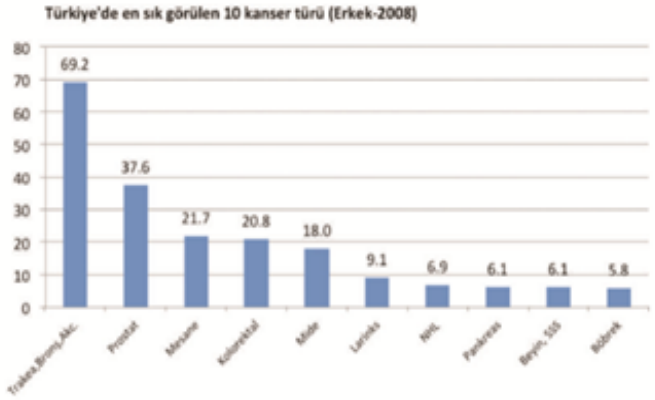
Kanser % 90 oranında çevresel sebeplere, %10 oranında ise genetik faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır. Çevresel faktörler içerisinde ilk sırada tütün olmak üzere alkol, obezite, sağlıksız beslenme ve enfeksiyonlar gibi faktörler yer almaktadır. Özellikle ortaya çıkışının engellenebildiği, erken teşhis edildiğinde ölüme sebebiyet vermesinin önüne geçilebildiği veya uygulanan tedaviler ile yaşam kalitesinin çok daha artırılabildiği kanser türleri göz önüne alındığında korunmanın önemi daha net anlaşılmaktadır.



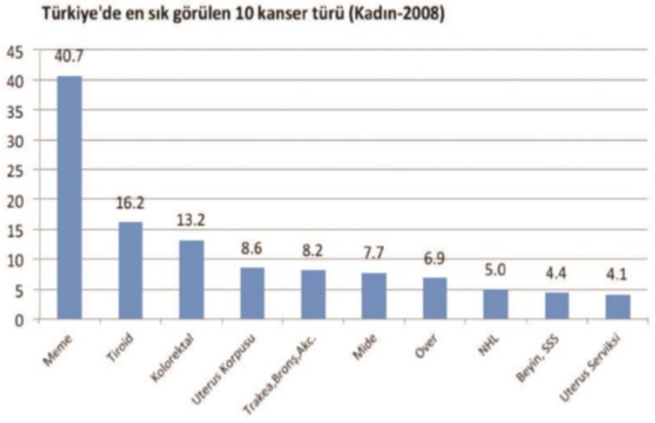
Şekil 2.1. Türkiye'de kanser gelişimine bağlı maliyet artışı (Ozkan vd. 2014)

2.2. Kanser türleri

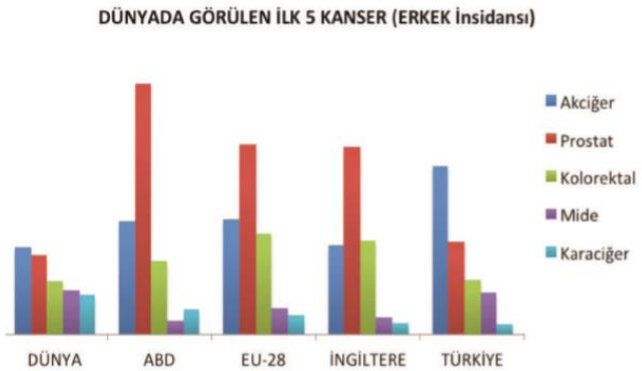
Kanser türleri olarak meme kanseri, kalınbağırsak ve rektum kanseri, akciğer kanseri, rahim boynu kanseri, rahim iç zarı kanseri, idrar yolu kanseri, mesane kanseri, ağız kanseri, gırtlak kanseri, prostat kanseri, cilt kanseri, mide kanseri, pankreas kanseri belirtilebilir.



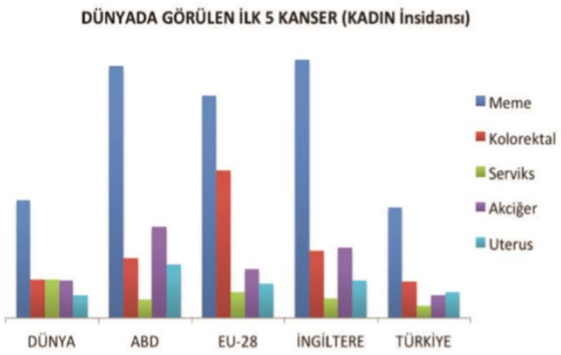
Şekil 2.2. Türkiye'de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü (Özkan vd. 2014)



Şekil 2.3. Türkiye'de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü (Özkan vd. 2014)



Şekil 2.4. Dünyada erkekler üzerinde görülen ilk 5 kanser türü (Özkan vd. 2014)



Şekil 2.5. Dünyada kadınlar üzerinde görülen ilk 5 kanser türü (Özkan vd. 2014)

2.3. Kanser risk faktörleri

2.3.1. Davranışsal risk faktörleri

Sigara içmek, diyet, alkol tüketimi gibi değiştirebileceğiniz risk faktörleridir. Sigarayı bırakarak veya düzenli spor ile kansere yakalanma riski düşürülebilir.

2.3.2. Biyolojik risk faktörleri

Fiziksel ve biyolojik özelliklerin, kanser için risk faktörü olup olmayacağı, kanserin türüne bağlıdır. Bazı kanser türleri için cinsiyet, yaş, cilt ve ırk risk oluşturabilecek biyolojik ve fiziksel özelliklerdir.

Cinsiyet: Bazı kanser türleri cinsiyetle ilişkilidir. Örneğin prostat bezi sadece erkeklerde olduğu için, prostat kanseri erkeklerde görülür. Meme kanseri hem kadın hem de erkeklerde görülebilir. Fakat kadınların meme kanserine yakalanma riski daha fazladır.

Yaş: Birçok kanser türü yaşlılarda ortaya çıkar. 50 yaşın üstündeki kişilerin kansere görülme riski daha yüksektir.

Cilt: Sarışın bireylerde cilt kanserinin görülmesi daha sıktır.

Irk: Bazı ırklarda bazı kanser türleri daha çok görülmektedir. Örneğin Amerikalı zencilerde prostat kanseri daha sık görülmektedir.

2.3.3. Çevresel risk faktörleri

Kişinin yaşadığı ve çalıştığı çevre koşulları kanser gelişimi için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Bu yerlerde mevcut bazı maddeler, kanser riskini artırır. Asbest, hava kirliliği, radon, UV radyasyon, sigara dumanına maruz kalma çevresel risk faktörlerindendir.

2.3.4. Genetik risk faktörleri

Kişinin ailesinden kalıtımsal olarak gelen genlerle ilişkilidir. Aile üyelerinden birinde genç yaşta kanser görülen bireylerde, akrabalar arasında aynı tip kanser vakası bulunanlarda, anne veya baba tarafından üçten fazla kanser olgusu bulunan kişilerde ve aile bireylerinden birinde iki veya daha fazla farklı tip kanser bulunan bireylerde kanser gelişme riski yüksektir.

Aile bireyleri arasından birden fazla kişide aynı tip kanser olsa dahi bu durum kalıtsal olmayabilir. Kanserin kalıtsal olduğundan şüphe ediliyorsa genetik tarama testleri yapılmalıdır. (hsgm.saglik.gov.tr)

2.4. Türkiye'deki bitki çeşitliliği

İklim, yeryüzündeki bitki topluluklarını ve bitki türlerinin esas karakteri ile yayılış alanlarını belirleyen önemli ekolojik faktördür. Sıcaklık, yağış, nem, ışık, rüzgâr gibi iklim elemanlarının ortak etkileri bir yerin bitki örtüsünün çeşitlenmesinde önemli derecede rol oynar. Türkiye'nin coğrafi özellikleri ve konumundan kaynaklı iklim

farklılıkları doğal bitki örtüsünde, orman, çalı veya ağaççık, ot gibi çeşitli bitki formasyonlarının oluşumuna neden olmuştur. Bunlar içinde orman formasyonu, ülkemizin güney ve kuzeyindeki dağlık sahalar ile batı Anadolu dağları üzerinde geniş bir yayılışa sahiptir. İklimin etkisine bağlı olarak kurakçıl, yarı nemli veya nemli karakterdeki bu ormanlar coğrafi yayılışları morfolojik, ekolojik ve floristik özellikleri yönünden birbirinden farklı ağaç türlerinden oluşur. İklim değişmeleri Türkiye'nin endemik ve relik bitkiler bakımından son derecede zengin olmasını sağlamıştır (Günal 2013).

2.5. Biyokaçakçılık

Biyokaçakçılık, doğal ortamında varlığını sürdüren yabani canlıların ve onlara ait gen kaynakların, o canlıların haklarını elinde bulunduran devletin izni olmadan kaçırılması veya elde edilmesi şeklinde tanımlanabilir. Ülkemiz biyoçeşitlilik açısından çok zengindir. Türkiye, pek çok genetik çeşitliliğin anavatanı olarak kabul edilmektedir. % 34'ü endemik tür olan bu bitki çeşitliliği hayvanlar için geniş bir besin aralığı oluştururken ülkemizdeki hayvan çeşitliliğini de olumlu etkilemektedir. Fazla olan bu biyoçeşitlilik ülkemizi değerli kılarken diğer yandan da biyokaçakçılık konusunda riskli bir konuma getirmektedir. Biyokaçakçılık, ülkemizde bulunan bu zenginlik için büyük tehdit oluşturmaktadır (Güler ve Mutlu 2018).

Ülkemizde bu doğal genetik kaynakları korumak için biyokaçakçılık kanunu yer almaktadır. Bu kanun kapsamında ülke sınırları içerisinde herhangi bir canlının ya da genetik kaynağın çıkışına izin verilmemekle birlikte yakalanılması durumunda para cezası uygulanmaktadır. Bu konuda yetkililerin dikkatli olması büyük önem taşımaktadır. Bizden alınan bize ait olan bu canlıların ilerleyen zamanlarda bize karşı kullanılabilecek ya da para ile satılabilecek olması unutulmamalı ve bu doğal mirasa sahip çıkılmalıdır.



Şekil.2.6 Biyokaçakçılık

2.6. Bitkiler ve sekonder metabolitler

Bitkilerde sentezlenen sekonder maddeler (uçucu yağlar, alkaloitler, glikozitler, fenolik bileşikler) biyoaktif özelliklerinden dolayı gıda, kozmetik ve ilaç sektörlerinde geniş kullanım alanlarına sahiptir. Sekonder metabolitler grubunda yer alan fenolik bileşiklerin (flavonoitler, fenolik asitler, antosiyaninler vb.) antioksidan, antiviral, antikanser etkileri nedeniyle değerleri giderek artmaktadır. Yararlıı olduğu düşünülen bir çok sentetik maddenin zararları ortaya konulmuş ve insan sağlığını tehdit ettiği belirtilmiştir (Katz and Baltz 2016).

Sentez yoluyla elde edilemeyen bir çok doğal ürün büyük bir ekonomik potansyel barındırmaktadır. Ülkemizin iklim şartları sebebiyle zengin bir floraya sahip olması, bitkilerin bilimin araştırma konusu haline gelmesinde etkili olmuştur. Ülkemiz, tarımsal üretim çeşitliliği açısından dünyanın önemli ülkelerinden biridir. Ayrıca bu durum ülkemizi bitki florası bakımından oldukça zengin bir konuma yükseltmektedir.

Bitkilerden değerli kimyasalların eldesine ve sentetik olarak üretilmesine yönelik teknolojilerin önemsendiği günümüz dünyasında, ülkemizin sahip olduğu bu bitki çeşitliliği (endemik, tıbbi, aromatik vb.) önemli bir katma değer kaynağı olarak görülmektedir. Bu durum Ar-Ge planlamalarında öncelikli konular arasında değerlendirilmektedir. Bitki kaynaklı değerli kimyasalların izolasyonu, saflaştırılması

ve karakterizasyonu ile bu alanda yapılabilecek Ar-Ge çalışmaları, ülkemizin rekabet gücünün artırılması ve dolayısıyla ekonomik fayda sağlaması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda ilaç, gıda, kozmetik ve diğer sanayi sektörlerinde kullanılmak üzere, bitki kaynaklarımızdan elde edilen kimyasalların saflaştırılması, karakterizasyonu ve zenginleştirilmesi ile ilgili biyoteknolojik veya kimyasal yöntemlerin geliştirilmesi ve elde edilen kimyasalların spesifikasyonlarının belirlenmesi günümüz dünyasının AR-GE faaliyetlerinde ilk sırada yer almaktadır.

Ülkemizin zengin bitkisel çeşitliliğinden hareketle, hem katma değeri yüksek hem de endüstriyel uygulama çalışmalarına temel oluşturacak, ayrıca teknolojik uygulama projelerine girdi sağlayacak teknolojik ürün/bilgi üretmeye yönelik olması, planlanan bu çalışmayı önemli bir noktaya taşımaktadır.

2.7. *Prunus laurocerasus* (Taflan)

Taflan; Spermatopyta bölümü, Angiospermaea alt bölümü, Magnoliatae sınıfı, Rosaceae familyası Rrunoideae alt familyası Laurocerasus Duhamel cinsine ait bir türdür. Bu tür *Prunus laurocerasus* veya *Laurocerasus oficinalis* Roemer gibi isimlerle bilinmektedir (Genç 2009, Islam ve Vardal 2009). Ülkemizde taflan dışında kullanılan en yaygın ismi karayemiştir. Laz yemişi, laz kirazı gibi isimlerle de anılmaktadır.

Taflan her mevsim yeşil olan, 6-8 metreye kadar uzayabilen ve genellikle her türlü toprakta yetişebilen meyvedir. Ülkemizde genelde Karadeniz Bölgesi'nde yetişir. Yuvarlak şekilli ve başlangıçta kırmızı renkli olan bu meyve olgunlaştıkça siyahımsı mor rengini almaktadır. Taflan meyvesi ve çekirdekleri halk arasında tıbbi olarak kullanılmaktadır. Bronşit, egzama, sindirim sistemi hastalıkları, kanser, hemoroit vb. tedavilerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Baytop 1999).



Şekil 2.7 Taflan bitkisinin yaprakları (URL 1)

Taflan meyvesinin kullanılan kısımları çekirdeği, yaprağı ve meyvesidir. Yapraklarında tanen, şeker, kalsiyum oksalat ve önemli değerde prulaurasin isimli siyanogenetik bir glikozit bulunmaktadır. Bu glikozitin miktarı yaprağın gençliği oranında fazladır. Ayrıca emulsin isimli bir ferment bulunur. Bu ferment glikozite tesir ederse onu benzaldehit siyanhidrin ve glikoza parçalar. Bunlardan başka benzoik asit ve siyanidrik asit gibi zehirli maddeler de bulunur. Meyvelerde bu siyanogenetik glikozit ve dolayısıyla HCN bulunmamaktadır. Meyveleri üzerinde yapılan çalışmalarda taflanda mineral maddelerin ve antioksidan maddelerin bol miktarda bulunduğu buna karşın bakır ve çinko gibi ağır ve zararlı metallerin çok düşük miktarlarda bulunduğu saptanmıştır. Buna göre 1 kg taflanda 8.3 mg demir, 2215 mg potasyum, 0.8 mg bakır, 179 mg magnezyum, 153 mg kalsiyum, 55 mg sodyum, 1.9 mg çinko, ve 24.2 mg mangan bulunduğu tespit edilmiştir (İslam ve Deligöz 2012).



Şekil 2.8 Taflan bitkisinin meyvesi (URL 2)

Karayemiş üzerine yaptıkları bir çalışmada, kuru meyve ve taze meyve bazlı, elde edilmiş olan pekmezin antioksidan miktarlarını değerlendirmek için, serbest radikal giderme aktivite testleri yapmışlardır (Alasalvar, Wanasundara *et al.* 2006). Yapılan uygulamada, taze meyve bazlı pekmezin taze meyveye göre daha yüksek aktivite gösterdiği, kuru meyve bazlı pekmezin ise; pekmez üretimi sırasında antioksidan aktiviteye sahip bazı fonksiyonel moleküllerin bozulması sebebiyle, taze meyveye göre daha düşük aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur.

Taflan çekirdeklerinde bulunan amigdalin antikanser aktivitesi olduğu ileri sürülen ve 'Laetrile' adında satılan siyanojenik bir glikozittir (Rauws, Olling *et al.* 1982). Bu madde Amerika'da 23 eyalette kanser hastalığı tedavisinde kemoterapik olarak yasal izinli kullanılmaktadır (Newmark, Brady *et al.* 1981).



Şekil 2.9 Taflan bitkisinin çekirdeği (URL 3)

Meyveleri üzerinde yapılan çalışmalarda taflanda mineral maddelerin ve antioksidan maddelerin bol miktarda bulunduğu buna karşın bakır ve çinko gibi ağır ve zararlı metallerin çok düşük miktarlarda bulunduğu saptanmıştır (İslam ve Deligöz 2012).

Yapılan bir diğer çalışmada taflan ağacı meyveleri suda 2 saat kaynatılmış, heksan, EtOAc ve BuOH ile ayrı ayrı ekstrakte edilmiştir. Ekstrelerin antikanser etkisi HeLa (İnsan Rahim Boynu Kanseri), HT29 (İnsan Kolorektal Adenokarsinoma), C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücreleri) ve Vero (Afrika Yeşil Maymun Böbreği) hücre çizgileri üzerinde incelenmiştir. Bütün ekstreler yüksek derişimde çeşitli kanser hücre hatlarında hafif antikanser etki göstermiştir. Taflan ağacı meyvesinin ekstrelerinin hücre zarını parçalama yeteneği incelenmiştir. Taflan ağacı meyvesinin sadece yüksek derişimlerde yukarıda adı geçen tümör hücre çizgilerinde hücre zarını biraz parçaladığı görülmüştür. Mevcut kemoterapötik araçlara potansiyel destek tedavisi yaparak hücre zehirliliğini düşürecek şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca hekzan ekstresinde GC-MS analizi ile yağ asitleri bulunmuştur ve ana ürünler linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit içerdiği belirtilmiştir (Aydın ve ark, 2016).

