



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YER ELMASI (*Helianthus tuberosus* L.) EKSTRAKTLARININ İNSAN MEME KANSERİ MCF-7 HÜCRE HATTI ÜZERİNE SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Fadime BEYAZYÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos-2019
KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, bilgisi ve donanımıyla beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam ve Prof. Dr. Emine Arslan'a,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın hocam Dr.Öğr. Üyesi Elif Gülbahçe Mutlu'ya,

Bu süreci beraber atlattığımız, deneylerimin her aşamasında yanımda olan ve yardımlarını eksik etmeyen arkadaşım Gözde Koygun'a,

Deneyler süresince ihtiyaç duyduğumuz cihazların kullanımı için yardımlarını esirgemeyen Gıda Tarım Üniversitesi'ne özellikle hocası Mert Sudağıdan hocama,

Çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen, her zaman arkamda duran, sevgisi, şefkati ve bilgisiyle beni taçlandıran sevgili eşim Selim Beyazyüz'e ve beni hayata bağlayan güzel oğlum Eymen Beyazyüz'e

Eğitim hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim canım annem ve babama,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **iv**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**

ÖZET ..... **vii**

ABSTRACT ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Amaç 4

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Kanser ve Kanserin Tanımı 5
2.1.1. Kanserin etiyolojisi 8
2.2. Tümör Hücrelerinin Fizyolojik Oluşumu ve Çoğalması 12
2.3. Hücre Adezyonu 13
2.4. İnvazyon ve Metastaz 15
2.5. Apoptoz 19
2.5.1. Apoptozun düzenlenmesi 20
2.5.2. Apoptoz yolakları 21
2.5.3. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları 23
2.5.4. Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler 24
2.6. Meme Kanseri 25
2.6.1. Meme kanseri belirtileri 25
2.6.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması 26
2.6.3. Meme kanseri epidemiyolojisi 27
2.7. MCF-7 Hücre Hattı ve Tarihçesi 29
2.8. Yer Elması (*Helianthus tuberosus* L.) 32
2.8.1. Yer elmasının orjini 32
2.8.2. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın morfolojik özellikleri 33
2.8.3. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın kullanım alanları 34
2.9. Hücre kültürü 36
2.10. Sitotoksisite 37

3. MATERYAL VE YÖNTEM **38**

3.1. Kullanılan Malzemeler 38
3.1.1. Kullanılan aletler 38
3.2. Metod 39
3.2.1. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın ekstraksiyonu 39
3.2.2. Hücre kültürü 39

3.3. Sitotoksisite Analizi 43
3.3.1. Xtt (2,3-bis (2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2h-tetrazolyum)) 43
3.4. Hücre Adezyon Analizi 45
3.5. Hücre İnvazyon Analizi 46
3.6. Apoptoz Tayini İçin Kullanılan Yöntemler 50
3.6.1. Mitokondriyal membran potansiyeli (δψm) ölçümü ile apoptoz analizi .. 50
3.6.2. Annexin V/ 7AAD ikili boyaması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesi 51
3.6.3 İstatistiksel Analiz 53

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 54

4.1. MCF-7 Meme Kanseri ve MCF-12A Sağlıklı Meme Epitel Hücre Morfolojisi 54
4.2. Yer Elması Yumru ve Kabuk Ekstraktlarının Sitotoksisite Sonuçları 54
4.3. Yer Elması Ekstraktların MCF-7 Hücre Adezyonu Üzerine Etkilerinin Sonuçları 59
4.3.1. 48 saat sonuçları 59
4.3.2. 72 saat sonuçları 61
4.4. Yer Elması Ekstraktların MCF-7 Hücre İnvazyonu Üzerine Etkilerinin Sonuçları 62
4.4.1. 48 saat sonuçları 62
4.4.2. 72 saat sonuçları 63
4.5. Yer elması ekstratlarının MCF-7 hücre hattı üzerindeki TMRE boyama ile mitokondriyal membran potansiyeli (δψm) ölçüm sonuçları 64
4.5.1. 24 saat sonuçları 64
4.5.2. 48 saat sonuçları 65
4.5.3. 72 saat sonuçları 66
4.5.4. MCF-12A hücrelerinin TMRE boyama sonuçları 68
4.6. Yer Elması Ekstratlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Annexin V/7AAD Boyama Sonuçları 68
4.6.1. 24 saat sonuçları 69
4.6.2. 48 saat sonuçları 70
4.6.3. 72 saat sonuçları 71
4.7. MCF-12A Hücrelerinin Annexın V/ 7AAD Boyama Sonuçları 73

5. TARTIŞMA 74

5.1. Öneriler 77

KAYNAKLAR 78

ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat
CO2 : Karbondioksit
dk : Dakika
gr : Gram
H2O : Su
H2O2 : Hidrojen peroksit
MetOH : Metanol
µg : Mikrogram
µl :Mikrolitre
µM :Mikromolar
ml :Mililitre
mm :Milimetre
nm :Nanometre
rpm : Dakikadaki devir sayısı(Revolution per minute)
v/v : Hacimce yüzde
δψm :mitokondriyal membran potansiyeli