Taflanın, iyi bir besin kaynağı olmasının yanı sıra antioksidan maddelerce zengin olduğu bildirilmiştir. Toplam fenolik içeriğinin radikal yakalama kapasitesi bazı referans bileşiklerden (trolox, BHT, askorbik asit) daha fazla bulunmuştur (Kolaylı vd. 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose, sığır serum albümini, penisilin-streptomycin, tripsin-EDTA Sigma Chemical Comp.'den; sodyum bikarbonat, hidroklorik asit, etanol ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; hücre kültür çalışmalarında kullanılan steril malzemeler Corning, Incorporated'den karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır. *Prunus laurocerasus* bitki örnekleri Ordu ilinden tedarik edilmiştir.

3.1.2 Yararlanılan alet ve cihazlar

Kullanılan laboratuvar malzemeleri ve cihazlar aşağıda liste halinde verilmiştir.

Hücre Analiz Sistemi (xCELLigence RTCA SP, ACEABIO)
Hücre Sayım Cihazı (Cedex HiRes Innovatis, Roche)
Etüv
Steril kabin
Deionize su cihazı
Rotary Evaparatör
Buzdolabı -20 °C
Derin dondurucu -80 °C
Su banyosu
CO_2 İnkibatörü
pH-metre
Hassas terazi
Otomatik pipetler

Vorteks

Magnetik karıştırıcı

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.1. DMEM(-) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) çözeltisi

1000 mL'lik bir behere deiyonize su (700-800 mL) konularak manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılıp, üzerine DMEM (1L için bir şişe) ilavesi yapıldı. Oluşan karışım üzerine $NaHCO_3$ (2,2 g) ilave edildi ve pH metre ile HCl çözeltisi kullanılarak pH 7,2'ye ayarlandı. Toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti steril kabine alınıp 0,22 mikronluk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek +4 ºC'de muhafaza edildi.

3.1.3.2. DMEM (+) (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) çözeltisi

500 mL'lik steril şişede bulunan DMEM(-) çözeltisinden 60 mL alınıp başka bir kaba aktarıldı. 440 mL DMEM(-) çözeltisine 50 mL sığır serum albümini (FBS) ve 10 mL penisilin-streptomycin eklenip 0,22 µm steril filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi. Tüm işlemler steril kabinde, steril malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi. Steril şişelerin kapakları kapatıldı, şişelerin üzerine kullanılmaya başlanıldığı tarihler not edildi ve +4 ºC'de muhafaza edildi.

3.1.3.3. Tripsin-EDTA Çözeltisi

Hazır olarak alınan ve oda sıcaklığında veya 37 ºC'de çözünmesi sağlanan Tripsin-EDTA çözeltisi steril kabinde 10 mL hacimli steril tüplere alınarak -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.1.3.4. Penicilin-Streptomycin Çözeltisi

Hazır olarak alınan ve oda sıcaklığında veya 37 ºC'de çözünmesi sağlanan penicillin-streptomycin çözeltisi steril kabinde 10 mL hacimli steril tüplere alınarak -20 ºC'de saklandı**.**

3.2. Metot

3.2.1. Hücre kültürü

Çalışmalar steril kabinde yapıldı. Steril kültür kaplarında bulunan hücrelerin kullanmış olduğu besi yeri (DMEM) atık kabına alınarak uzaklaştırıldı. Hücrelerin bulunduğu kültür şişesine 10 mL trypsin-EDTA eklendi ve CO_2 inkübatöründe (%5 CO2), 37°C'de 1-2 dakika inkübe edildi. Böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı. İnkübatörden çıkarılan kap içerisine 10 mL besi yeri (DMEM) eklenerek ortam nötralize edildi. Hücre süspansiyonu iki ayrı 15 mL'lik falkon tüpüne eşit miktarlarda aktarıldı. Bu tüpler 600 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücrelerin tüpün dibine çökmesi sağlandı.

Santrifüj sonunda falkon tüplerindeki besi yeri atık kabına aktarıldıktan sonra, hücre çökeltisi üzerine 3'er mL besi yeri eklendi. Tüpün dibinde toplanmış olan hücreler steril bir pipet yardımı ile süspansiyon haline getirildi. Çalışmanın her aşamasında yeni steril pipet kullanıldı. İlk tüpteki hücreler ile deney gerçekleştirildi. Diğer tüpteki hücreler ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere kültür şişelerine alınıp inkübatöre yerleştirildi ve büyümeleri sağlandı. Bunun için steril 250 mL'lik kaplara 20 mL DMEM besi yerinden konuldu. Bu kültür kaplarına (flask) süspansiyon halindeki hücrelerden 1 mL konuldu ve kaplar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi. Bu işlem 3 günde bir tekrarlandı.

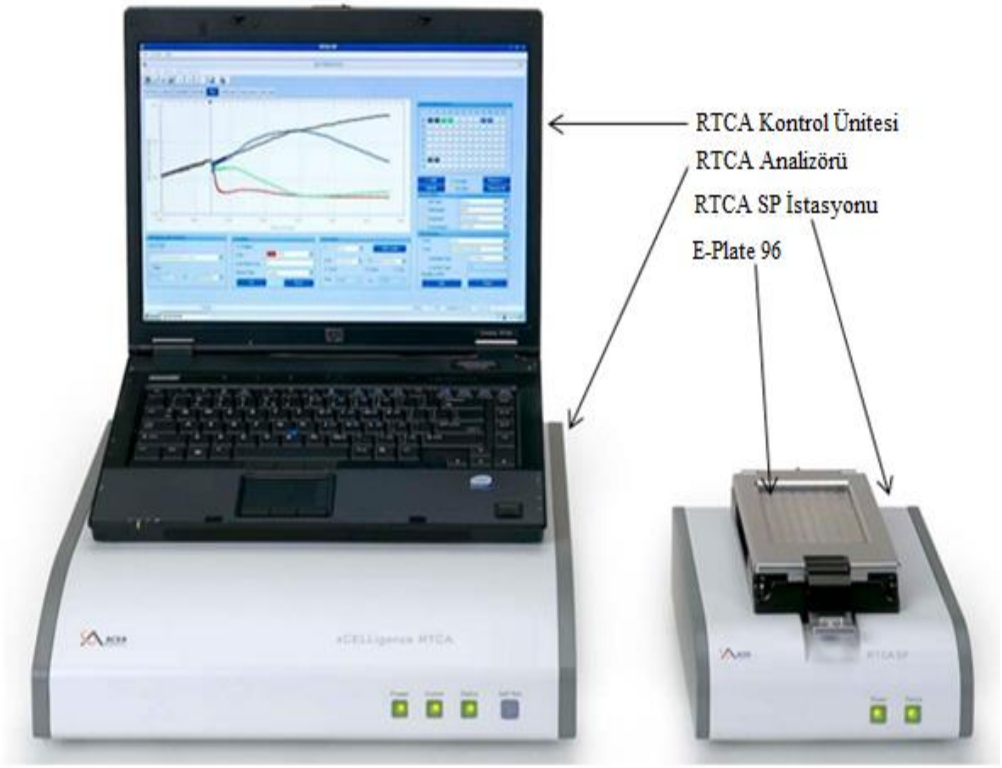
3.2.2. Örneklerin hazırlanması

Çalışılan örneklerden ortalama 10 mg tartıldı. Tartılan örneklerin steril DMSO'daki çözeltileri (20 mg/mL olacak şekilde) hazırlandı ve numaralandırılmış steril ependorf tüplerinde 1:20 oranında DMEM ile seyreltilerek kullanıldı.

3.2.3. Antikanser aktivite testleri

Antikanser aktivite çalışmaları daha önce literatürde belirlenen yöntemle yapılmıştır (Abay vd., 2015; Koldaş vd., 2015). Günümüzde biyolojik testlerin büyük bir bölümü optik sayım yapılarak gerçekleştirilir. Gerçek zamanlı hücre analizörü (xCELLigence RTCA Single Plate, AceaBio, USA) cihazı ise test sürecinin elektronik olarak saptanması temeli üzerine kurulmuş bir cihazdır. Başka bir deyişle RTCA SP cihazı, molekül ve hücre biyolojisinin mikroelektronikle takip edilmesi esasına dayanır. Antikanser aktivite taramaları, kanserli hücrelerin morfolojik, anatomik ve biyolojik olarak değişimlerinin an be an incelenmesine imkân veren gerçek zamanlı hücre ölçüm cihazı ile takip edilmektedir.

RTCA SP (Single Plate) cihazı RTCA kontrol ünitesi, RTCA analizörü, RTCA SP istasyonu ve E-Plate 96 bileşenlerinden oluşmaktadır.

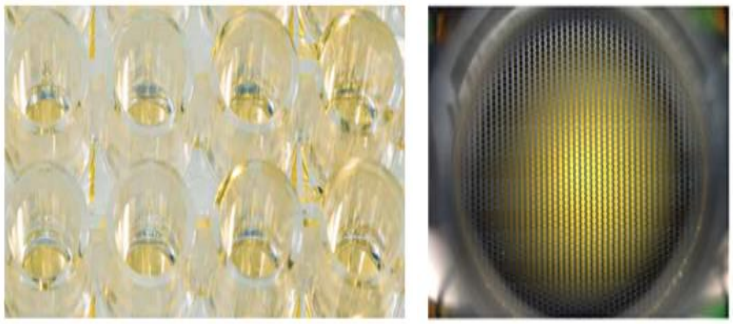


Şekil 3.1. xCELLigence RTCA SP cihazı (URL 4)

RTCA SP cihazının en önemli parçalarından birisi 96 kuyucuk bulunan E-Plate-96 diye adlandırılan plakadır. E-Plate 96'nın kuyucuklarının zemininde, hücrelerin tutunacağı mikroelektrotlar bulunmaktadır.

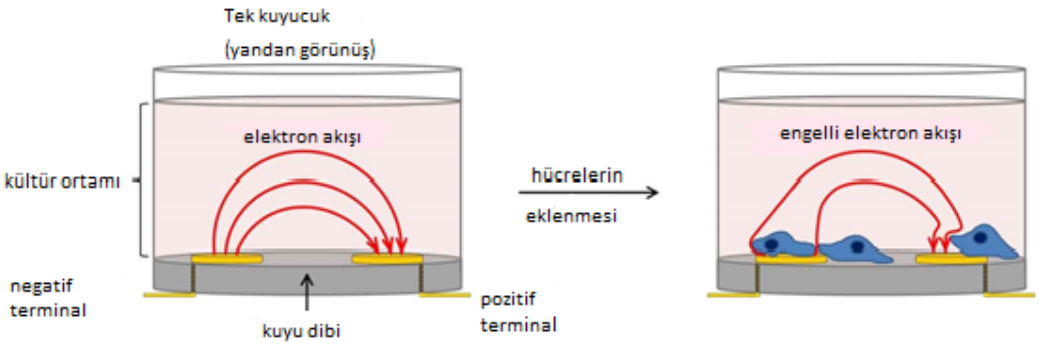


Şekil 3.2. E-Plate 96 (URL 5)



Şekil 3.3. E-Plate 96 kuyucuklarının yakından görünümü ve tek bir kuyucuk (URL 4)

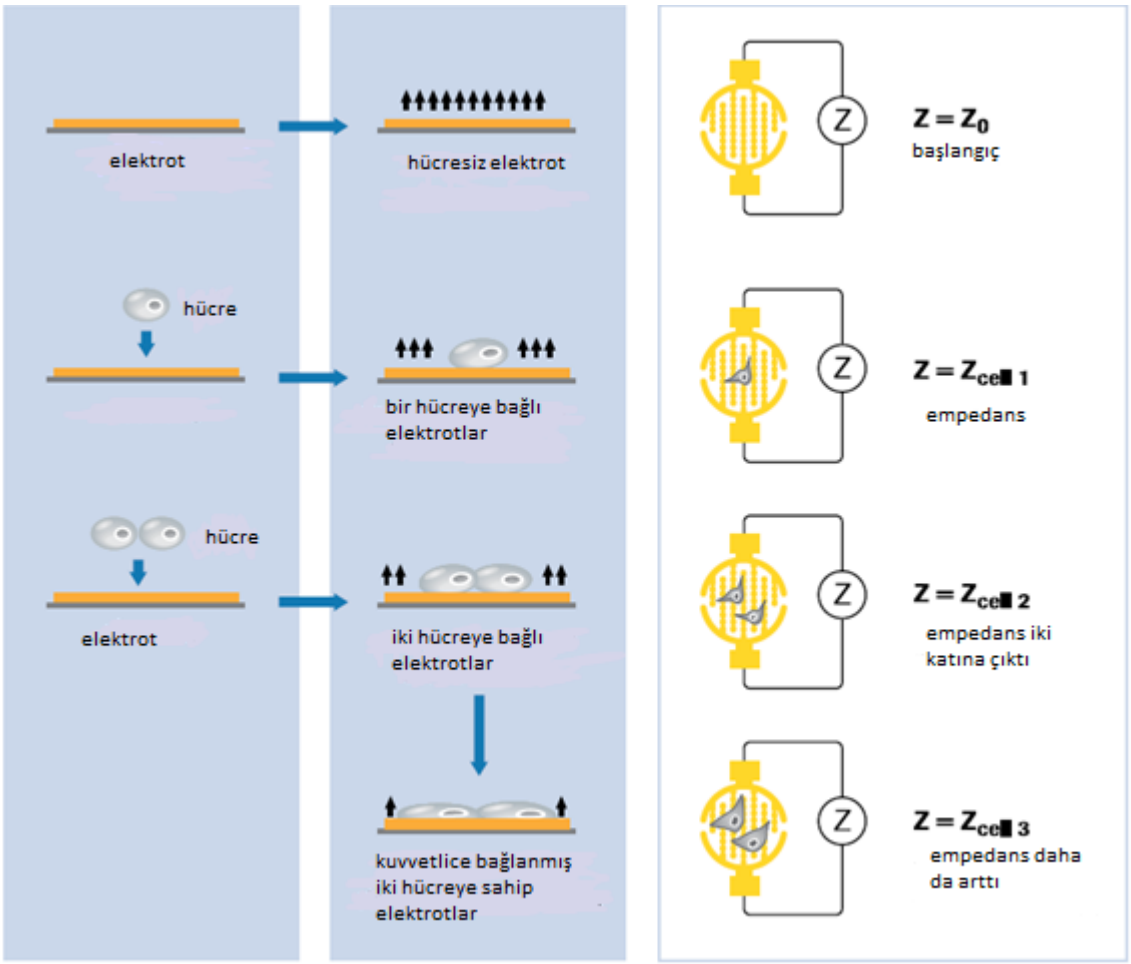
Söz konusu elektrotlarda meydana gelen direnç değişikliklerinin ölçülmesi, zemine tutunmuş olan hücrelerdeki değişikliklerin tespit edilmesine ve izlenmesine imkan tanır. Ortamda hücre olmadığında, elektrik akımı besi yeri aracılığıyla sağlanır ve elektrotlar arasında devreyi tamamlar. Hücreler elektrotlara yapışıp çoğaldıkça akış engellenir. Hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve moleküllerin birbirini çekme kuvveti (adezyon) elektrot direncini etkiler. Eğer elektrotta hücre varsa, elektrot yüzeyine bağlı olan hücreler izolatör olarak davranıp ortamın direncinin artışına neden olur. Bu yüzden elektrot üzerinde ne kadar hücre varsa elektrottaki direnç değişimi o kadar fazla olur.



Şekil 3.4. E-Plate 96 kuyucuğu ve empedans değişimine bağlı ölçüm sisteminin şematik gösterimi (URL 4)

Hücrenin ya da molekülün sahip olduğu özelliklerin mevcut durumu veya meydana gelen değişiklikler, elektron ve iyonların sensör yüzeylerindeki geçişlerini etkilemektedir. Sensör yüzeylerinin elektronik özelliklerinin ölçülmesi yoluyla bu sensörlere tutunmuş bulunan hücrelerin biyolojik durumu hakkında önemli bilgiler elde

edilmektedir. Hücrelerde meydana gelen biyolojik değişmeler, RTCA SP cihazının hücrelerle temas halinde olan sensörlerin üzerinde direnç değişimine sebep olur. Bu direnç değişimi otomatik olarak ölçülür ve okuyucunun okuyup analiz edebilmesi için dijital sinyallere dönüştürülür.



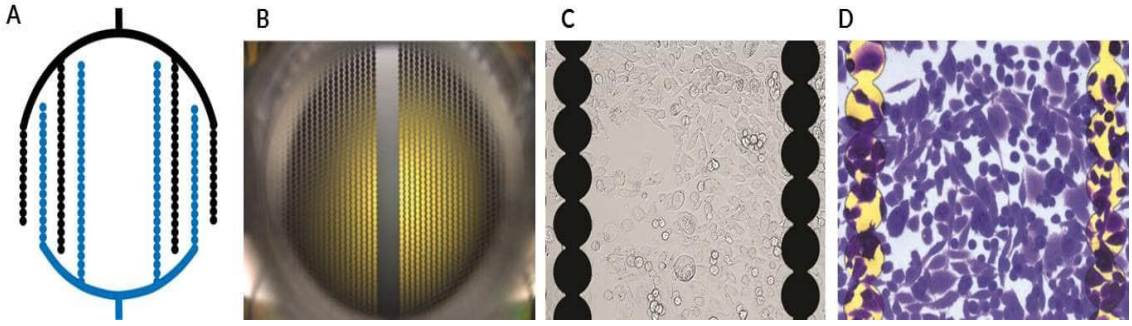
Şekil 3.5. E-Plate 96 kuyucuklarının zemininde yer alan mikroelektrotların ve hücrelerin neden olduğu empedans değişimi ölçümünün şematik gösterimi (URL 6)

Hücreler, daha önceden her bir kuyucuğuna belirli miktarda besi yeri konulmuş olan E-Plate 96'nın kuyucuklarına eklenir. Kısa bir süre içerisinde hücreler kuyucuğun alt kısmında yer alan sensör-elektrotun yüzeyine temas eder ve bu yüzeye tutunur. Kuyucuk zeminindeki sensör yüzeylerinin elektronik özellikleri, CO_2 inkübatörünün içine yerleştirilen RTCA SP istasyonu ve RTCA analizörü vasıtasıyla takip edilir.