Kısaltmalar

DMEM :Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO :Dimetilsülfoksit
PBS :Fosfat Tamponlu Su
IAP :Inhibitor of Apoptosis (Apoptozis İnhibitörü)
TMRE : Tetramethylrhodamine Ethyl Ester
WHO :DünyaSağlık Örgütü
DNA :Deoksiribonükleik asit
IC_{50} :% 50 inhibe edici konsantrasyon
RPMI-1640 :Roswell Park Memorial enstitünde üretilen 1640 serili besiyeri
XTT :Tetrazolium hidroksit
Bid :Bcl-2 interacting domain
Bim :Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bcl-2 :Anti apoptotik protein
Caspase :: Cysteinly aspartate- specific protease

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yer Elması (*Helianthus tuberosus* L.) Ekstraktlarının İnsan Meme Kanseri MCF-7 Hücre Hattı Üzerine Sitotoksik, Antimetastatik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Fadime BEYAZYÜZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Emine ARSLAN

2019, 95 sayfa

Kanser dünyada ölüm oranı en yüksek hastalıklardan birisidir ve bunun %30'unu meme kanseri oluşturmaktadır. Son yıllarda, bitkilerle yapılan alternatif tıp çalışmaları kanser tedavi araştırmaları için önem kazanmıştır. Bu çalışmada yer elması (*H. tuberosus* L.) yumrusu ve kabuğunun metanol ekstraktlarının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik, antimetastatik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücre canlılık oranları XTT metodu ile tespit edilmiştir. MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hattı kontrol amaçlı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki adezyon ve invazyon özellikleri Vybrant Hücre Adezyon Analiz ve EZCell Hücre İnvazyon Analiz kitleri ile belirlenmiştir. Ekstraktların, MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları üzerindeki apoptotik etkilerini tespit etmek için AnnexinV/7AAD ve TMRE ile iki farklı boyama yöntemi kullanılmıştır. Yer elması yumrusu ve kabuğu ekstraktlarının MCF-7 hücre hattı üzerindeki zamana ve konsantrasyona bağlı en etkili dozları sırasıyla 48 saatte IC_{50}:108,8 µM ve 134,2 µM ve 72 saatte IC_{50}:20 µM ve 4,75 µM olarak bulunmuştur ($p<0,0001$). Elde edilen verilere göre 48 saat için yer elması yumru ekstraktının daha etkili olduğu görülürken, 72 saat uygulamasında ise kabuk ekstraktı MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan adezyon analizlerinin 48 ve 72 saat uygulamalarında IC_{50} değerleri kontrol grubu ile kıyaslandığında kabuk ekstraktı % adezyon miktarını daha fazla azalttığı için daha etkili bulunmuştur. İnvazyon sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla artan dozlarda % invazyon oranının azaldığı en etkili sonuç 48 saat uygulanan yumru ekstraktının 100 µM'lık konsantrasyonunda görülürken 72 saat uygulanan yer elması kabuk ekstraktının 20 µM'lık konsantrasyonunda görülmüştür. Antimetastatik özelliklerin araştırılması için yapılan adezyon ve invazyon analizlerinin birbiriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Apoptotik etkisinin belirlenmesi için uygulanan her iki yöntem birbirini destekler şekilde 72 saat uygulamalarında yumru ekstraktlarının apoptotik etkilerinin daha etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Adezyon, apoptoz, MCF-7, meme kanseri, invazyon, sitotoksisite.

ABSTRACT

MASTER THESİS

Investigation of Cytotoxic, Antimetastatic and Apoptotic Effects of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) Extracts on Human Breast Cancer MCF-7 Cell Line

Fadime BEYAZYÜZ

Republic of Turkey Selcuk University

Sciences Institute

Director: Prof. Emine ARSLAN

2019,95 page

Cancer is one of the highest mortality rates in the world and 30% of this occurs in breast cancer. In recent years, alternative medicine studies with plants have gained importance for cancer treatment research. The aim of this study is to determine the cytotoxic, antimetastatic and apoptotic effects of tuber and shell of jerusalem artichoke (H. tuberosus L.) methanol extracts on MCF-7 human breast cancer cell line. Cell viability was determined by using XTT method. MCF-12A which is healthy breast epithelial cell line was used for control group. The adhesion and invasion properties of the tuber and shell extracts of jerusalem artichoke applied in different concentrations on MCF-7 breast cancer cells were determined by Vybrant Cell Adhesion Assay and EZCell Cell Invasion Assay kits. Two different staining methods with AnnexinV / 7AAD and TMRE were used to determine the apoptotic effects of these extracts on MCF-7 and MCF-12A cell lines. The most effective doses of jerusalem artichoke tuber and shell extracts depending on time and concentration on MCF-7 cell line were IC50: 108.8 µM and 134.2 µM for 48 hour and IC50: 20 µM and 4.75 µM for 72 hour, respectively ($p < 0.0001$). According to the obtained data, it was observed that tuber extract of jerusalem artichoce was more effective for 48 hours, whereas shell extract was more effective on MCF-7 breast cancer cells in 72 hours application. IC50 values were found to be more effective in 48 and 72 hours applications of adhesion analysis as compared to the control group because the shell extract decreased the amount of% adhesion more. According to the invasion assay results, the most effective result in which the % invasion rate decreased in increasing doses compared to the control group was seen at 100 µM concentration of tuber extract applied for 48 hours, while 20 µM concentration of jerusalem artichoke extract applied for 72 hours. Adhesion and invasion analyzes for antimetastatic properties were found to be compatible with each other. It was observed that the apoptotic effects of tuber extracts were more effective in 72 hours applications, as both methods supported each other to determine the apoptotic effect.