Hücrenin biyolojik durumu hakkında eş zamanlı kantitatif bilgiler, kontrol ünitesindeki RTCA yazılımı aracılığı ile belirlenmektedir.



Şekil 3.6. Hücre örneklerinin E-Plate 96'ya eklenmesi ve fizyolojik şartların sağlandığı CO_2 inkübatöründe bulunan RTCA istasyonuna yerleştirilmesi (URL 7)



Şekil 3.7. A) E-Plate 96 kuyucuklarının zemininde bulunan elektrotların şematik gösterimi B) E-Plate 96'nın tek bir kuyucuğunun fotoğrafı C) Elektrotların ve hücrelerin siyah beyaz fotoğrafı (monochrome) D) Altın elektrotlar ve E-Plate zeminine tutunmuş hücreler (URL 4)

Hücre durumunun göreceli durumunu belirtmesi açısından hücre indeksi (Cell Index, CI) parametresi türetilmiştir. Ortamda hücre olmadığı zaman sensörün elektronik takibi yapıldığında herhangi bir değişim gözlenmez. Elektrotlar üzerinde daha fazla hücre bulunduğunda direnç daha büyük olur. Hücreler olmadığında veya elektrotlar üzerine

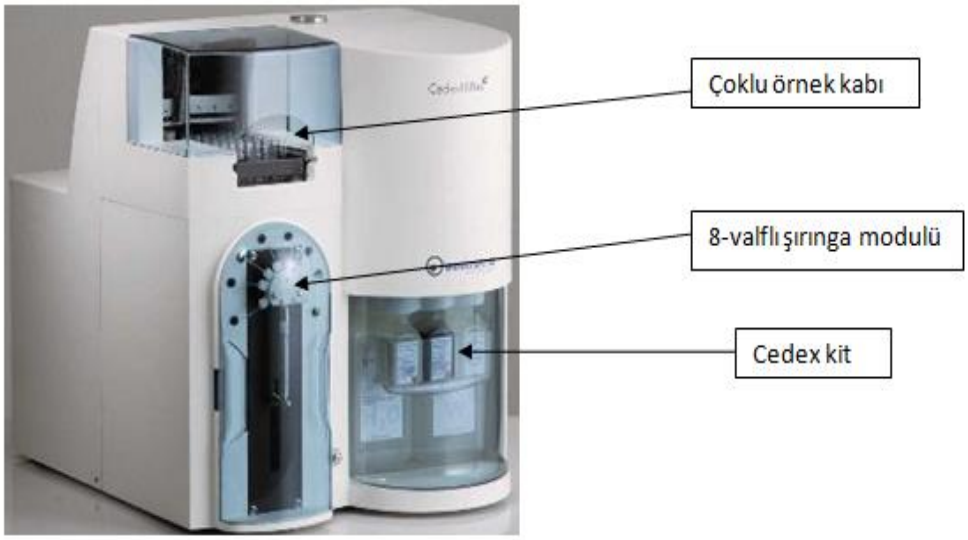
iyi bağlanmadığı zaman CI değeri yaklaşık olarak sıfırdır. Aynı fizyolojik koşullarda elektrot üzerinde fazla hücre bağlı ise CI değeri daha yüksektir. Bu durumda, bir kuyucuk içinde bulunan hücre sayısı kantitatif olarak hesaplanabilir.

CI (Cell Index) değerinin bir birimi yoktur. CI değeri artış gösterdikçe hücrelerin zemine tutundukları, gelişim gösterdikleri, morfolojilerinin herhangi bir değişim göstermediği, bölünerek çoğaldıkları anlaşılmaktadır. Başka bir deyişle CI değerindeki artış, hücrelerin deforme olmadığını, hücrelerin strese girmediğini, hücreler açısından şartların uygun olduğunu ve herhangi bir sorun olmadığını belirtir.

E-plate 96'nın her bir kuyucuğuna 50 µL kültür ortamı konularak 15 dakika steril kabinde, 15 dakika inkübatörde bekletildi. Ardından plaka, RTCA cihazına yerleştirildi ve arka plan (background) okuması yapıldı. Bu okuma 1 dakika sürmektedir ve Eplate 96'nın kullanılabilirliği değerlendirilmiş olur. Bundan sonra kuyucuklarda olması istenen hücre sayısı (PC3 hücresi için 25.000 hücre/kuyucuk, C6 hücresi için 100.000 hücre/kuyucuk) hesaplanarak oluşturulmuş hücre süspansiyonundan E-plate 96 kuyucuklarından üç tanesi hariç diğer kuyucuklara 100'er µL eklendi. Hücre eklenmeyen kuyucuklara 100'er µL besi yeri (DMEM) eklendi. Plaka, hücrelerin dibe çökmesi ve ortama uyum sağlaması için yarım saat steril kabinde bekletildikten sonra RTCA cihazına tekrar yerleştirildi ve 80 dakika süren ikinci aşama başlatıldı. Bu süre zarfında hücrelerin kuyucuk tabanına yapışarak büyüme sürecine girmeleri sağlandı. Bu süre sonunda e-plate tekrar steril kabine alındı ve kuyucuklara, son hacim 200 µL olacak şekilde farklı derişimlerde bitki ekstresi içeren kültür ortamı çözeltisi eklendi. Her bir numune için yüksek (250 µg/mL), orta (100 µg/mL) ve düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere üç farklı konsantrasyon çalışıldı. Her bir doz üç tekrar yapılarak çalışıldı. Yani üç kuyucuk yüksek doz, üç kuyucuk orta doz ve üç kuyucuk düşük doz için olmak üzere bir numuneye 9 kuyucuk kullanıldı. Numuneler eklendikten sonra plaka son kez RTCA cihazına yerleştirildi. 48 saat boyunca hücrelerin yaşam/ölüm durumları gerçek zamanlı olarak kaydedildi.

3.2.4. Hücrelerin sayılması

Cedex HiRes analizörü hücre konsantrasyonunu ve süspansiyonunun elverişliliğini otomatik olarak ölçer. Hücrelerin sayılması işlemi, hücre süspansiyonunun trypan blue ile boyanması ve analiz edilmesi esasına dayanır. Elde edilen veriler, E-Plate 96 plakasına ekim işleminde kullanılacak hücre miktarının belirlenmesinde kullanılır. Trypan blue metodu ile canlı olmayan hücreler boyanır ve ölü hücreler analizörde koyu şekilde boyalı görülür.



Şekil 3. 8. Hücre sayım cihazı (URL 8)

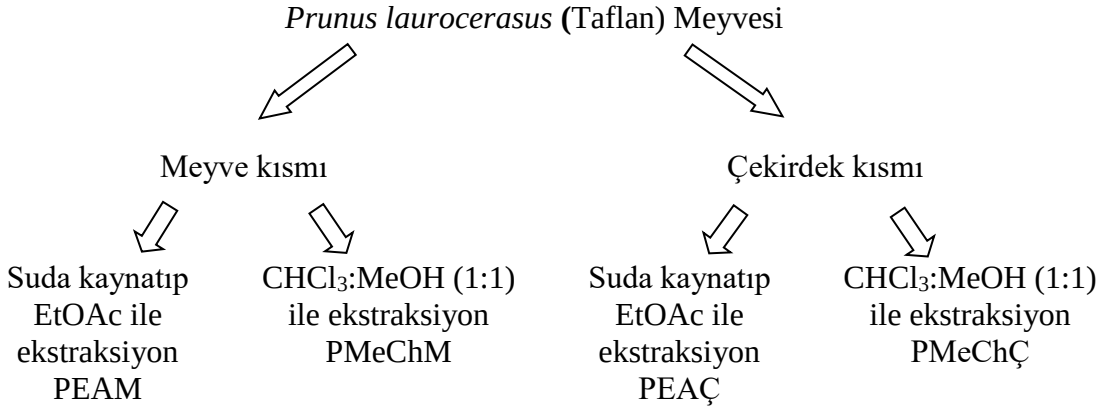
Besi yeri ile süspansiyon haline getirilmiş karışımdan 300 µL alınarak hücre sayım cihazının (Cedex HiRes Innovatis Analyzer, Roche) örnek kabına konuldu. Trypan mavisi ile hücre süspansiyonunu cihazın kendisi karıştırmaktadır. Trypan mavisi solüsyonu ile ölü hücreler etiketlendi. Böylece cihaz ölü hücreleri tanıyabildi. Kap içerisindeki canlı hücrelerin miktarı hücre sayım cihazı ile otomatik olarak gerçekleştirildi.

3.2.5. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Hücre pelletinden %10 DMSO-DMEM karışımı ile hazırlanan hücre süspansiyonu 1 mL (yaklaşık $1x10^6$ hücre/mL) steril 2 mL'lik cryoviallere alındı ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.6. Numunelerin kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi

Çalışmada ilk olarak Ordu ilinden toplanmış olan *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyveleri kuru ve ışık almayan bir ortamda kurutulmuştur. Sonra çekirdekleri meyve kısmından ayrılmıştır. Meyve ve çekirdek olmak üzere iki farklı kısma ayrılmıştır. Hazırlanan bitki örnekleri ikişer gruplara ayrılmış ve hem meyve hem de çekirdek kısmı iki ayrı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.9. *Prunus laurocerasus* bitkisinin iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre eldesinin şematik gösterimi

Birinci ekstraksiyon yöntemi için bitkinin meyve ve çekirdek kısımları ayrı ayrı, destile suda 3 saat 120 °C'de kaynatılmıştır. Kaynatılan kısım temiz beyaz bir bez ile süzülerek posadan ayrılarak sulu kısım etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Sulu ekstre oda sıcaklığına kadar soğuması için bekletildi. Soğuyan sulu kısım ayırma hunisine konuldu, üzerine etil asetat (EtOAc) eklendi ve ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyon sonucunda alt faz su fazı, üst faz etil asetat fazı olarak

ayrıldı. Bu işleme sulu kısımdan etil asetat fazına herhangi bir geçiş olmayana kadar devam edildi. Elde edilen fazların ayrı kaplara alınmasının ardından EtOAc fazının çözücüsü buharlaştırıldı (Demirtaş vd. 2013).

İkinci ekstraksiyon yöntemi olarak, bitki hücre zarının parçalanıp tüm sekonder ve primer maddelerin organik çözücüye geçmesini sağlayacak kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonucu süzülen bitki posası tekrar aynı çözücü sisteminde üç defa maserasyon yöntemi ile ekstraksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen ekstreler birleştirilerek döner buharlaştırıcıda düşük sıcaklıklarda (20-35˚C) çözücülerden ayrıştırılmıştır.



Şekil 3.10. *Prunus laurocerasus* bitkisinin iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstre eldesi

İki ekstraksiyon metodu ile elde edilen ekstrelerden yaklaşık 10 mg tartıldı ve antikanser aktivitelerinin belirlenmesi için +4 °C'de analiz tarihine kadar muhafaza edildi.

4. BULGULAR

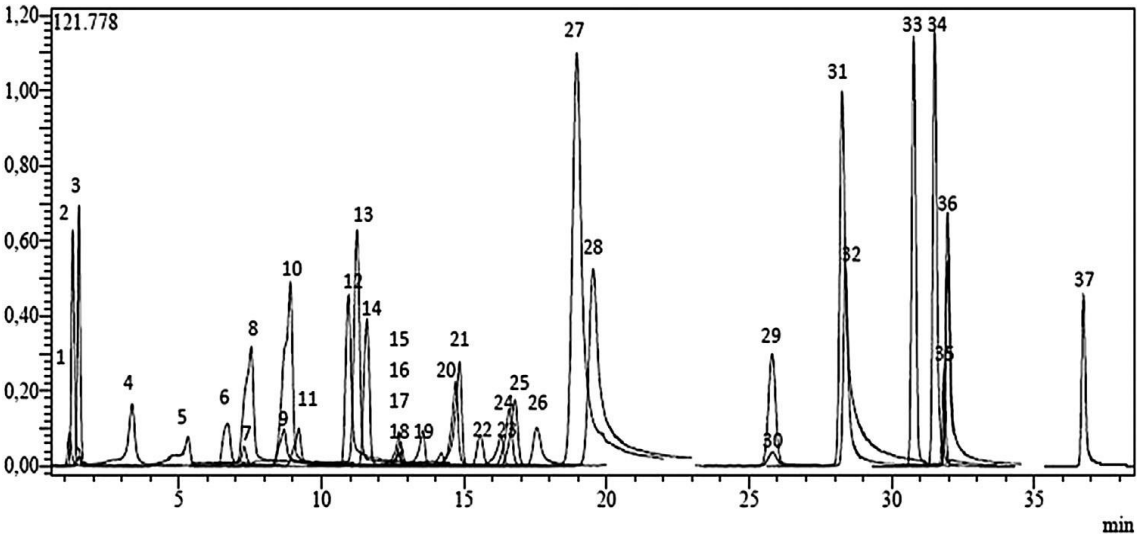
Yapılan bu çalışmada, *Prunus laurocerasus* bitkisi Ordu ilinden toplanmıştır. Uygun koşullarda kurutulmuş ve uygun organik çözücü sistemlerinde meyve ve çekirdek kısımlarının ekstreleri elde edilmiştir. LC-MS/MS cihazına verilen numunelerde tespit edilen bileşenlerin kromatogramları oluşturulmuştur. Bu kromatogramlarda oluşan piklerin cihaza verilen standart kimyasal bileşenler (kinik asit, malik asit, fumarik asit, gallik asit, protokateşik asit, pirokatekol, klorojenik asit, 4-OH-benzoik asit, vanillik asit, kafeik asit, syringic asit, vanilin, salisilik asit, p-kumarik asit, rutin, ferulik asit, sinapinik asit, hesperidin, isokuersitrin, rosmarinik asit, nikotiflorin, o-kumarik asit, rhoifolin, kuersitrin, apigetrin, kumarin, mirisetin, fisetin, sinamik asit, liquiritigenin, kuersetin, luteolin, naringenin, apigenin, hesperetin, kaemferol, krisin) ile karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bitki ekstrelerinin HeLa (insan rahim kanseri hücresi), PC3 (insan prostat kanseri hücresi) ve C6 (sıçan beyin tümörü hücresi) kanser hücre hatlarına karşı antikanser etkileri araştırılmıştır.

Çizelge 4.1. *Prunus laurocerasus* bitkisinin kısımlarına verilen kodlar ve elde edilen ekstre miktarları

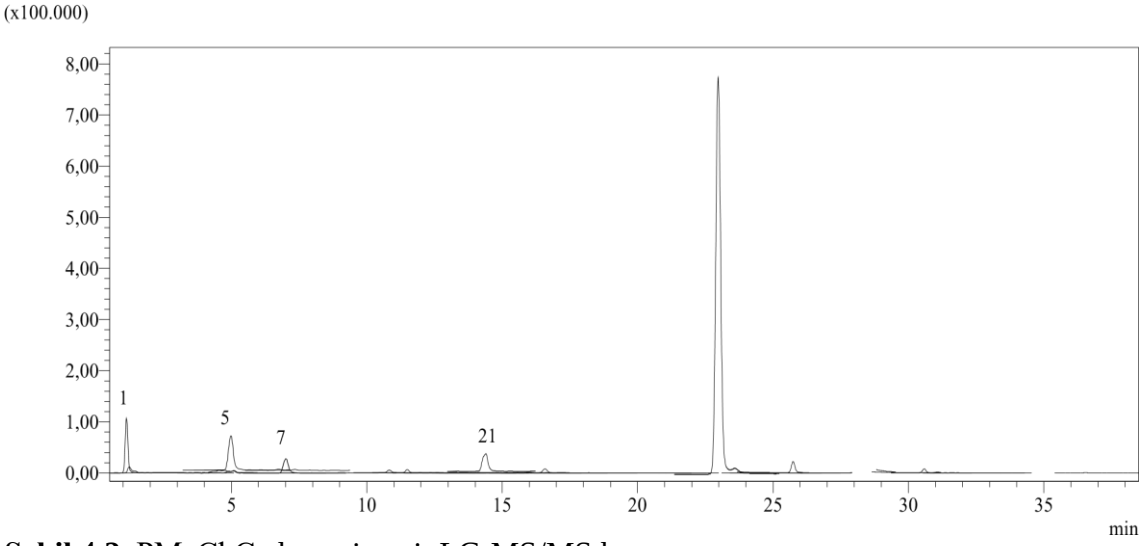
Bitki Kısmı	Numune Kodu	Bitki Miktarı	Ekstrakt Miktarı	% Verim
P. laurocerasus meyve kısmının suda kaynatılıp EtOAc ile ekstraksiyonu	PEAM	266 gr	39 gr	14,6
P. laurocerasus meyve kısmının MeOH-$CHCl_3$ ile ekstraksiyonu	PMeChM	390 gr	55 gr	14,1
P. laurocerasus çekirdek kısmının suda kaynatılıp EtOAc ile ekstraksiyonu	PEAÇ	65 gr	2,6 gr	4
P. laurocerasus çekirdek kısmının MeOH-$CHCl_3$ ile ekstraksiyonu	PMeChÇ	65 gr	2,2 gr	3,38

Çizelge 4.2. *Prunus laurocerasus* bitkisinden elde edilen ekstrelerin LC-MS/MS analiz sonuçları