Keywords: Adhesion, apoptosis, MCF-7, breast cancer, invasion, cytotoxicity.

1. GİRİŞ

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin kontrolsüz bir biçimde bölünerek çoğalmasıyla ortaya çıkan kötü huylu tümörler için kullanılan terimdir. Kanser, insan sağlığını önemli ölçüde etkileyen dünya çapında bir hastalıktır. Normal hücre büyümesini, çoğalmasını ve hücre ölümünü düzenleyen mekanizmalardaki bozukluklar hastalığın tüm biçimlerinde görülmektedir. Sonuçta, ortaya çıkan tümörün hafif ila şiddetli anormalliğe doğru ilerlemesi, komşu dokulara invazyonu ve sonunda vücudun diğer bölgelerine yayılması (metastaz) ile seyretmektedir. Hastalık, esas olarak, kalıtsal faktörlerden ziyade bireylerin, yeme alışkanlıkları, hava kirliliği, sigara kullanımı gibi kanserojenik ajanlara (kansere neden olan) maruz kalmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır (WHO, 2002)

Dünya genelinde kadınlarda görülen en yaygın kanser türlerinden biri meme kanseridir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %18'i meme kanseri kökenlidir ve meme kanserine bağlı ölümler; akciğer ve kolorektal kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır(Çakır ve ark., 2016; Çapanoğlu ve Bakar, 2018). Ayrıca, meme kanseri, hastaların yaklaşık % 50'sinde erken ölüme sebep olmaktadır (Ferlay ve ark., 2012). Ancak, 1989'dan bu yana, meme kanseri nedeniyle ölen kadınların sayısı, erken teşhis ve tedavi iyileştirmeleri sayesinde giderek azalmıştır (Cancer, 2019).

Günümüzde kanser hastaları için; cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tedavileri uygulanmaktadır. Bunlara ek olarak son zamanlarda yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde karada ve denizde bulunan bitkilerden de faydalanılmaktadır. Bu sebeple doğadaki bitkileri kullanarak yapılan tedavi yöntemi 'fitoterapi' hızla gelişmektedir**.**

Yer elması Asteraceae familyasına ait bir bitkidir. Yer elması içeriğinde frukton bulundurmasının yanı sıra temel amino asit içeren yüksek miktarda proteinlere de sahiptir. Patates ve diğer yumrulu bitkilere göre 2 kat daha fazla protein içermektedir (Pan ve ark., 2009) Ayrıca yer elması, Amerika yerlilerinin yumru olarak tükettikleri ilk besindir. Bu bitki, Fransız kaşif Champlain tarafından 1600'lü yılların başlarında Fransa'ya götürülmüş ve 1600'lerden itibaren insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Soğuğa dayanıklı olması, kuraklığa ve zayıf topraklarda yetişmesi bitkiyi avantajlı hale getirmektedir. Türkiye'de yer elmasının başta Orta Anadolu ve Ege bölgeleri olmak üzere, birçok bölgede yetiştirildiği bildirilmiştir (İşler, 2011). Yer elması, içinde çeşitli hastalıklara karşı koruyucu özelliği bulunan "inülin"

maddesi bulundurması ve bununla birlikte bağırsaklardaki toksin maddelerin yok olmasına da yardımcı olmasıyla kanser için başvurulan alternatif bir bitkidir.

Literatürdeki fitokimyasal çalışmalarda, yer elmasından izole edilen çeşitli bileşiklerin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olduğu gösterilmiştir (Pan ve ark., 2009). Buna ek olarak başka bir çalışmada strese maruz bırakılmış yer elması (*H. tuberosus*) yumru parankiminin bazı spesifik polipeptidleri salabildiğini ve uygulanan hücre hattına bağlı olarak bitki ya da hayvan kaynaklı tümör hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Griffaut ve ark., 2007). Yuan ve ark. (2013)'nın bir çalışmasında ise yer elması yapraklarından elde edilen bileşiklerin MCF-7, A549 ve HeLa kanser hücrelerinde MTT yöntemi kullanılarak test etmişler ve sonuç olarak bu bileşikleri her üç kanser hücre çizgisine karşı tutarlı sitotoksisik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Yuan ve ark., 2013). Bunlara ek olarak ilaç firmaları bu bitkiyi, bağışıklık koruyucu sistemini hızlandırmasından ve antitoksik etkisinin bulunmasından dolayı bazı preparatların hazırlanmasında kullanmaktadır (Karolina ve ark., 2000).

Hücre kültürü çalışmaları, çok hücreli organizma hücrelerinin in vitro şartlarda özel koşullar (ısı, besin, nem vb.) sağlanarak, hücrelerin kontamine olmasını önleyerek yaşatılması ile yapılmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları, çeşitli canlılardan alınan hücrelerin yapay olarak üretilip çoğaltılabilmesi ve canlıların herhangi bir doku veya organdan alınan hücrelerin kullanılmasında etik kaygı olmadığı için araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Zucco ve ark., 1998). Hücre kültürü çalışmaları genellikle kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksisite çalışmalarıdır (Gilbert ve Boutros, 2016). Hücrelerin toksik etkisinin incelenmesi sitoktoksisite çalışmları ile belirlenmektedir. Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Hücreye dayalı sitotoksisite çalışmaları, hayvan deneylerine göre daha kolay uygulanabilir olmasından dolayı sıkça tercih edilir hale gelmiştir (Riss ve Moravec, 2004). İn vitro şartlarda çeşitli (kimyasal, biyolojik, fiziksel vb.) etkenler uygulanan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, sitotoksisite araştırmlarının önemli aşamasıdır (Niles ve ark., 2007). Çeşitli testlerle hücre canlılığı belirlenebilmektedir. Sitotksisite çalışmalarında kullanılan yöntem sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir bu araştırmaların en önemli basamağıdır (Riss ve ark., 2006). Sitotoksisite araştırmaları için kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır (Crouch ve ark., 1993; Longo-Sorbello ve ark., 2006; Fan ve Wood, 2007; Tokur ve Aksoy, 2017). Kolorimetrik sitotoksisite metdodlarında, tetrazolyum

tuzları kullanılması ile renk değişikliği gözlenmesi ve hücrelerin spesifik boyanmasına dayalı ölçüm yapılmaktadır. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan XTT, 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum bir kolorimetrik metoddur (Borenfreund ve Puerner, 1985).

Kötü huylu tümörler çevre dokuları istila etmelerinin yanı sıra, hayati olan diğer organlara da metastaz olarak bilinen süreçte kolonize edebilirler. Yaygın metastaik süreç hastanın yakın bir zamanda yaşamını kaybetmesine sebebiyet verebilmektedir (Alison, 2001). Kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ı metastaz sürecinin seyrine bağlı olarak gelişmektedir (Hejmadi, 2009).

İnsan vücudundaki çeşitli hücresel olayların düzenlenmesine katkı sağlayan adezyon mekanizmasının işevindeki bir bozulma, tümör oluşumu ve yayılmasında (metastaz) önemli role sahiptir. Kötü huylu (malign) tümörler adezyon moleküllerinin (CAM) ekspresyonunu sağlayarak hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin artışına ya da azalışına sebep olurlar. Böylece tümör hücrelerinin ana yerinden kopup yayılmalarına sebebiyet verirler (Özyörük ve Şimşek, 2003). Hücre içindeki adezyon moleküllerinin azalması kanserli hücrelerin çevresinden daha kolay bir şekilde ayrılmasını sağlar ve böylece kanser hücresinin diğer dokulara yayılması kolaylaşır (Baba ve Câtoi, 2007; Çalış, 2016).

İnvazyon, tümör hücrelerinin mekanik ve bağışıklık doku bariyerlerini aşarak dokularin içine girmesi olayı için kullanılan terimdir. Doku bariyerlerinin proteinolizi kanser hücrelerinin invazyonu için gereklidir. Kanser hücrelerinde, kontrol mekanizması yok olmuş veya çok zayıflamış olacağından kanser hücreleri dokulardan gelen sinyallere ihtiyaç duymadan kendi otokrin sinyalleri ile invazyona sınırsızca devam ederler. İnvazyonun oluşması için ilk olarak tümör hücrelerinin bazal membrana adezyonu geçekleşmelidir ve daha sonra da bazal membranın enzimlerle eritilerek tümör doku içine geçişişi sağlanmış olmalıdır. Bu olay gerçekleşirken tümör hücreleri doku yıkıcı enzimleri (matrix metalloproteinazlar) salgılar. Bu enzimler jelatin ve kollajenin yikimina sebep olurlar. Ancak dokularda da bu enzimlerin inhibasyonunu sağlayan faktörler (Tissue inhibitors of metalloproteinases- TIMPs) bulunmaktadır. Tümör hücresinin dokuya invazyonu bu iki sistemin etkileşimi sonucu oluşmaktadır (Taşdemiroğlu, 2003).

1.1. Amaç

Bu çalışmada in vitro hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, soyulmuş yer elması (*H.tuberosus* L.) yumrusu ve kabuğunun metanol ekstraktlarının insan meme kanseri östrojen reseptör pozitif ER+ özellikli MCF-7 hücre hattı ve meme epitel hücre soyu olan MCF-12A üzerindeki sitotoksik, antimetastatik ve apoptotik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

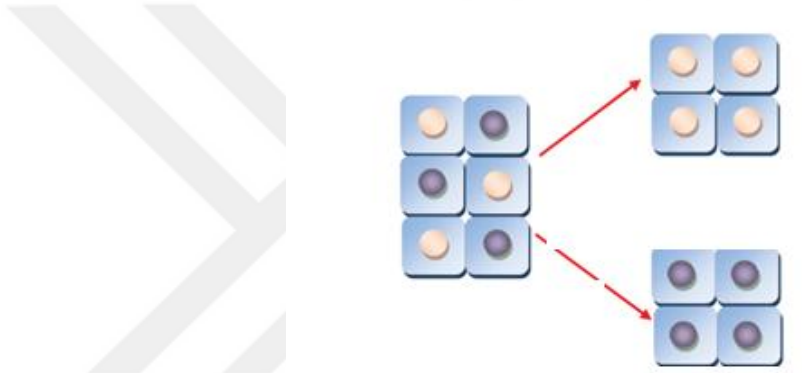
Yer elması yumrusu (kabuğu soyulmuş) ve kabuğunun MCF-7 meme kanseri ve MCF-12A meme epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için XTT metodu kullanılması amaçlanmıştır. Literatürde bu metod kullanılarak yer elmasının proliferatif etkisinin belirlendiği bir araştırmaya rastlanmamış olması çalışmayı özgün kılmaktadır.