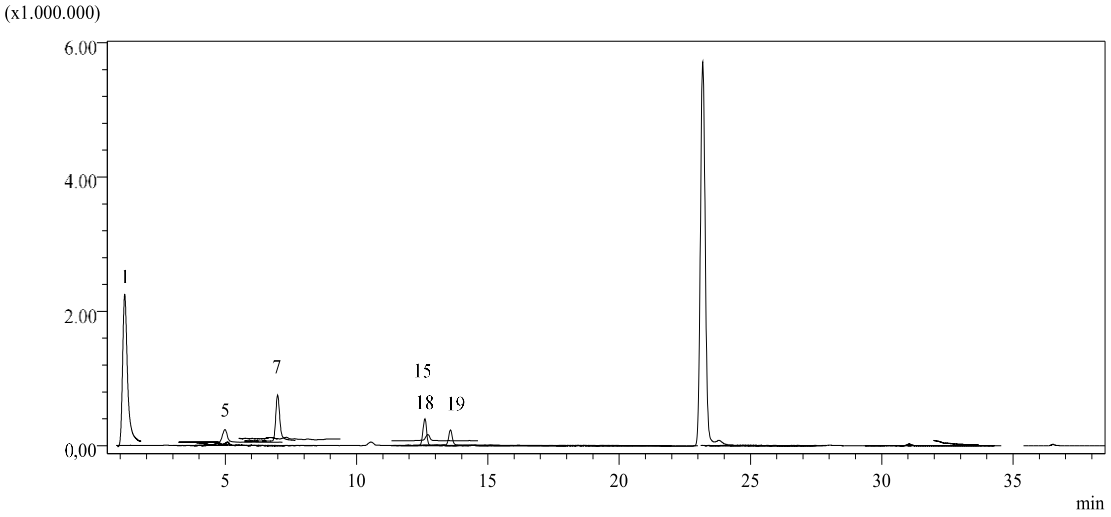
Bileşen no	Bileşenler	RT	Miktar (mg/g)			
		(min)	PMeChÇ	PMeChM	PEAÇ	PEAM
1	Kinik asit	1.13	0,820	3,6961	1,956	6,549
3	Fumarik asit	1.48	-	-	-	0,3100
4	Gallik asit	3.00	-	-	-	0,0980
5	Protokateşik asit	4.93	0,0260	0,1220	1,8180	8,2490
7	Klorojenik asit	7.13	0,078	2,099	0,693	22,331
9	Vanilik asit	8.57	-	-	-	3,462
12	Vanillin	10.87	-	-	0,060	0,593
13	Salisilik asit	11.16	-	-	0,036	0,137
14	p- Kumarik asit	11.53	-	-	-	0,230
15	Rutin	12.61	-	0,025	-	0,060
16	Ferulik asit	12.62	-	-	-	0,205
18	Hesperidin	12.67	-	0,016	-	0,046
19	İsokuersitrin	13.42	-	0,026	0,016	0,259
21	Nikotiflorin	14.68	0,053	-	0,258	0,026
31	Kuersetin	28.17	-	-	-	0,063
33	Naringenin	30.68	-	-	-	0,012



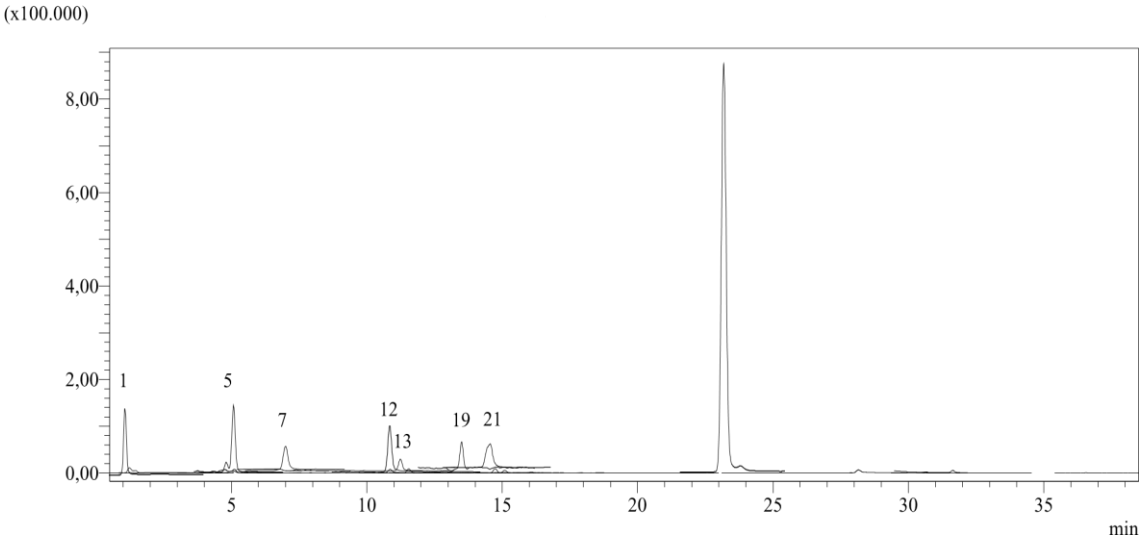
Şekil 4.1. Standartlara ait LC-MS/MS kromatogramı



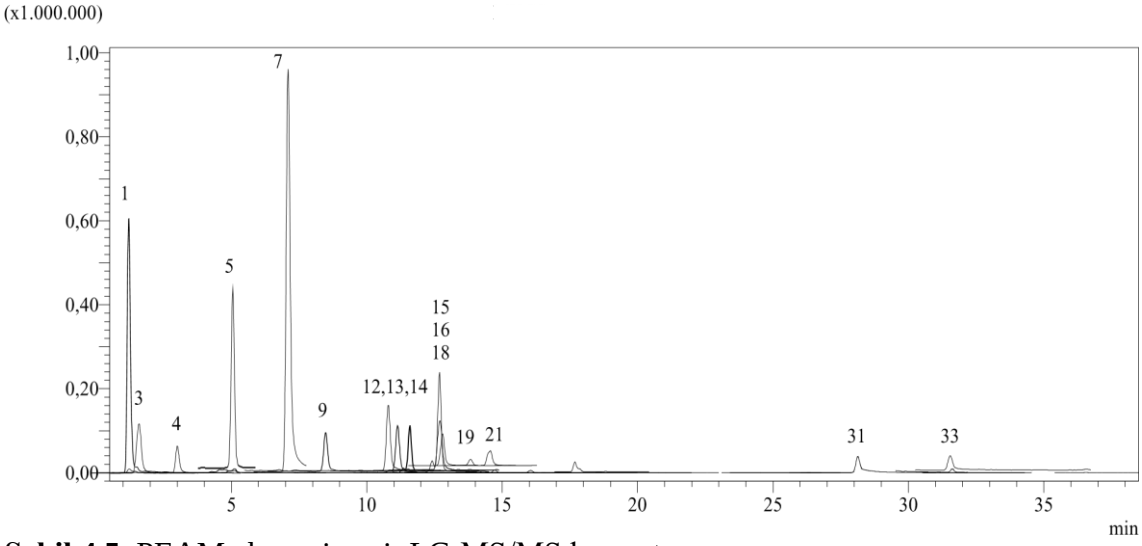
Şekil 4.2. PMeChÇ ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.3. PMeChM ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 4.4. PEAÇ ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı



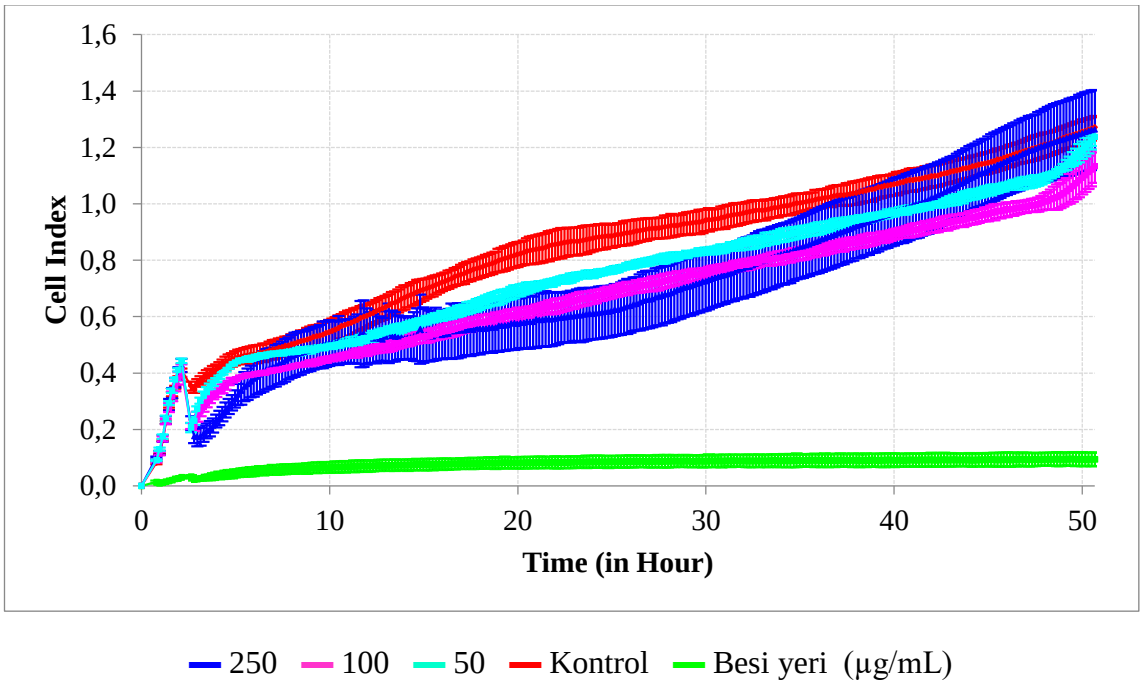
Şekil 4.5. PEAM ekstresine ait LC-MS/MS kromatogramı

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve ve çekirdek kısımlarından iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstrelerin, HeLa, PC3 ve C6 hücrelerine karşı antikanser aktivitelerini gösteren CI-Zaman grafikleri olarak Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17'de verilmiştir.

İlk 80 dakika boyunca, hücreler hızla elektrot yüzeyine tutunmaya başlamışlar ve CI değerinin yükselmesine sebep olmuşlardır. Numune eklemek için E-Plate 96, CO_2 inkübatörü dışına çıkarılmıştır. Bu durum hücreleri kısmen etkilemiş ve yüzeyden kopmalar olmuştur. Bu durum CI değerinin düşmesi olarak grafikte görülmektedir. Örneklerin eklenmesinden sonra tekrar uygun şartlara kavuşan hücreler yine yüzeye tutunmaya başlamıştır. Kırmızı renkle gösterilen kontrol grubunun (hiç numune eklenmeyen grup) CI değeri tekrar artış göstermeye başlamıştır. Bu artış deney boyunca devam etmiştir. Numune eklenen diğer kuyucuklardaki hücreler ise numune içerisinde yer alan moleküllerin etkilerine maruz kalarak farklı CI değerleri oluşturmuşlardır.

Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChÇ) HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak

çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.6'da verilmiştir.

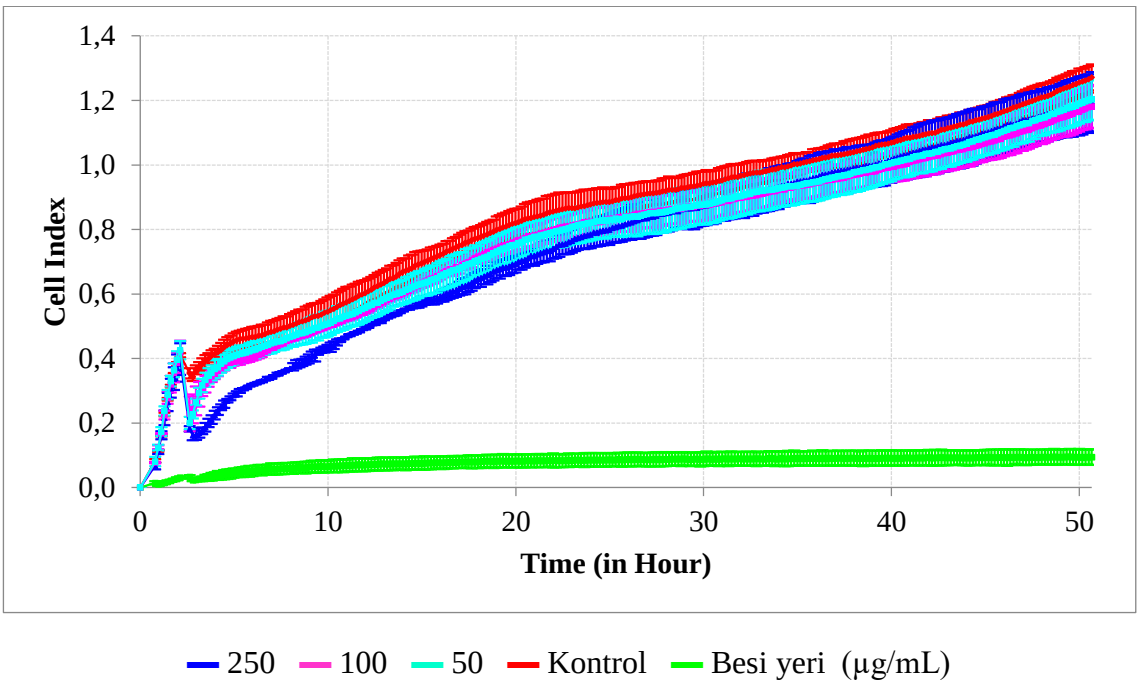


Şekil 4.6. PMeChÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.6. incelendiğinde, kontrol grubunun (kırmızı) CI değerlerinin deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. PMeChÇ ekstresinin HeLa hücreleri üzerine eklendiği andan deneyin sonuna kadar, düşük ve orta dozun uygulandığı kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (turkuaz ve pembe), birbirlerine çok yakın değerler olarak oluşmuş ve kontrol grubunun CI değerlerine (kırmızı) göre daha düşük değerlerde kalmıştır. Ekstrenin eklendiği andan itibaren diğer konsantrasyonlara göre daha düşük CI değerlerinin oluşmasına neden olan yüksek dozun (lacivert) etkisi 6. saat sonunda diğer konsantrasyonların CI değerleri ile aynı olmuştur. Yüksek dozun etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerlerinin standart sapmalarını gösteren dikey lacivert çizgiler deneyin başında kısa iken deneyin sonuna doğru uzun

bir forma dönüşmüştür. Bu da söz konusu kuyucuklardan gelen CI değerlerinin standart sapmasının arttığını göstermektedir. 20 ile 30. saatler arası doza bağlı antikanser etki çok az bir şekilde ortaya çıkmıştır. Her üç dozun da çok zayıf da olsa var olan antikanser etkisi deney sonuna kadar devam etmemiş, 40. saatten sonra kontrol grubunun CI değerleri (kırmızı) ile aynı olmuştur. PMeChÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisinin olmadığı açıktır.

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChM) HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.7'de verilmiştir.

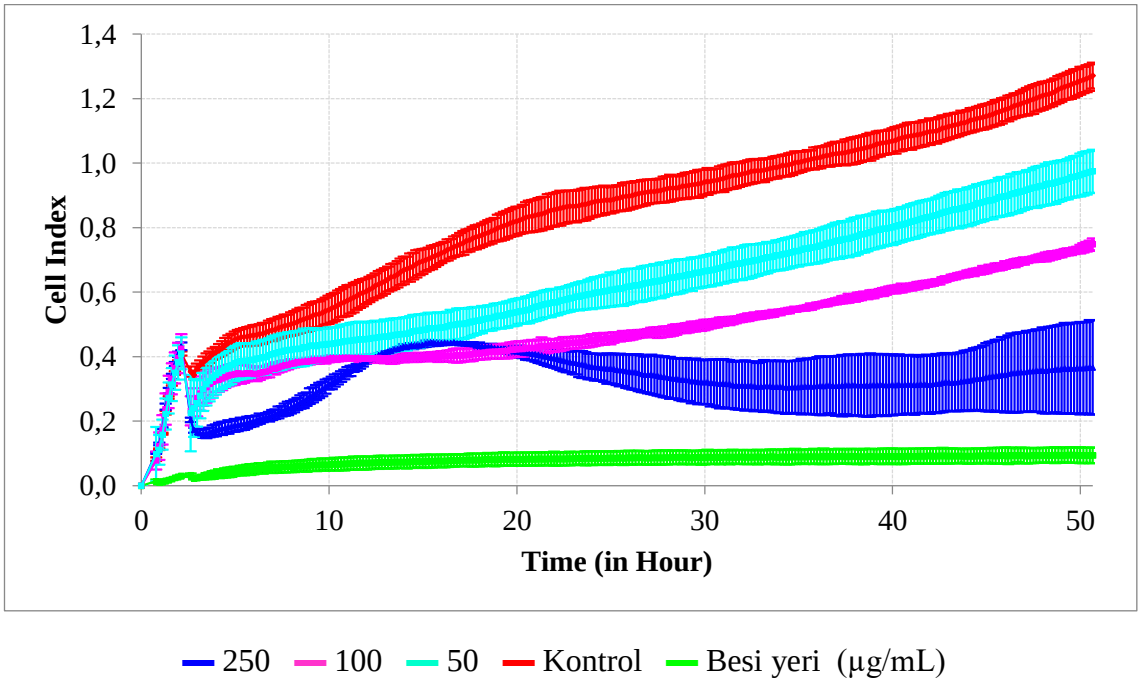


Şekil 4.7. PMeChM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.7. incelendiğinde, kontrol grubunun (kırmızı) deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil,

baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. 100 µg/mL (pembe) ve 50 µg/mL (turkuaz) konsantrasyonlarındaki dozların HeLa hücrelerine karşı herhangi bir etkileri olmamıştır. Her iki dozun uygulandığı kuyucuklardan elde edilen CI değerlerinin (turkuaz ve pembe) kontrol grubu (kırmızı) ile birebir örtüşen CI değerleri vermesi hiç etkilerinin olmadığını göstermiştir. 250 µg/mL konsantrasyondaki numune çözeltisinin eklendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (lacivert), deneyin 3 ile 10. saatleri arasında kısmen düşük CI değerlerinin oluşmasına neden olsa da bu etki süreklilik göstermemiştir. PMeChM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisinin olmadığı, deney sonuna kadar her üç konsantrasyonun CI değerlerinin, kontrol grubunun CI değerleri ile birebir örtüşmesi ile açıkça görülmüştür.

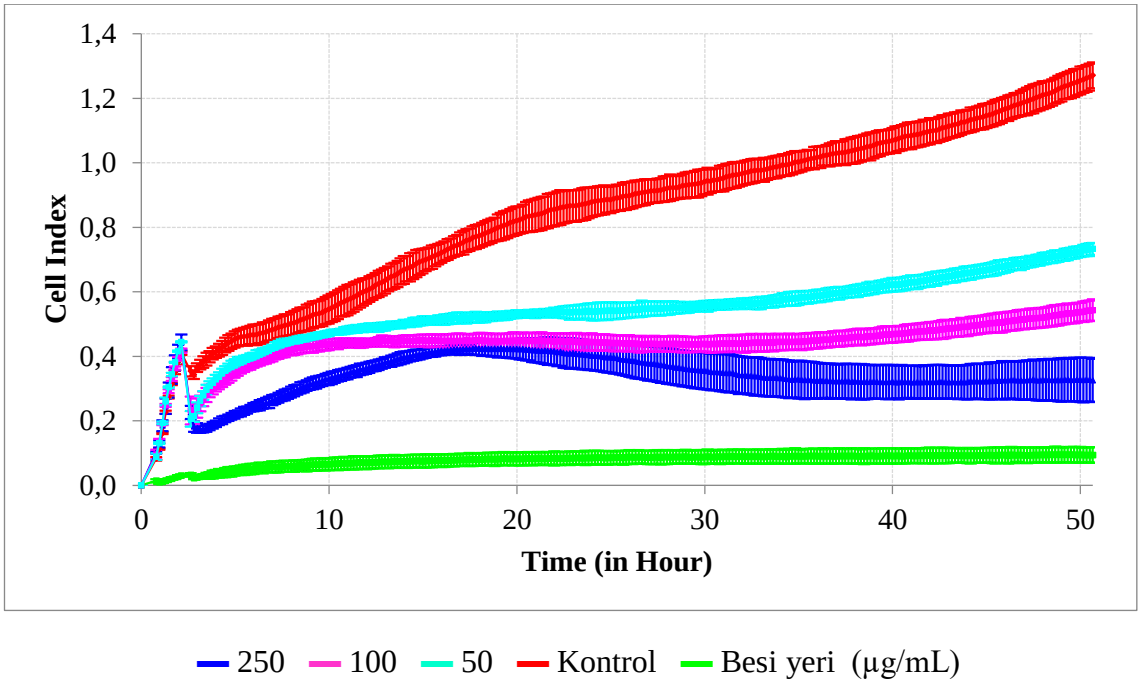
Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAÇ) HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 250 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarında 3 tekrarlı olarak çalışılmış ve sonuçlar Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. PEAÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.8 incelendiğinde, kontrol grubunun (kırmızı) CI değerlerinin deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. PEAÇ ekstresinin HeLa hücreleri üzerine eklendiği andan itibaren yüksek dozun uygulandığı kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (lacivert), kontrol grubunun CI değerlerine(kırmızı) göre daha düşük olarak oluşmuştur. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir.100 µg/mL (pembe) ve 50 µg/mL (turkuaz) konsantrasyonlarının etkilerinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri 13. saate kadar birbirine çok yakındır. Ekstrenin eklendiği andan itibaren diğer konsantrasyonlara göre daha düşük CI değerlerinin oluşmasına neden olan yüksek dozun (lacivert) etkisi 12. saat sonunda diğer konsantrasyonların CI değerleri ile aynı olmuştur. Bu saatten sonra doza bağlı antikanser etki net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Düşük dozun (turkuaz) zayıf da olsa var olan antikanser etkisi deney sonuna kadar devam etmiştir. Zaman içerisinde kademeli bir şekilde giderek azalan bu etki yine de kontrol grubunun CI değerlerinden (kırmızı) daha düşük değerlerde kalmıştır. Bu durum, düşük dozun (turkuaz) antikanser etkisinin olduğu, fakat bu etkinin hücreleri tamamen baskılamaktan daha çok proliferasyonu yavaşlatıcı bir etki şeklinde olduğu değerlendirilebilir. Benzer durum CMeChÇ ekstresinin orta dozu (pembe, 100 µg/mL) için de geçerlidir. Fakat yine de orta dozun antikanser etkisi hem kontrol grubunun (kırmızı) hem de düşük dozun CI değerlerinden düşük değerlerde kalmıştır. Bu da orta dozun etkisinin düşük doza göre daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Yüksek dozun (lacivert, 250 µg/mL) etkisi ise 20. saatten itibaren güçlü bir şekilde ortaya çıkmış ve deney sonuna kadar az da olsa artış göstererek devam etmiştir. Yüksek dozun (lacivert) etkilerinin incelendiği üç kuyucuktan elde edilen CI değerleri için hesaplanan standart sapmaların 20. Saatten itibaren giderek artış gösterdiği dikkat çekicidir. PEAÇ ekstresinin HeLa hücrelerine karşı doza bağlı antikanser etkisi 20. saatten sonra net olarak görülmektedir. PEAÇ ekstresinin yüksek dozunun (250 µg/mL, lacivert) güçlü antikanser etkisi önem arz etmektedir. PEAÇ ekstresinin HeLa hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, doza bağlı olarak açıkça görülmektedir.

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAM) HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.9'da verilmiştir.

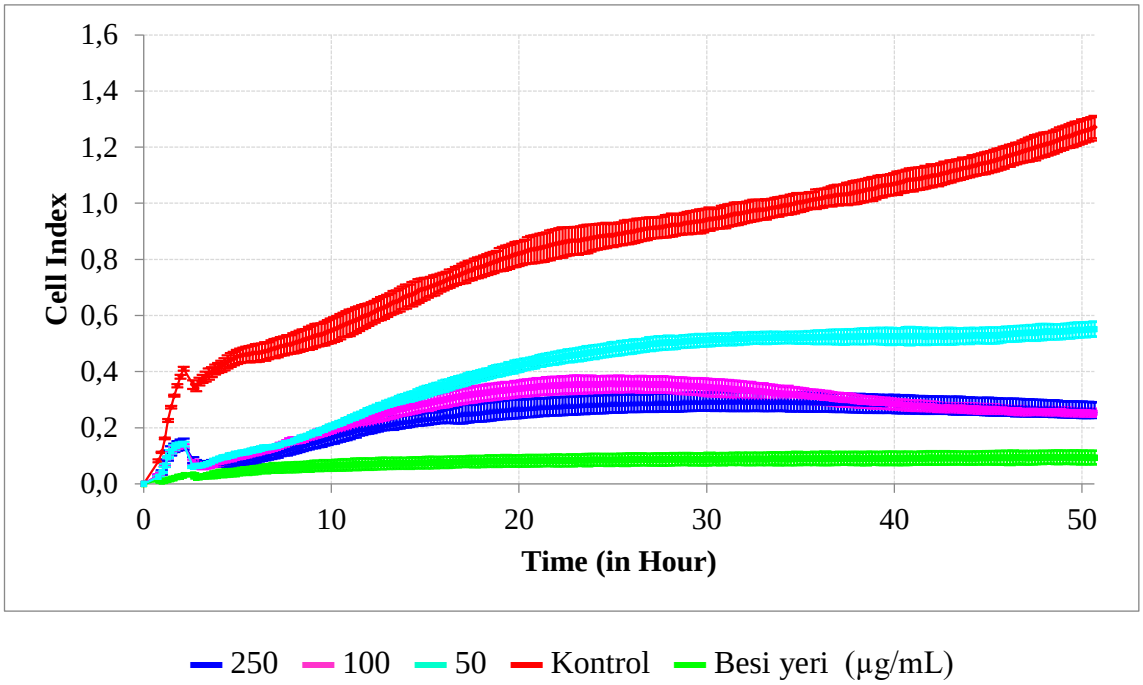


Şekil 4.9. PEAM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.9 incelendiğinde, kontrol grubunun CI değerlerinin (kırmızı) deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. PEAM ekstresinin HeLa hücreleri üzerine eklendiği andan itibaren yüksek dozun uygulandığı kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (lacivert), kontrol grubunun CI değerlerine (kırmızı) göre daha düşük olarak oluşmuştur. Fakat yüksek dozun düşük CI değerleri, zamanla artarak 15. saatte orta dozun CI değerleri ile hemen hemen aynı olmuştur. 100 µg/mL (pembe) ve 50 µg/mL (turkuaz) konsantrasyonlarının etkilerinin incelendiği kuyucuklardan elde

edilen CI değerleri 10. saate kadar birbirine çok yakındır. 10. saatten sonra orta dozun güçlü antikanser etkisi deney sonuna kadar aynı CI değerlerinin (pembe) oluşmasına neden olmuştur. Bu da HeLa hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı şeklinde değerlendirilebilir. Yüksek ve orta dozun CI değerleri (lacivert ve pembe) 15. saatten 30. saate kadar çok yakın değerler olarak ortaya çıkmıştır. 30. saatten sonra doza bağlı antikanser etki net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Düşük dozun (turkuaz) antikanser etkisi deney sonuna kadar devam etmiştir. Zaman içerisinde kademeli bir şekilde giderek azalan bu etki yine de kontrol grubunun CI değerlerinden (kırmızı) daha düşük değerlerde kalmıştır. Bu durum, düşük dozun (turkuaz) antikanser etkisinin olduğu, fakat bu etkinin hücreleri tamamen baskılamaktan daha çok proliferasyonu yavaşlatıcı bir etki şeklinde olduğu değerlendirilebilir. Yüksek dozun (lacivert, 250 µg/mL) etkisi ise 20. saatten itibaren güçlü bir şekilde ortaya çıkmış ve deney sonuna kadar az da olsa artış göstererek devam etmiştir. Yüksek dozun (lacivert) etkilerinin incelendiği üç kuyucuktan elde edilen CI değerleri için hesaplanan standart sapmaların 20. saatten itibaren giderek artış gösterdiği dikkat çekicidir. PEAM ekstresinin HeLa hücrelerine karşı doza bağlı antikanser etkisi 20. saatten sonra net olarak görülmektedir. PEAM ekstresinin yüksek dozunun (250 µg/mL, lacivert) ve orta dozunun (100 µg/mL, pembe) güçlü antikanser etkisi oldukça dikkat çekicidir. PEAM ekstresinin HeLa hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, doza bağlı olarak açıkça görülmektedir.

5-Florourasilin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.10'da verilmiştir.

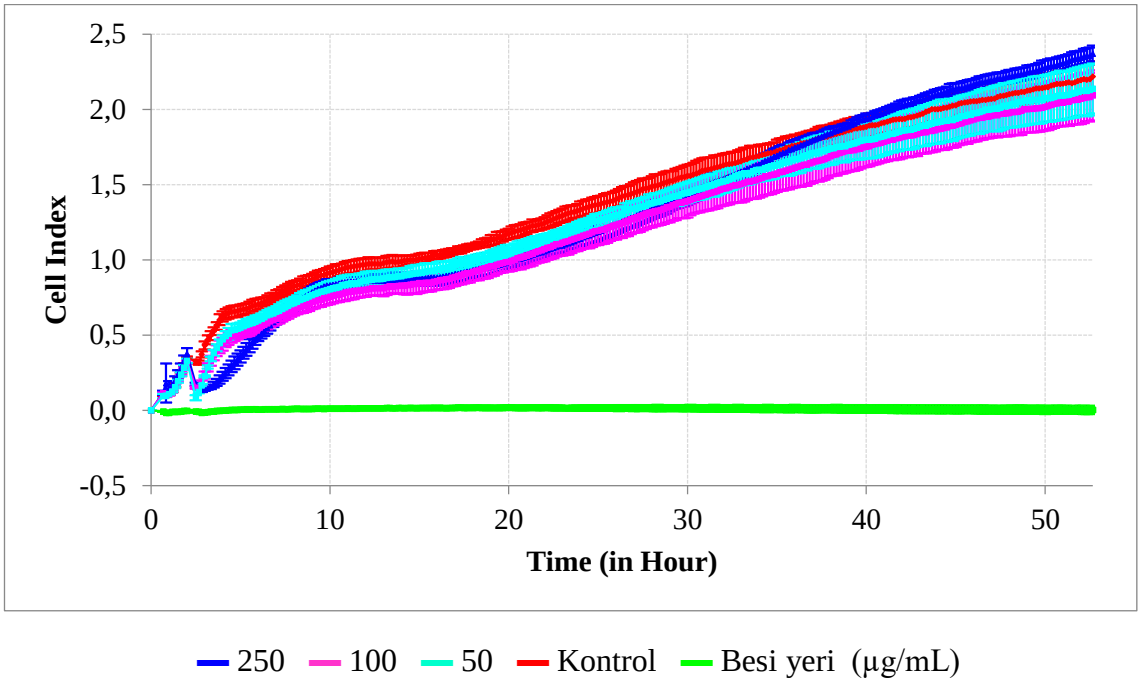


Şekil 4.10. 5-FU'in HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.10 incelendiğinde, hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değerinin (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfır olduğu görülmektedir. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Kontrol grubunun (kırmızı) CI değerlerinin ise deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Orta ve yüksek dozun (pembe ve lacivert) deney boyunca birbirine yakın CI değerleri oluşturduğu görülmektedir. Düşük dozun CI değerleri ise (turkuaz) 15. saate kadar diğer iki doz ile benzer şekilde oluşurken bu saatten sonra antikanser etkisi kısmen azalarak deney sonuna kadar diğer dozlardan daha yüksek CI değerleri oluşturacak şekilde devam etmiştir. Her üç dozunda güçlü antikanser etkisi dikkat çekmektedir.

Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının kloroform:metanol çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChÇ) PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz

(50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.10'da verilmiştir.

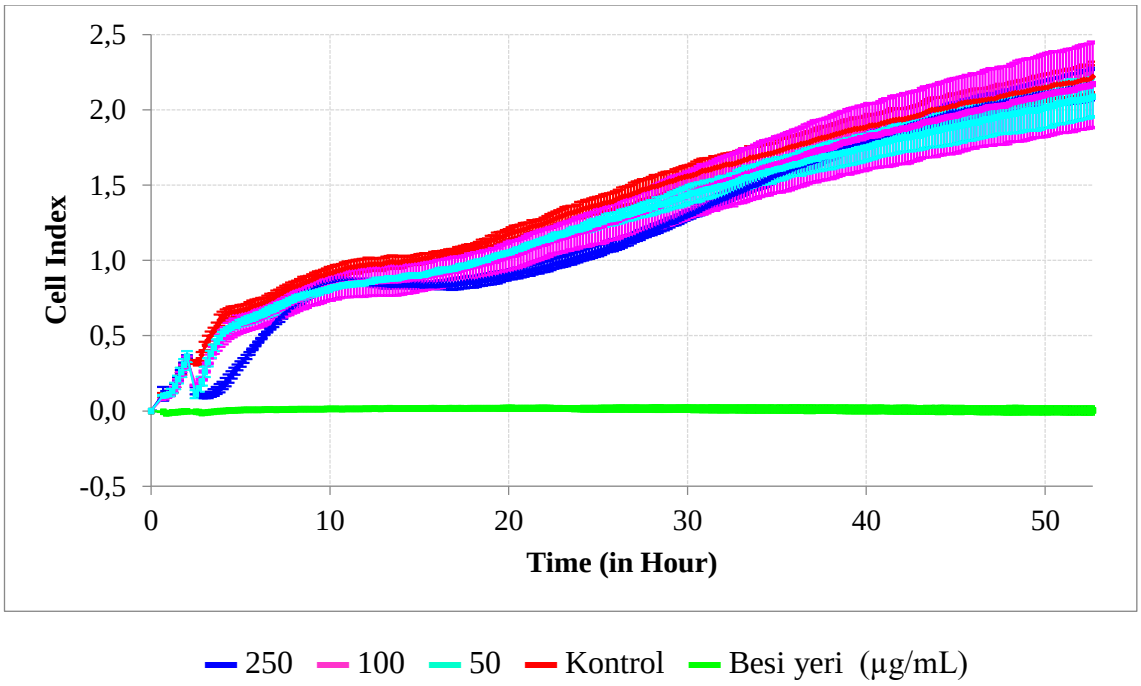


Şekil 4.11. PMeChÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.11. incelendiğinde, kontrol grubunun (kırmızı) deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. 100 µg/mL (pembe) ve 50 µg/mL (turkuaz) konsantrasyonlarındaki dozların PC3 hücrelerine karşı herhangi bir etkileri olmamıştır. Özellikle düşük doz uygulanan kuyucuklardan elde edilen CI değerlerinin (turkuaz) kontrol grubu (kırmızı) ile birebir örtüşen CI değerleri vermesi hiç etkisinin olmadığını göstermiştir. 250 µg/mL konsantrasyondaki numune çözeltisinin eklendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (lacivert) deneyin 3 ile 7. saatleri arasında kısmen düşük CI değerlerinin oluşmasına neden olsa da bu etki süreklilik göstermemiştir. PMeChÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisinin

olmadığı, deney sonuna kadar her üç konsantrasyonun CI değerlerinin kontrol grubunun CI değerleri ile birebir örtüşmesi ile açıkça görülmüştür.

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChM) PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.11'de verilmiştir.