Belirlenen sitotoksik dozlara göre yer elmasının yumrusu ve kabuğunun insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerindeki antimestatik etkisinin araştırılması için adezyon ve invazyon analizleri yapılması amaçlanmıştır. Buna ek olarak, olası önleyici/baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi amacıyla hücrelerin apoptotik etkisi ise Annexin V/ 7AAD boyama ve mitokondriyal membran potansiyeli TMRE boyası ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser ve Kanserin Tanımı

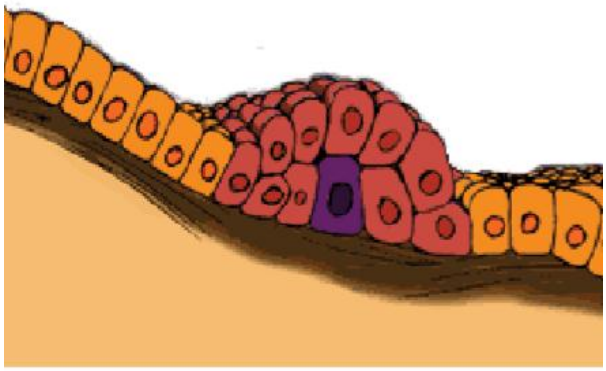
Kanser, insan vücudundaki herhangi bir hücrenin değişmesi, kontrolden çıkması ya da aşırı çoğalması ile ortaya çıkan çok faktörlü bir hastalıktır. Hastalığın temelinde Deoksiribonükleik asit (DNA)'in doğru bir şekilde eşleşmemiş olması yatmaktadır. DNA doğru eşleşmediği zaman mutasyona uğramakta ve bu mutasyon ise yeni bir yapının oluşmasına imkan tanımaktadır. Bu mutasyonlar genetik, sistemsel ve çevresel etkenlerle gelişebilmektedir (Can, 2015; Nejat ve Nur 2015).



Şekil 2.1. Tek anormal orijinden kanser meydana gelmesi (Hejmadi, 2009).

Momna Hejmadi (2009)'ye göre kanser, DNA'sı değişikliğe uğramış (mutasyonu) olan tek anormal hücreden (klonal orijinden) kaynaklanan çok hücreli ve çok aşamalı bir hastalıktır. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz biçimdeki proliferasyonunu, hafif anormal bir aşamaya yol açan ikinci bir mutasyon izlemektedir (Şekil 2.1). Mutasyonun ve bu hücrelerin seçici genişlemesinin ardışık takipleri, bir tümör kütlesinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Hejmadi, 2009).

Sağlıklı hücreler, hücrenin bölünüp bölünmeyeceği, başka bir hücreye ayrılması ya da ölmesi gerekip gerekmediğini belirten sinyallere sürekli maruz kalmalarına rağmen, kanser hücreleri olarak tanımladığımız hastalıklı hücreler bu sinyallerden bağımsız bir biçimde kendi kendini yöneterek, kontrolsüz biçimde çalışmakta, büyümekte ve çoğalmaktadırlar. Hücrenin kontrolsüz biçimde çoğalması, büyümesi ya da otokontrol mekanizmasından bağımsız hareket etmesi gibi mekanizmasal bozukluklar kanser çeşitlerinin tümünde görülen ortak semptomlardandır (Hejmadi, 2009).

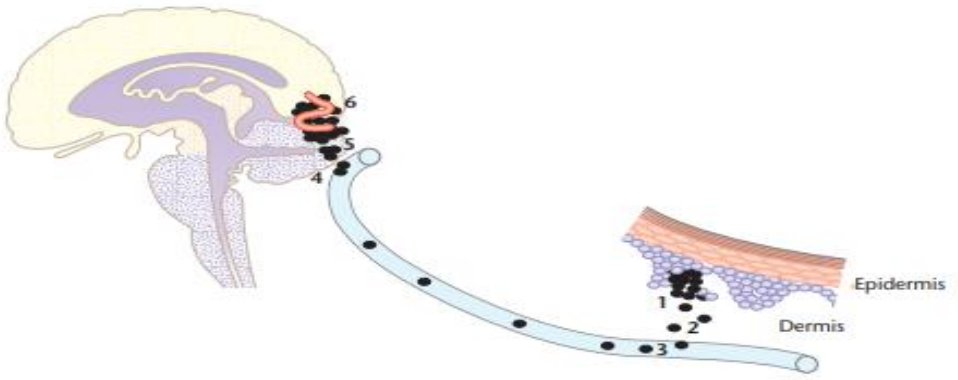


Şekil 1.2. Tümör oluşumu (Hejmadi, 2009).

Şekil 2.2’ de tümör gelişimine yol açan klonal genişleme görülmektedir. Buna göre, vücuttaki normal hücreler çoğalma ve davranışlarını düzenleyen çeşitli sinyallere maruz kalmaktayken bütün kanser çeşitleri bu sinyal kontrollerini bozmaktadır (Hejmadi, 2009).