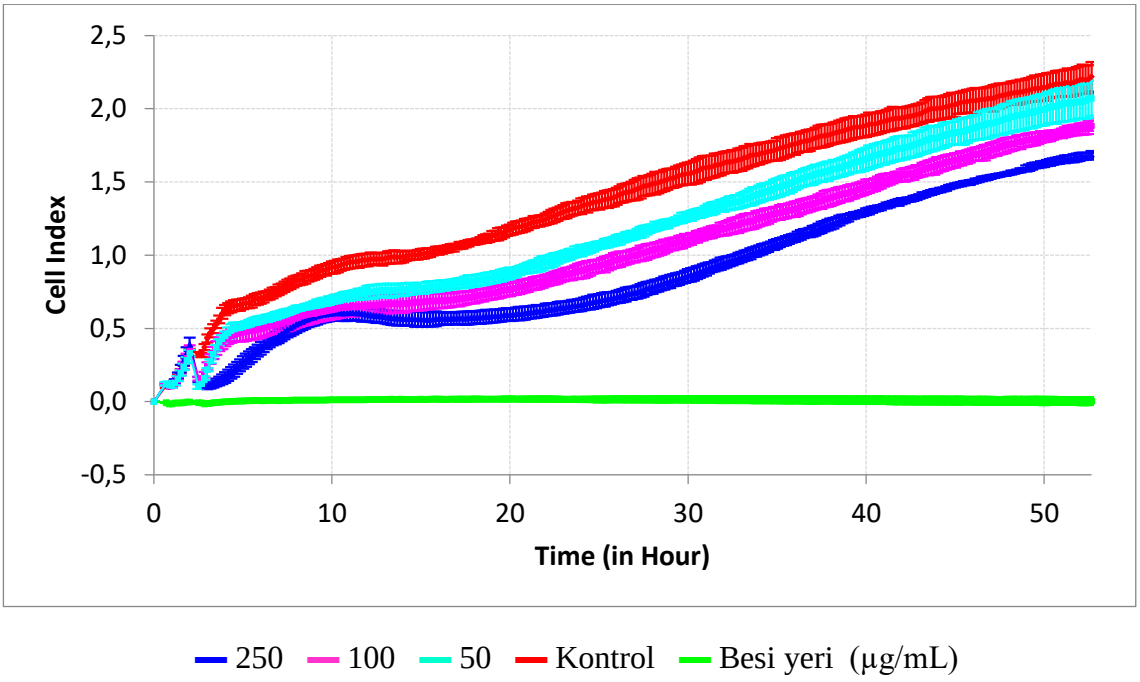


Şekil 4.12. PMeChM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

PMeChM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi (Şekil 4.12), PMeChÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisinin incelendiği deney ile çok benzer sonuçlar vermiştir. Yüksek doz (lacivert) eklendiği andan itibaren kısa süreli daha düşük CI değerlerinin oluşmasına neden olsa da bu etki süreklilik kazanmamıştır. Deneyin başından sonuna kadar kontrol grubunun CI değerleri (kırmızı) ile çok yakın CI değerlerinin oluşmasına neden olan orta ve düşük dozların CI değerlerine (pembe ve

turkuaz) ulaşan yüksek dozun CI değerleri (lacivert) deney boyunca aynı değerlerde ilerlemiş ve herhangi bir antikanser aktivite göstermemiştir. Benzer durum diğer iki doz için de geçerlidir. Bu nedenle PMeChM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı herhangi bir antikanser etkisi olmamıştır.

Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAÇ) PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.12'de verilmiştir.

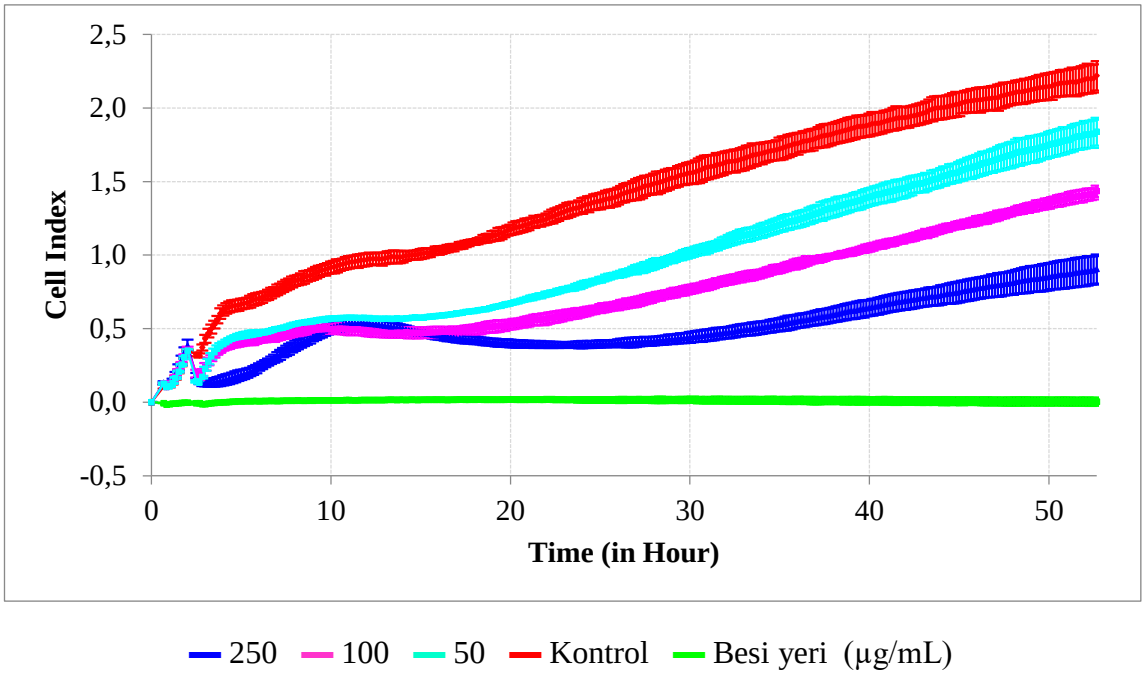


Şekil 4.13. PEAÇ ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.13. incelendiğinde, kontrol grubunun (kırmızı) deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Bitki örneğinin eklendiği kuyucuklardan elde edilen cell index (CI) değerleri, kontrol grubundan elde edilen CI değerlerinden farklı

olmuştur. Kontrol grubu (kırmızı) hiçbir antikanser etkiyle karşılaşmadan deney boyunca artış göstermiştir. Düşük konsantrasyonun CI değerleri (turkuaz), numunenin kuyucuklara eklendiği andan deney sonuna kadar, kontrol grubunun CI değerlerinden daha düşük olmuştur. Fakat bu güçlü bir antikanser etki olarak değerlendirilemez. Bu da hücrelerin numune içeriğindeki moleküllerce çok zayıf bir şekilde baskılandığı anlamına gelmektedir. Deney boyunca orta doz (pembe) ile yüksek doz (lacivert) konsantrasyonlarının PC3 hücrelerine karşı benzer etki gösterdikleri gözlenmiştir. 100 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında, hücrelerin proliferasyon süreci aynı şekilde etkilenmiştir. Eklendikleri kuyucuklardaki hücrelerin gelişimlerini kuvvetli bir şekilde engelleyememiş olsalar da yine de bu kuyucukların CI değerlerinin, kontrol grubunun CI değerlerine göre daha küçük değerlerde kalmasını sağlayabilmişlerdir. Yani yüksek ve orta doz tam olarak hücreleri durduramamış olsalar da gelişimlerini az da olsa baskılayabilmiş ve yavaşlatabilmiştir. Yüksek dozun (lacivert, 250 µg/mL) etkisi ise e-plate 96'ya eklendikten sonra 10. Saatten 20. saate kadar güçlü bir şekilde görülmektedir. Yüksek konsantrasyonun ilk 20. saate kadar süren bu antikanser etkisi bu çalışmada en düşük CI değerlerinin sağlandığı anlar olmuştur. Hücreler bu konsantrasyondaki numunenin etkisinden ancak 20. saatten sonra yavaş yavaş kurtulabilmişler ve CI değerinin artmasına yol açabilmişlerdir. Fakat yine de yüksek konsantrasyonun kuvvetli etkisi diğer konsantrasyonlara göre açık bir şekilde görülmektedir. Deney sonunda da yüksek konsantrasyonun sebep olduğu düşük CI değeri hala diğer konsantrasyonların değerlerinden daha aşağıdadır. Doza bağlı etki açıkça görülmektedir.

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAM) PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.13'te verilmiştir.

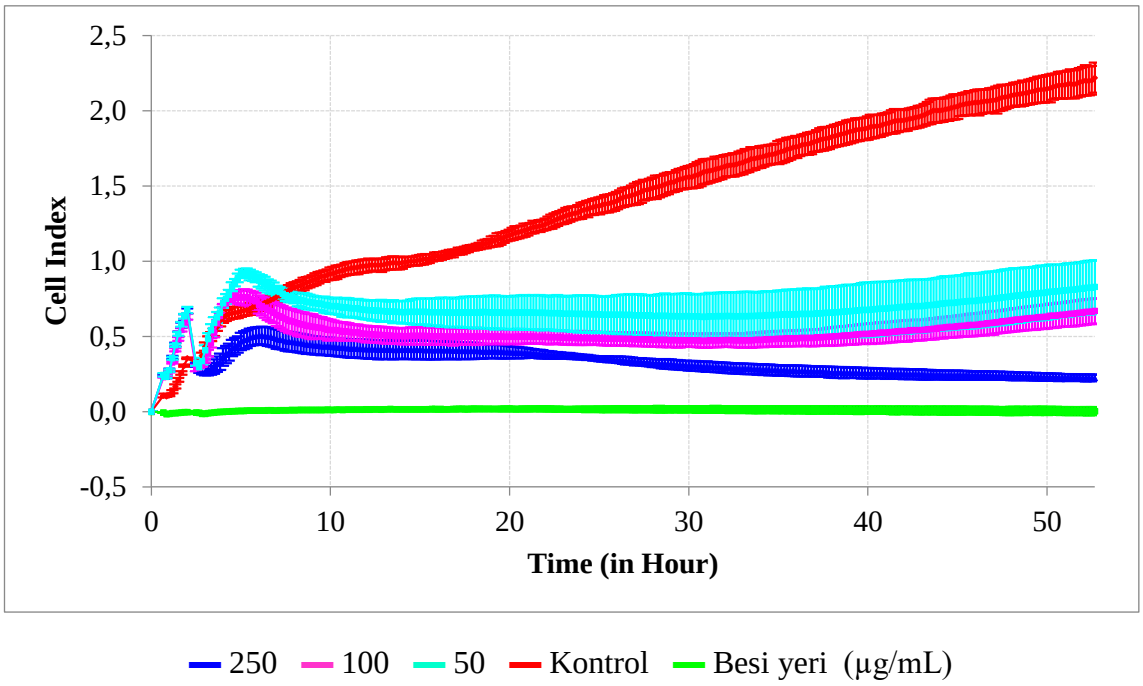


Şekil 4.14. PEAM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.14. incelendiğinde, hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değerinin (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfır olduğu görülmektedir. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Düşük (turkuaz) ve orta (pembe) dozun etkileri numunenin eklendiği andan itibaren 15. Saate kadar hemen hemen aynı CI değerleri olarak ortaya çıkmıştır. Fakat daha sonra ise doza bağlı olarak birbirinden farklı CI değerleri oluşturmuşlardır. Numunenin eklendiği andan itibaren 8. saate kadar yüksek dozun (lacivert) etkisi güçlü bir şekilde görülmüş fakat giderek azalan bu etki neticesinde orta çıkan CI değerleri 10. saatte diğer dozlarla aynı değerlere ulaşmıştır. Fakat PEAM ekstresinin antikanser etkisi doza bağlı olarak zamanla farklı CI değerlerinin oluşmasına neden olmuştur. 30. saate kadar yüksek dozun ilk baştaki güçlü etkisi devam etmiştir. 30. saatten sonra kısmen azalsa da bu saatten deney sonuna kadar PC3 hücrelerinin gelişimini baskılayabilmiştir. Orta dozun etkisi ise 15. saatten sonra zamanla azalmaya başlamıştır. Fakat yine de her iki dozun antikanser aktiviteleri kontrol grubunun CI değerleri (kırmızı) göz önüne alındığında oldukça dikkat çekicidir. Benzer durum düşük doz (turkuaz) içinde geçerlidir. Diğer dozlarda görülen antikanser aktivite gücünün zayıflaması düşük dozda da

gerçekleşmiştir. 15. Saatten deney sonuna kadar antikanser etkisi giderek zayıflamıştır. Fakat kontrol grubunun CI değerlerinin altında kalabilmiştir. PEAM ekstresinin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi doza bağlı olarak net bir şekilde görülmektedir.

5-Florourasilin PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.15'de verilmiştir.



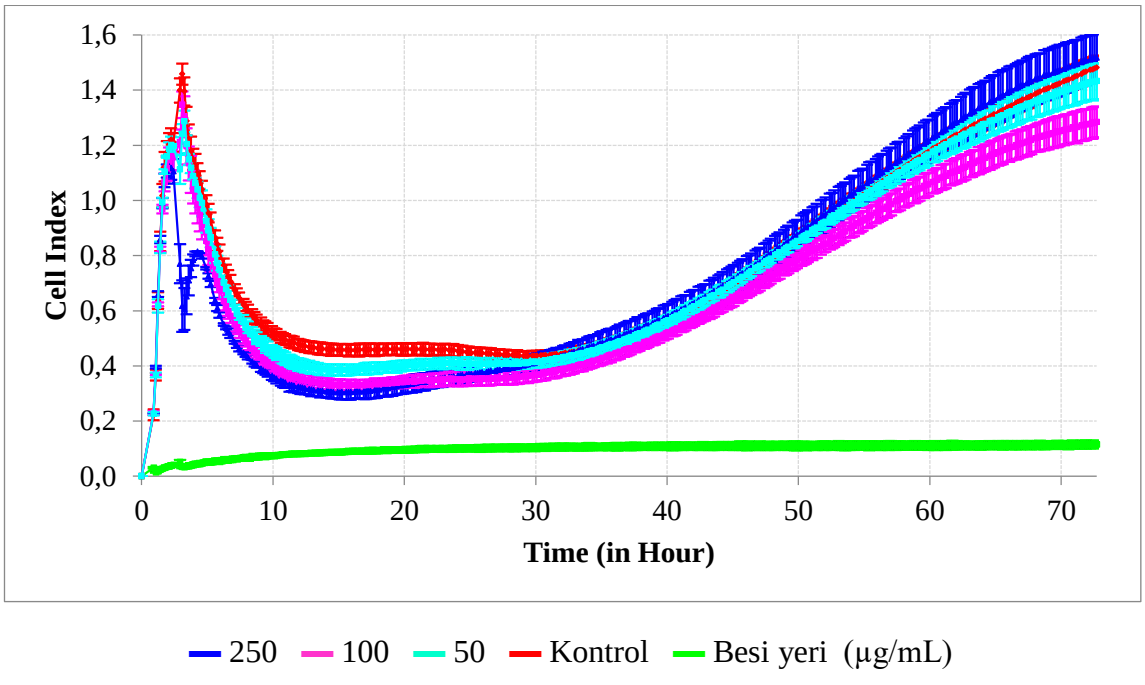
Şekil 4.15. 5-FU'in PC3 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.15 incelendiğinde, hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değerinin (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfır olduğu görülmektedir. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Kontrol grubunun (kırmızı) CI değerlerinin ise deney boyunca artış gösterdiği görülmektedir. Orta ve düşük dozun (pembe ve turkuaz) deney boyunca birbirine yakın CI değerleri oluşturduğu görülmektedir. Yüksek dozun CI değerleri ise (lacivert) 20. Saate kadar diğer iki doz ile benzer şekilde oluşurken bu saatten sonra güçlü antikanser

etkisi kısmen artarak deney sonuna kadar devam etmiştir. Her üç dozunda güçlü antikanser etkisi dikkat çekmektedir.

Prunus laurocerasus bitkisinin ekstrelerinin C6 hücresine karşı antikanser etkileri incelenirken diğer hücrelerden farklı olarak C6 hücre deneyleri numune eklendikten sonra 72 saat boyunca devam edecek şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca insan hücresi olan HeLa ve PC3 hücreleri için 25.000 hücre / kuyucuk oranı, sıçan beyin tümörü hücresi olan C6 için 100.000 hücre / kuyucuk olarak belirlenmiştir.

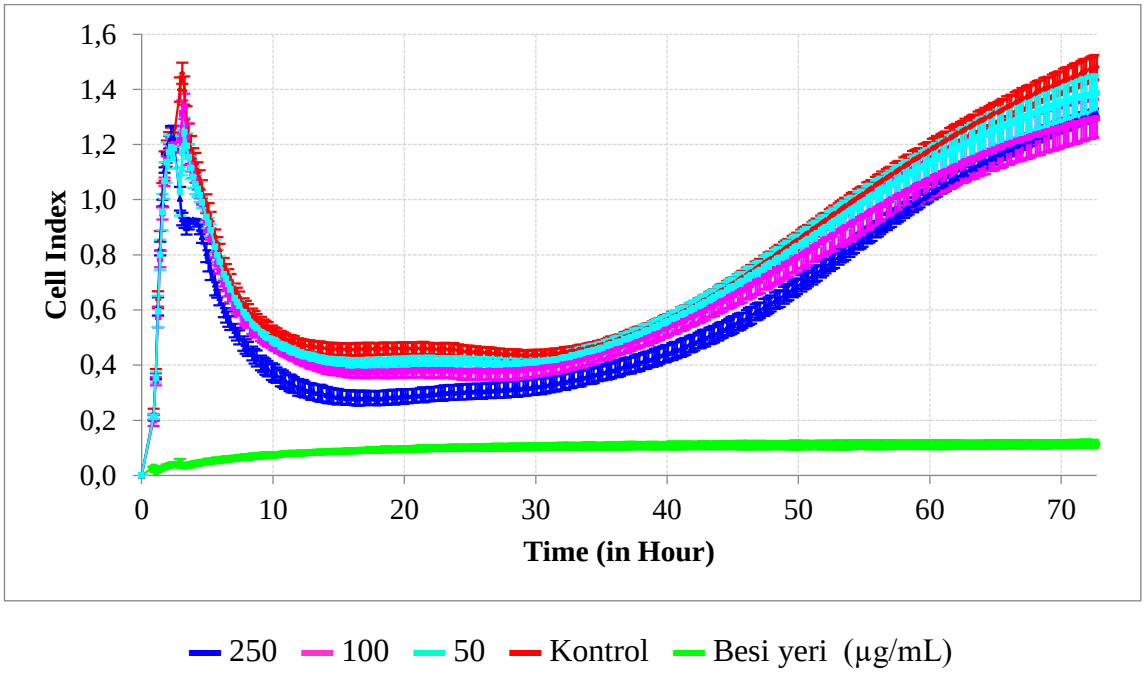
Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChÇ) C6 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.16. PMeChÇ ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Her üç konsantrasyonun etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri kontrol gurubu kuyucuklarından elde edilen CI değerleri ile deney boyunca çok yakın değerler olarak ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 4.16). Numunelerin eklendiği andan 30. saate kadar kısmen CI değerleri kontrol grubunun CI değerlerinden kısmen farklılık gösterse de bu durum daha sonra değişmiştir. Söz konusu saatten deney sonuna kadar tüm konsantrasyonların etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri kontrol grubundan (kırmızı) elde edilen değerlere çok yakın olduğu görülmektedir. Bu da PMeChÇ ekstresinin her üç dozunun da C6 hücresine karşı herhangi bir antikanser aktivite göstermediği anlamına gelmektedir.

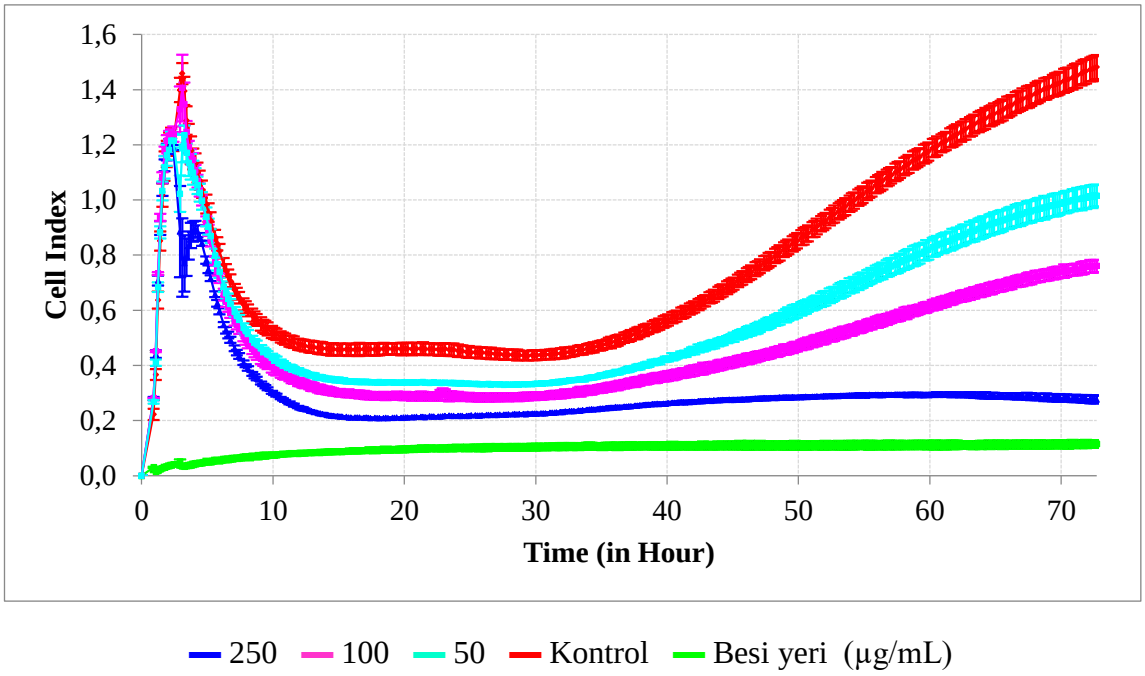
Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının kloroform:metanol [$CHCl_3$:MeOH (1:1)] çözücü sistemi ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PMeChM) C6 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.17. PMeChM ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

PMeChM ekstresinin C6 hücrelerine karşı 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının antikanser etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (turkuaz ve pembe), kontrol grubu kuyucuklarından elde edilen CI değerleri (kırmızı) ile aynıdır (Şekil 4.17). Bu durum bütün deney boyunca devam etmiştir. Bir başka ifadeyle, C6 hücrelerinin proliferasyonunu baskılayacak herhangi bir etkinin olmadığı kuyucuklardan elde edilen CI değerleri (kırmızı) ile aynı CI değerlerinin elde edilmesi, PMeChM ekstresinin 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının C6 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde olumlu veya olumsuz anlamda hiçbir şekilde etkiye sahip olmadığı anlamına gelmektedir. Hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değeri (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfırdır. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Yüksek dozun (lacivert) etkisi ise numunenin eklendiği andan 25. saate kadar kısmen etki gösterse de bu durum daha sonra değişmiştir. Söz konusu saatten deney sonuna kadar 100 µg/mL konsantrasyonunun (lacivert) etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerleri kontrol grubundan (kırmızı) elde edilen değerlere çok yakın olduğu görülmektedir. Bu da PMeChM ekstresinin her üç dozunun da C6 hücresine karşı herhangi bir antikanser aktivite göstermediği anlamına gelmektedir. Burada ayrıca dikkat çeken husus ise tüm kuyucuklardan elde edilen CI değerlerinin birbirlerine çok yakın değerler olarak ortaya çıkmaları ve standart sapma değerlerinin (dikey çubuklar) çok küçük olmasıdır.

Prunus laurocerasus bitkisinin çekirdek kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAÇ) C6 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.16'da verilmiştir.

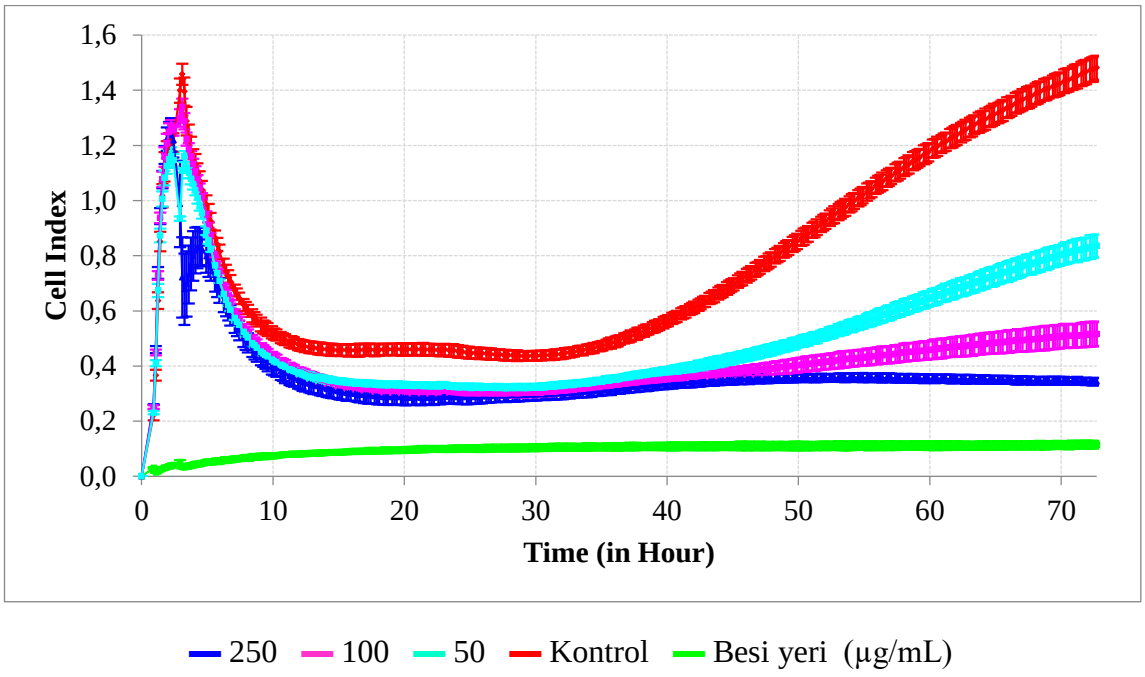


Şekil 4.18. PEAÇ ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.18. incelendiğinde, düşük dozun (50 µg/mL, turkuaz) etkisinin incelendiği kuyucuklardan elde edilen CI değerlerinin, kontrol grubunun CI değerlerinden (kırmızı) 9. saatten itibaren farklı olduğu görülmektedir. Bu da düşük dozun bile C6 hücrelerinin gelişimine etki ettiği anlamına gelmektedir. 100 ve 250 µg/mL derişimlerinin (pembe ve lacivert) ise kontrol grubuna göre daha düşük CI değerlerinin oluşmasına neden oldukları görülmektedir. Aradaki derişim farkı belirgin bir şekilde görülmektedir. Yüksek dozun (lacivert) etkisi oldukça kuvvetli bir şekilde ortaya çıkmış ve deney sonuna kadar devam etmiştir. Bu güçlü antikanser etki aynı şiddette hücrelerin proliferasyonunu baskılamıştır. Aynı şekilde 100 µg/mL derişiminin (orta doz, pembe) etkisi de deney sonuna kadar devam etmiştir. Fakat bu etki yüksek doz kadar şiddetli olmamıştır. Ayrıca 40. saatten sonra bu etkinin kısmen azalmaya başladığı ve düşük dozun (50 µg/mL, turkuaz) CI değerlerine yaklaştığı da görülmektedir. Bu da 250 µg/mL dozunun C6 hücreleri üzerinde uzun süreli bir antikanser etki yaptığı, fakat 50 µg/mL ve 100 µg/mL (turkuaz ve pembe) konsantrasyonlarındaki ekstrelerin C6 hücrelerine karşı antikanser etkilerinin 10. saatten 40. saate kadar maksimum etkiye ulaştığı, daha sonra ise hücrelerin bu baskılamanın etkisinden kurutularak yüzey elektrotlarına tutunarak proliferatif süreçlerine devam ettikleri şeklinde

değerlendirilebilir. Fakat yine de bu etki, hiç ekstre eklenmemiş kuyucuklardan gelen CI değerlerine ulaşamamıştır. Bu da orta ve düşük dozların (pembe ve turkuaz) antikanser etkilerinin hücreleri yavaşlattığı yönünde olduğu şeklinde değerlendirilebilir. PEAÇ ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisinin incelendiği bu deneyde doza bağlı etki net bir şekilde görülmüştür.

Prunus laurocerasus bitkisinin meyve kısmının suda kaynatılıp, sulu kısmın etil asetat ile ekstraksiyonundan elde edilen ekstrenin (PEAM) HeLa hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.17'de verilmiştir.

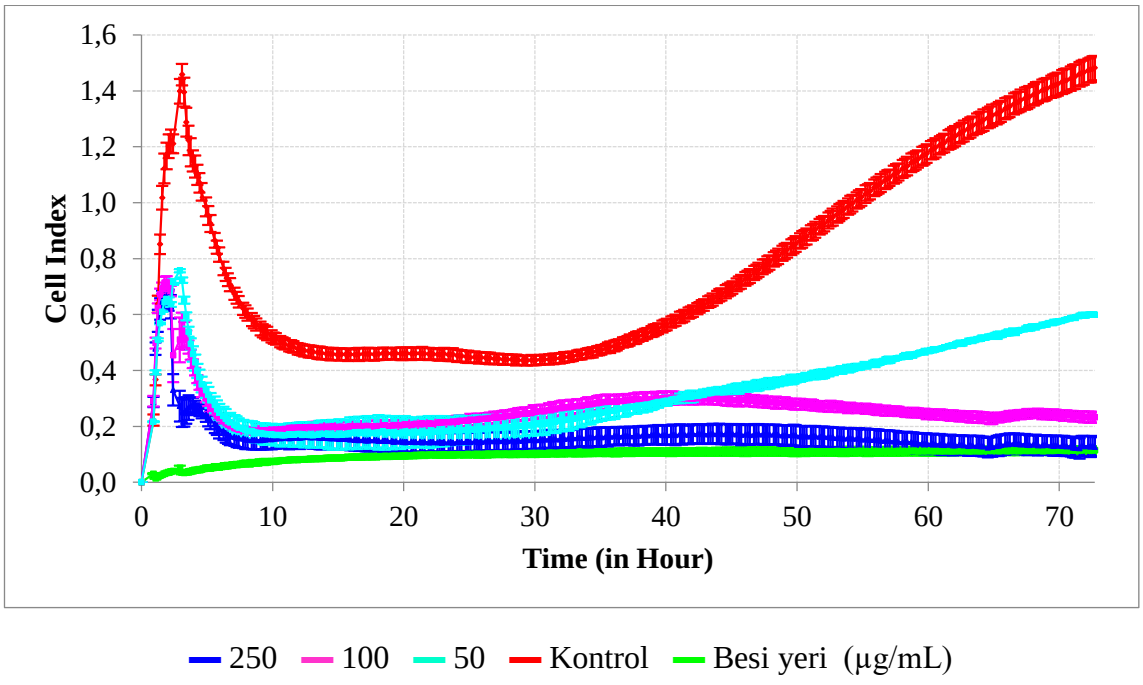


Şekil 4.19. PEAM ekstresinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Her üç doz da numune ekleme anında itibaren kontrol grubundan (kırmızı) daha düşük CI değerleri vermiştir (Şekil 19). Özellikle yüksek doz (lacivert) CI değerleri 5. saate kadar hızla düşüş göstermiştir. Orta (100 µg/mL, pembe) ve düşük (50 µg/mL, turkuaz) dozların CI değerleri ile yüksek dozun (250 µg/mL, lacivert) CI değerleri 7. saatten itibaren çok yakın değerler olarak oluşmuştur. 45. saate kadar kontrol grubundan daha

düşük ve iç içe geçecek şekilde oluşan her üç dozun CI değerleri 45. Saatten sonra doza bağlı olarak farklı antikanser etkiler göstermiştir. Bu saatten sonra yüksek dozun (lacivert) CI değeri aynı kalmış ve deney sonuna kadar aynı şiddette hücreleri baskılamıştır. Yüksek doz kadar olmasa da orta dozun (pembe) antikanser aktivitesi de oldukça güçlü bir şekilde görülmektedir. Düşük dozun (turkuaz) 45. saate kadar olan benzer CI değerleri yavaş yavaş artarak daha yüksek CI değerlerine ilerlemiştir. Özellikle 50. Saatten sonra doz farkı net bir şekilde görülmektedir. Her üç dozun da CI değerleri hiç numune eklenmeyen ve gelişimlerini hiçbir engelle karşılaşmadan devam ettiren kontrol grubunun CI değerlerinden (kırmızı) oldukça düşüktür. Bu da güçlü bir antikanser etki şeklinde değerlendirilebilir.

5-Florourasilin C6 hücrelerine karşı antikanser etkisi, 50 µL yüksek doz (250 µg/mL), 20 µL orta doz (100 µg/mL) ve 10 µL düşük doz (50 µg/mL) olmak üzere 3 farklı dozda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Deney sonucu CI (Cell Index)-Zaman grafiği olarak Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. 5-FU'in C6 hücrelerine karşı antikanser etkisini gösteren CI-Zaman grafiği

Şekil 4.20 incelendiğinde, hiç hücrenin eklenmediği ve sadece besi yeri içeren kuyucuklardan elde edilen CI değerinin (yeşil, baseline), elektron akışını engelleyen ya

da değişikliğe uğratan herhangi bir hücre olmadığı için sıfır olduğu görülmektedir. Deney sonuna kadar da hiçbir değişikliğe uğramadan bu şekilde devam etmiştir. Orta ve düşük dozun (pembe ve turkuaz) 45. saate kadar birbirine yakın CI değerleri oluşturduğu görülmektedir. 45. saatten sonra düşük dozun CI değerleri (turkuaz) zamanla artarak artmıştır. Yüksek dozun CI değerleri ise (lacivert) 30. saate kadar diğer iki doz ile benzer şekilde oluşurken bu saatten sonra güçlü antikanser etkisi kısmen artarak deney sonuna kadar devam etmiştir. Her üç dozunda güçlü antikanser etkisi dikkat çekmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyve ve çekirdek kısımlarının ham ekstreleri elde edilmiş, insan rahim kanseri (HeLa), prostat kanseri (PC-3) ve sıçan beyin tümörü (C6) hücrelerine karşı antikanser etkileri incelenmiş ve LC-MS/MS kromatografisi ile elde edilen ekstrelerin içerikleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında *Prunus laurocerasus* türü ile sayılan kanser hücrelerine karşı gerçek zamanlı antikanser aktivite çalışmaları ilk olarak gerçekleştirilmiştir.

LC-MS/MS analiz sonuçlarına göre PEAÇ ve PEAM en zengin ekstreler olarak öne çıkmaktadır. PEAÇ ve PEAM ekstreleri HeLa ve C6 hücrelerine karşı güçlü antikanser aktivite göstermişlerdir. PEAM ekstresi PC3 hücrelerine karşı da güçlü antikanser aktivite göstererek her üç hücre türüne karşı da antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. PEAÇ ekstresi de PC3 hücrelerine karşı antikanser aktivite göstermiş olsa da bu etki PEAM ekstresinin aktivitesi kadar güçlü olmamıştır. Bu durum söz konusu ekstrelerin içerdiği madde miktarının fazla olmasından kaynaklanmaktadır. PMeChM ekstresi hiçbir hücre türüne karşı antikanser aktivite göstermemiştir. PMeChÇ ekstresi için de benzer durum söz konusudur. Bu durum, fenolik bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak az olmasından kaynaklandığı şeklinde söylenebilir. Ayrıca tek başına antikanser aktivite göstermeyen bileşenlerin bir araya gelerek sinerjik etki oluşturdukları şeklinde değerlendirme yapılabilir.