Kanser bir anda ortaya çıkan bir hastalık değildir, premalign lezyonlarının yıllar içerisinde tekrarlayarak ortaya çıkması sonucu kötü huylu (malign) tümörün gelişmesiyle oluşmaktadır (Alison, 2001). Kanser, vücudun farklı bölümlerindeki malign tümörler (göğüs, serviks, prostat, mide, rektum, akciğer, ağız, lösemi, kemik, Hodgkin hastalığı vb.) dahil olmak üzere 100’den fazla türü olan genel bir terim olarak kullanılmakta ve dünya çapında her türden insanı etkileyen bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (WHO, 2002).

Tümörler davranışları açısından benign ya da malign olarak adlandırılmaktadır. Benign tümörler genellikle çevreleyen dokuyu işgal etmek yerine yavaş büyüyen ve çok az tehdit oluşturan tümörlerdir. Bunun yanında birçok iyi huylu tümörün malignite potansiyeli vardır ve bu tümörler malignite gelişmeden alınmalıdır (Alison, 2001).



Şekil 2.3. Malign tümör oluşumu (Alison, 2001).

Şekil 2.3'e göre, kötü huylu tümörler: (1) normal doku sınırlarının ötesine geçebilirler, (2) primer tümör kütlesinden ayrılır ve (3) vasküler veya lenfatik damarlara (4) uygun endotele yapışmadan önce ve dolaşımdan çıkmadan önce girerler. Metastazın kurulması: (5) lokal doku invazyonu ve (6) anjiyogenezin indüklenmesini gerektirir (Alison, 2001).

Kötü huylu tümörler genellikle hızla büyür, çevreleyen dokuları istila eder ve en önemlisi uzak organları kolonize eder. Tümör hücrelerinin kütleden ayrılması (primer tümör) ve primer ile kesintili bir metastaz (sekonder tümör) kurulması, malignitenin kesin göstergesidir. Ayrıca tümörler kendi kök dokusuna göre sınıflandırılır: bir lenf nodu metastazında ana dokunun tanınması şimdiye kadar teşhis edilmemiş primer tümörün yerini belirleyebilmektedir (Alison, 2001). Malign tümörlerin hafif ya da şiddetli şekilde anormalliğe doğru ilerlemesi, komşu dokulara invazyonu ve süreç sonunda vücudun diğer bölgelerine istilası ile sonuçlanmaktadır (Hejmadi, 2009). Kötü huylu tümörler yalnızca çevre dokuları istila etmekle kalmaz bunun yanında hayati olan diğer organlara da metastaz olarak bilinen süreçte kolonize edebilirler. Yaygın metastaik durum hastanın yakın bir zamanda yaşamını kaybetmesine sebebiyet vermektedir (Alison, 2001). Kanser ölümlerinin yaklaşık %90'ı metastaz sürecinin seyrine bağlı olarak gelişmektedir (Hejmadi, 2009).

Kişi vücudunda şüpheli yumru ya da belirti tespit ettikten sonra zaman kaybetmeden hastanelerin ilgili bölümlerinde muayene olmalı kanser taramasından geçmelidir. Buna paralel olacak şekilde, kanser taramaları erken asemptomatik malign tümör tanısının yanı sıra malign lezyonları da saptamak için tasarlanmış programlardır (Alison, 2001).

Dünyada son yıllarda hastalık nedenleri ciddi bir biçimde değişime uğramaktadır (Alison, 2001). Kanser de kalıtsal faktörlerden ziyade bireylerin, beslenme alışkanlıkları, hava kirliliği, sigara kullanımı gibi kanserojenik etkenlere maruz kalmaları sonucunda ortaya çıkmaktadır (WHO, 2002)

2.1.1. Kanserin etiyolojisi

Kanserin etiyolojisi konusunda birçok faktör göze çarpmaktadır. Buna göre bu faktörlerden başlıcaları ele alınmıştır.

- **Tütün ve Alkol Tüketimi**

Tütün ve alkol kullanımı başta akciğer kanseri olmak üzere, orofarenks, mide, pankreas, mesane, böbrek, larenks, ağız boşluğu, serviks gibi birçok farklı tipte kansere neden olmaktadır (Smoke ve Smoking, 2004).

Tütün kullanımı ve beslenme alışkanlıkları kansere yakalanma oranlarının yaklaşık %30 düzeylerine çıkmasına sebep olmaktadır. Ortaya çıkan bu sebepler enfeksiyon ile birleşince kanser vakasının görülme oranı mevcut durumdan %15 daha artış göstermektedir. Bu bağlamda kanser vakalarının birçoğunun tütün kullanımı ve beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle önlenebileceği düşünülmektedir (Alison, 2001).

- **Üreme Faktörleri, Endojen ve Ekzojen Hormonlar**

Üreme ile ilgili faktörler meme, endometriyum, over ve prostat kanserlerinin etyolojisiyle ilişkilidir (Boyle, 2008)

İlk menstrüasyon yaşı, ill ve son doğumun yapıldığı yaş, gebelik sayısı, menopoz yaşı kanser riskleriyle ilgilidir. Endojen cinsiyet streodilerine uzun süreli maruz kalma, menopoz sonrası kadınlarda meme ve endometriyum kanseri riskini artırmaktadır (Key ve ark., 2001).