Prunus laurocerasus bitkisinin kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi ve insan rahim kanseri (HeLa), insan prostat kanseri (PC3) ve sıçan beyin tümörü hücrelerine (C6) karşı antikanser aktivitelerinin incelenmesi ve içeriğinin belirlenmesi doğal bileşenlerin öneminin daha da arttığı günümüzde yeni çalışmalara ışık tutacaktır.

Prunus laurocerasus bitkisinin antikanser etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, *Prunus laurocerasus* bitkisinin kanser hücrelerine karşı antikanser bir etkinin göstermediğini bulgulamıştır. Öte yandan *Prunus laurocerasus* bitkisinin

kemoterapötik ajanlara karşı toksik etki azaltıcı doğal bir kaynak olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir (Aydın vd., 2016).

Yapılan bir diğer çalışmada çok küçük konsantrasyonlarda ferulik, şiringik, rutin ve gallik asit tespit edilmiştir. Meyvelerin metanolik ekstrelerinde benzoik asit, kafeik asit, o-kumarik asit, trans-sinnamik asit ve absisik asit saptanmamıştır. Metanol ile elde ettikleri *Prunus laurocerasus* bitkisinin ekstrelerinde ise klorojenik asit olarak bulunmuştur (Çakır ve Gülseren 2017).

Bayrambaş tarafından yapılan bir çalışmada ise epigallokateşin gallat, epigallokateşin, gallik asit, prosiyanidin B2, epikaşetin, kateşin gallat, gallokateşin gallat, klorojenik asit, protokateşik asit etil ester, kateşin, kuersetin-3-glukozid, kaempferol rutin ve kerasiyanin klorid içerdiği görülmüştür (Bayrambaş 2016).

Prunus laurocerasus bitkisinin ekstrelerinin insandan izole edilmiş HCT-116 kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği yani anti-karsinojenik etkiye sahip olduğu bulgulanmıştır (Çakır ve Gülseren 2017). Ekstrelerin anti-karsinojenik özelliklerine ek olarak, kalsiyum pektat jellerinde stabilize edilerek liyofilize formda hazırlanan fonksiyonel fenolik ekstrelerinin da aynı şekilde anti-karsinojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yaklaşımla söz konusu bileşenler gastrik, intestinal ya da kolonik teslimat amaçlarına uygun biçimde formüle edilebilmektedirler (Çakır ve Gülseren 2017). Söz konusu çalışmaların biyokimyasal temelini oluşturmak amacıyla *Prunus laurocerasus* bitkisinin ekstrelerinin apoptotik özellikleri incelenmiştir (Çakır ve Gülseren 2018). Akış sitometrisi kullanılarak yapılan deneylerde ekstre konsantrasyonuna ve *Prunus laurocerasus* bitkisinin türüne bağlı olarak bitkinin ekstrelerinin kanser hücrelerini değişen oranlarda apoptozis yaptığı gösterilmiştir (Çakır ve Gülseren 2018).

Dimetil sülfoksit ile ekstrakte edilen *Prunus laurocerasus* bitkisinin insandan izole edilmiş kolon, meme, prostat, karaciğer, akciğer ve serviks kanser hücre hatları ve normal fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkisini araştırılmıştır (Demir vd. 2017). Ekstre, meme ve prostat kanserine karşı antikanser etki göstermez iken akciğer ve

kolon kanserlerinde seçici sitotoksisite sergilemiştir. Eken vd. (2017), *Prunus laurocerasus* meyve ekstresinin dimetoatla oluşan hepatotoksisite üzerine etkisini incelemişlerdir. Dimetoat karaciğer toksisitesine neden olan bir bileşiktir. *Prunus laurocerasus* bitkisinden elde edilen ekstre, bu karaciğer toksisitesine neden olan hasarı büyük oranda iyileştirmiştir.

Fenolik asit içeriği üzerine yapılan bir çalışmada *Prunus laurocerasus* bitkisi analizinde ekstraksiyon yönteminin önemi de gösterilmiştir. Karabegovic vd. (2014) mikrodalga destekli ekstraksiyon, klasik ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu tekniklerinin *Prunus laurocerasus* bitkisinin yapraklarının ve meyvesinin antioksidan aktivitesi ve kompozisyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. İncelenen ekstraksiyon metotlarıyla elde edilen numunelerin ekstraksiyon verimleri farklı olmakla birlikte polifenolik bileşik içeriğinin hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. *Prunus laurocerasus* bitkisinin meyvesinde en yüksek klorojenik asit olmak üzere vanilik asit, kafeik asit ve rutin bulunmuştur. Aynı zamanda klorojenik asit *Prunus laurocerasus* bitkisinin yapraklarının ana fenolik bileşiği olarak belirlenmiş ve bunun dışında o-kumarik asit, kuersetin 3-glukozid, luteolin 7-glukozid, apijenin 7-glukozid, kaempferol 3- glukozid ve naringenin tespit edilmiştir (Karabegovic vd. 2013, 2014).

Prunus laurocerasus bitkisinin türlerinde bulunan birincil fenolik bileşen olarak belirlenen klorojenik asidin (50-1600 $mg.kg^{-1}$) antioksidan, antibakteriyel ve antikarsinojenik aktivitelere sahip bir bileşik olduğu bilinmektedir (Meng *et al.* 2013).

Yapılan diğer bir çalışmada taflan ve böğürtlen meyvelerinin etanollü ve sulu ekstrelerinin toplam antioksidan aktivitesi ile DPPH serbest radikali, süperoksit iyon radikali ve demir iyonları şelatlayıcı ve hidrojen peroksit süpürücü aktivitelerini incelenmiştir. Her iki meyvenin de antioksidan aktivitesinin referans bileşiklerden (BHT, BHA ve α-tokoferol) daha yüksek olduğu görülmüştür (Güder ve Korkmaz 2012).

Celep vd. (2012) tarafından taflan, Trabzon hurması ve kızılcık bitkisinin antioksidan özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada, taflan meyvesinin toplam fenolik ve flavanoid miktarının diğer iki meyveden daha az olduğu bulgulanmıştır. Üç meyvede de metal şelatlama aktivitesi gözlenmemiştir. Kiraz, taflan ve kızılcık meyvelerinin özellikleri karşılaştırıldığında antioksidan kapasitelerinin yüksekliğine göre sırasıyla kızılcık, taflan ve kiraz etkin bulunmuştur (Çapanoğlu vd. 2011).

Bir çalışmada metanol ile ekstrakte edilen *Prunus laurocerasus* bitkisinin ekstresinde klorojenik asit ana fenolik asit olarak bulunmuştur. Meyvelerinde yüksek seviyede p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, kateşik, protokateşik asit ve p-kumarik asit bulunduğu görülmüştür (Karahalil ve Şahin 2011).

Ülkemizin sahip olduğu bitki çeşitliliği ve bitkilerin ürettiği metabolitler arasından değerli kimyasalların yüksek katma değerli ürünler şeklinde değerlendirilmesi çerçevesinde gerçekleştirilen çalışmanın, ülke ekonomisine önemli katkı yapması ve ülkemizin ilaç etken maddeleri açısından dışa bağımlılığını azaltması hedeflenmektedir.

Sonuç olarak, ülkemizde gıda ve tedavi amaçlı olmak üzere birçok şekilde kullanılan ve tüketilen *Prunus laurocerasus* bitkisinin ekstrelerinin HeLa, PC3 ve C6 hücrelerine karşı çeşitli seviyelerde antikanser aktivite gösteren bileşenler içerdiği gösterilmiştir. Bu durum literatürdeki çalışmaları destekler niteliktedir. *Prunus laurocerasus* bitkisinin bu potansiyelinin hangi yolakları üzerinden gerçekleştiği detaylı bir şekilde incelenmelidir. Ayrıca başka kanser hücrelerine karşı da antikanser etkileri araştırılarak daha etkili olduğu hücre türlerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Abay, G., Altun, M., Koldas, S., Tufekci, A.R., Demirtas, I. 2015. Determination of antiproliferative activities of volatile contents and hplc profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta),. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 18, 453-463.

Alasalvar, C., Al-Farsi, M. and Shahidi, F. 2005. Compositional characteristics and antioxidant components of cherry laurel varieties and pekmez. Journal of Food Science, 70: S47-S52.

Alasalvar, C., Wanasundara, U. , Zhong, Y., Shahidi, F. 2006. Functional lipid characteristics of cherry laurel seeds (Laurocerasus officinalis roem, Journal of Food Lipids, 13: 223-234.

Aydın, A., Erenler, R., Yılmaz, B., Tekin, Ş. 2016. Antiproliferative effect of cherry laurel. J. Turkish Chem. Soc. Sect. Chem., 3(3): 217-228.

Bayrambaş, K. 2016. Çeşitli gıda sistemlerinin enkapsüle edilmiş karayemiş polifenolleri ile zenginleştirilmesi, Doktora Tezi, Tunceli Üniversitesi, Tunceli.

Baytop, T. 1999. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). Nobel Tıp Kitapevleri Press, İstanbul.

Celep, E., Aydın, A., Yeşilada, E. 2012. A comparative study on the in vitro antioxidant potentials of three edible. fruits: Cornelian cherry, Japanese persimmon and cherry laurel. Food Chem Toxicol, 50: 3329-3335.

Çakır, B., Gülseren, İ. 2017. Dissolution kinetics of polyphenol bearing calcium pectate hydrogels in simulated gastric or intestinal media and their anti-carcinogenic capacities. Food Hydrocoll, 70: 69-75.

Çakır, B., Gülseren, İ. 2018. Determination of the anti-carcinogenic and apoptotic characteristics of cherry laurel extracts and their functional lyophilizates. Traditional Foods 2018 Conference Girne, KKTC.

Capanoglu, E., Boyacioglu, D., de Vos, R. C., Hall, R. D., Beekwilder, J. 2011. Procyanidins in fruit from Sour cherry (Prunus cerasus) differ strongly in chainlength from those in Laurel cherry (*Prunus lauracerasus*) and Cornelian cherry (Cornus mas). Journal of Berry Research, 1(3), 137-146.

Demir, S., Turan, İ., Demir, F., Ayazoğlu, E., Aliyazıcıoğlu, Y. 2017. Cytotoxic effect of *Laurocerasus officinalis* Extract on human cancer cell lines. J Res Pharm, 21: 121-126.

Demirer, T., Baran, Y., Camcı, C., Olgun, N., Özçelik, T., Özet, A., Özkök, S., Solak, M., Zülfikar, B., Gültekin, M. 2014. TÜBA Ulusal Kanser Politikaları Çalıştayı Raporu, TÜBA Kanser Çalışma Grubu.

Demirtaş, İ., Erenler, R., Elmastaş, M., Göktaşoğlu, A. 2013. Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. Food Chemistry, 136, 34–40.

Eken, A., Baldemir, A., Ünlü-Endirlik, B., Bakır, E., İlgün, S. 2017. Essential element and metal content of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* roem.) fruit and seeds. J Health Sci, 26(1): 1-4.

Eken, A., Ünlü-Endirlik, B., Bakır, E., Baldemir, A., Yay, A. H., Cantürk, F. 2017. Effect of *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) fruit on dimethoate ınduced hepatotoxicity in rats. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 23(5): 779-787.

Genç, N. 2009. Taflan çekirdeğinde (Laurocerasus officinalis roem) fonksiyonel bileşik analizi ve antoksidan kapasitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Güder, A., Korkmaz, H. 2012. Investigation of antioxidant activity and total anthocyanins from blackberry (Rubus hirtus Waldst. and Kit) and cherry laurel (Laurocerasus officinalis Roem). Asian J Chem, 24(10): 4525-4231.

Güler, E., Mutlu, A. 2018. Türkiye'de biyokaçakçılık sorunu: Küre Dağları Milli Park'ı örneği. 12. Uluslararası Kamu Yönetimi Sempozyumu. ISBN: 978-605-84963-1-6.

Gültekin, M., Boztaş, G., Utku, E.Ş., Kavak Ergün, A., Sevinç, A., Tütüncü, S., Dündar, S., Seymen, E. 2016. Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

Günal, N. 2013. Türkiye'de iklimin doğal bitki örtüsü üzerindeki etkileri, Acta Turcica, 1:1-22.

Halilova, H., Ercisli, S. 2010. Several physico-chemical characteristics of cherry laurel (*Laurocerasos officinalis* roem.) fruits. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 24(3), 1970-1973.

İslam, A., Deligöz, H. 2012. Ordu ilinde karayemiş (*Laurocerasus officinalis* L.) seleksiyonu. Akademik Ziraat Dergisi, 1(1), 37-44.

Jemal, A., Vineis, P., Bray, F., Torre, L., Forman, D. 2014. Kanser Atlası, American Cancer Society, Atlanta.

Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Todorović, Z. B., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L. 2014. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. Ind Crops Prod, 54: 142-148.

Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L. 2013. Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of phenolic compounds in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves. Sep Purif Technol, 120: 429-436.

Karahalil, F.Y., Şahin, H. 2011. Phenolic composition and antioxidant capacity of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) sampled from Trabzon region, Turkey. Afr J Biotechnol, 10(72): 16293-99.

Katz, L., Baltz, R.H. 2016. Natural product discovery: past, present and future, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 43:155-176.

Kolaylı, S., Küçük, m., Duran, C., Candan, F., Dincer, B. 2003. Chemical and antioxidant properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) fruit grown in the Black Sea Region, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(25):7489-7494.

Koldaş, S., Demirtas, I., Ozen, T., Demirci, M.A., Behçet, L. 2015. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. viride (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95, 786–798.

Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., Hu, Y. 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 801457.

Newmark, J., Brady, R. O., Grimley, P. M., Gal, A. E., Waller, S. G., Thistlethwaite, J. R. 1981. Amygdalin (Laetrile) and prunasin beta-glucosidases: distribution in germ-free rat and in human tumor tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences, 78(10), 6513-6516.

Orhan, I. E., Akkol, E. K. 2011. Estimation of neuroprotective effects of *Laurocerasus officinalis* Roem.(cherry laurel) by in vitro methods. Food Research International, 44(3), 818-822.

Özkan, S., Keskinkılıç, B., Gültekin, M., Karaca, A.S., Öztürk, C., Boztaş, G.,Karaca, M.Z., Utku, E.Ş., Turan, H., Dede, İ. 2014. 2013-2018 Türkiye Kanser Kontrol Programı, T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara.

Özkan, S., Keskinkılıç, B., Şirin, H., Ekinci, B., Güler, S., Çobanoğlu, N., Sarıoğlu, G., Bolaç Yavaşoğlu, G., Ergüder, T. 2015. Bulaşıcı olmayan hastalıkların önlenmesine ve kontrolüne ilişkin küresel eylem planı 2013-2020, Dünya Sağlık Örgütü, Avrupa Bölge Ofisi, ISBN: 978 92 4 150623 6.

Rauws, A. G., Olling, M., Timmerman, A. 1982. The pharmacokinetics of amygdalin. Archives of Toxicology, 49(3-4), 311-319.

Tuncer, A.M., Özgül, N., Olcayto, E., Gültekin, M. 2009. Türkiye'de Kanser Kontrolü, T.C. Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, Ankara. ISBN: 978-975-590-300-2.

URL1: https://commons.wikimedia.org/wiki/Prunus_laurocerasus#/media/File:Karayemi%C5%9F-2.JPG , 02.07.2019.

URL 2: http://www.akarsukoyu.com/Pages.asp?cat_id=6&cat2_id=226&wid=652, 02.07.2019.

URL 3: http://www.karadenizbirlik.com/urun/giresun-taflan---karayemis-cekirdegi-laz-kirazi-cekirdegi-laz-uzumu-cekirdegi-gurcu-kirazi-cekird_1522.aspx, 02.07.2019.

URL 4: https://www.aceabio.com/products/rtca-sp/, 02.07.2019.

URL 5: https://www.aceabio.com.cn/products/rtca-systems/consumables/e-plate-96, 02.07.2019.

URL 6: https://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigence-RTCA-SP-MP-Instruments.pdf, 02.07.2019.

URL 7: https://www.aceabio.com/products/rtca-mp/, 02.07.2019.

URL 8: http://custombiotech.roche.com/home/Product_Details/INS_2157.html, 02.07.2019.

Yang, F., Li, J., Zhu, J., Wang, D., Chen, S., Bai, X. 2015. Hydroxysafflor yellow A inhibits angiogenesis of hepatocellular carcinoma via blocking ERK/MAPK and NF-kappaB signaling pathway in H22 tumor-bearing mice. European Journal of Pharmacology, 754, 105-114.

Yang, J., Wang, R., Feng, Q., Wang, Y. X., Zhang, Y. Y., Wu, W. H., Ge, P. L., Qi, J. P. 2018. Safflower polysaccharide induces cervical cancer cell apoptosis via inhibition of the PI3K/Akt pathway. South African Journal of Botany, 118, 209-215.

Zhou, H., Yang, J., Zhang, C., Zhang, Y., Wang, R., Li, X., Zhang, S. 2018. Safflower polysaccharide inhibits the development of tongue squamous cell carcinoma. World Journal of Surgical Oncology, 16(1), 167-167.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Melike AKDOĞAN
Doğum Yeri	: Yenimahalle / Ankara
Doğum Tarihi	: 16/02/1991
Medeni Hali	: Bekar
Yabancı Dili	: İngilizce
Tel	: 507 490 53 32
E-posta	: melikeakdoan@hotmail.com
Eğitim Durumu	
Lise	: Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (2009)
Lisans	: Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya (2010-2015)
Yüksek Lisans	: ÇKÜ/FBE/Kimya Anabilim Dalı 2016-2019