- **Diyet, Beslenme ve Obezite**

Beslenme alışkanlıkları ve kanser arasındaki ilişki araştırmacılara göre belirli kanser türlerinin dışında diyetin kanserin çok küçük bir kısmıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Özellikle yağlı diyet, meyve, sebze yeme alışkanlıklarının kanser ve türleriyle çok az anlamlı türden ilişkisi vardır (Boyle, 2008). Bunun yanında yapılan çalışmalar obezitenin hem kadın hem de erkeklerde özofagus karsinomuyla, böbrek kanseriyle, erkeklerde ise kolon kanseriyle ilişkili olduğu saptanmıştır (Vainio ve Bianchini, 2002).

- **Fiziksel Aktivite**

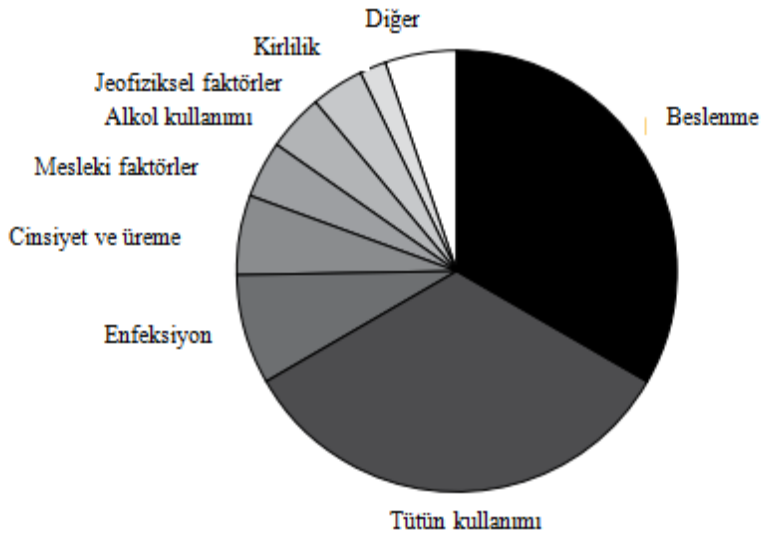
Fiziksel aktivitenin özellikle meme ve kolon kanserinden koruyucu olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Fiziksel hareketsizlik kanser gelişimi açısından risk faktörü oluşturmaktadır (Vainio ve Bianchini, 2002).

- **Radyasyon ve Çeşitleri**

Özellikle mobil telefon ve cihazların yaydığı frekanslar birçok çalışmanın konusu olmuştur. Mobil ya da cep telefonların uzun süreli ve yoğun kullanımı orta derecede glioma, parotid bezi ve tümörlerine yol açabilmektedir. Bunun yanında güneş ışığına direkt olarak maruz kalma sonucunda cilt kanseri ve skumamoz cilt kanserinin başlıca sebebi olduğu öne sürülmektedir (Cancer, 1992; Boyle, 2008).

- **Çevre Kirliliği ve Mesleki Maruz Kalma**

Richard Doll and Richard Peto 1981 yılında ABD'de kanserin nedenleri üzerine yapmış oldukları çalışmaya göre, kirlilik tüm kanser vakalarının %2'sini, jeofiziksel faktörler %3'ü, ve çevresel faktörlerin ise %80 ile %90'ını oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (Logomasini; Doll ve Peto, 1981).



Şekil 2.4. ABD'de Kanserle İlişkili Ölüm Nedenleri (Doll ve Peto, 1981).

Doll ve Peto (1981)'ya göre çevresel faktörler yalnızca kirlilikle değil aynı zamanda tütün, beslenme alışkanlıkları, kimyasal maddeye maruz kalma ve jeofizik faktörleri de içermektedir. Jeofizik faktörler, doğal ve insan yapımı radyasyon, tıbbi ilaçlar, tıbbi radyasyon ve kirliliği içermektedir (Şekil 2.4). Buna göre tütün kullanımı ile yıllık kanser ölümlerinin %30'unu beslenme seçimleri ise %35'ini oluşturmaktadır.

Bruce Ames ve Lois Swirsky Gold (1997) yapmış oldukları araştırmalarda Doll ve Peto'nun çalışmalarına paralel sonuçlara varmışlardır. Buna göre tütün kullanımının tüm kanser türlerinin yaklaşık üçte birini oluşturduğunu bunun yanı sıra meyve ve sebzenin en az tüketiminin, çok tüketenlere göre kanser insidansının iki katına çıktığı sonucuna varılmıştır.

- **Genetik Kodlar**

Kansere karşı genetik duyarlılığın nedeni, kanser gelişimine yatkınlık gösteren genlerdeki belirli dizilim değişikliklerinin kalıtım yoluyla aktarılması bu hastalık için genetik duyarlılığa sebep olmaktadır. Kansere duyarlılık oluşturan genler onkogenler, tümör baskılayıcı genler veya risk modifiye edici genlerdir (Boyle, 2008).

2.1.1.1. Kanserin epidemiyolojisi

Klasik epidemiyoloji bilimi, tütün kullanıcıları gruplarını yüksek kanser risk kategorisine almış olmasına rağmen yaşamı boyunca sigara kullanan kişilerin kansere yakalanmayabileceği düşünülmektedir. Bunun nedeni belki de potansiyel karsinojenleri metabolik olarak ele alma şekilleridir. Bununla birlikte, moleküler epidemiyoloji bilimi tütün kullanan bireyleri kansere yakalanma anlamında yüksek riskli grup kategorisine dahil etmiştir (Alison, 2001).

Kanser insidansının gelişmiş ülkelerde en yüksek olduğu gözlenmesine rağmen kanser ölümlerinin %70'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir. Bununla birlikte Türkiye gibi, gelişmekte olan ülkelerde etkisi hızlı bir biçimde artmaktadır (Angahar, 2017). Amerikan Kanser Birliği verilerine göre 2017 yılında yaklaşık 1.7 milyon kanser vakasının teşhis edileceği öngörülmektedir.

2018 dünya kanser istatistikleri küresel kanser yükünün 18,1 milyon vaka ve 9,6 milyon kanserden kaynaklı ölümün olduğunu göstermektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), dünya genelinde her 5 erkek ve her 6 kadından birinin yaşamları süresince kansere yakalanacağını tahmin etmiştir (Bray ve ark., 2018).

Türkiye kanser insidansı, dünya oranının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük hızla ilerlediği görülmektedir. Türkiye'de en çok karşılaşılan ilk 5 kanser türü dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örüntü ile benzerlik gösterdiği yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Ülkemizde erkeklerde, trakea, bronş ve akciğer kanseri kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanser türleridir (TÜİK, 2017).

Gelişmiş ülkelerde, meme kanseri, akciğer kanserinden sonra tüm ölümlerin %15,4'ünü oluşturmaktadır ve yılda 198.000 ölüm ile ilk sırada yer almaktadır. Prostat kanseri erkeklerde en sık görülen kanser türüdür (%19), bunu %14 ile akciğer kanseri ve kolorektal kanser (%9) izlemektedir. Kadınlarda ise en sık görülen tür meme kanseridir (%30), bunu %12 ile akciğer ve %8 ile kolorektal türleri takip etmektedir (Society, 2008).

TÜİK'in verilerine göre (2017), ülkemizde yaşa bağlı kanser hızı erkeklerde yüz binde 267,9 iken kadınlarda yüz binde 186,5'tir. Toplamda kanser insidansı ise yüz binde 227,2'dir.

Alison'a göre (2001), 2020'de 20 milyon kanser vakasının ortaya çıkacağı ve buna bağlı olarak 12 milyon ölüm olacağı öngörülmektedir.

2.2. Tümör Hücrelerinin Fizyolojik Oluşumu ve Çoğalması

Kanser oluşumunun önemli bir hücre döngüsü esnasında meydana gelmektedir çünkü bu döngü sırasında hücreler mutasyonlara daha elverişlidir. Hücre döngüsü, DNA sentezinin gerçekleştiği S evresi, mitoz bölünmenin izlendiği M evresi ve bu iki ana süreç arasında kalan geçici duraklama evreleri olan G1 ve G2 evreleri olmak üzere, başlıca 4 evrede gerçekleşmektedir. İnsan vücudundaki hücrelerin büyük bir kısmı G0 olarak adlandırılan istirahat evresindedir. Bu evredeki hücreler normalde bölünmezler yalnızca uygun bir uyarı geldiğinde hücre döngüsüne girerler. Örneğin, kemik iliğindeki kök hücreleri ve karaciğer hücrelerinin çoğu G0 fazında bulunan hücrelerdir buna ilaveten ileri evre tümör kitlesindeki hücrelerin büyük bir kısmı da bu grupta bulunmaktadır (Aliustaoğlu, 2009). Hücre döngüsü kontrol noktalarında değişimler kanser gelişimine neden olabilir.

Tümör baskılayıcı işlevler, DNA onarımı ve apoptoz kanser gelişiminde kritik basamaklardır. Hücre döngüsünde yer alan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar, tümör baskılayıcı genler üzerindeki etkileri ile hücreleri büyüme ve çoğalmaya yönelttikleri gibi bazen de hücrelerin ölümüne yol açabilmektedir (Prensipler, 2000; Aliustaoğlu, 2009). DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazları ve şeker molekülleri ile reaksiyona giren ya da kromozomların yapısında bulunan proteinlerle çarpraz bağlar oluşturan karsinojen ajanlara onkogenler denilmektedir. Onkogenler DNA'daki baz delesyonları, zincir kırıkları, inversiyon gibi mutasyonlara sebep olabilmektedirler. Bu mutasyonlar sonucunda DNA'nın replikasyonu, genlerin transkripsiyonu ve translokasyonu veya aktivasyonunda çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir. Onkogenler genellikle çeşitli sebeplerden yeni bir işlev ya da özellik kazanarak otozomal dominant etki gösterirler. Normalde hücre çoğalmasının kontrol mekanizması için lüzumlu olan ve herhangi bir hasara uğradıkları veya ortadan kalktıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olan ve otozomal resesiflik gösteren genlere ise tümör süpressör genleri adı verilmektedir (Aksoy, 2000; Ringer ve Schnipper, 2001).

Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonu, hücrenin kontrolsüz bir biçimde çoğalması, invazyon ve metastaz gibi malign özellikler kazanmasına sebep olmaktadır (Aksoy, 2000; Ringer ve Schnipper, 2001). Hücre

büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde oluşan mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar ise hücre döngüsünün inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olmaktadır (Aliustaoğlu, 2009).

2.3. Hücre Adezyonu

Hücrelerin birbirlerine bağlanabilme özellikleri çok hücreli organizmaların varlığını ve devamını sağlamaktadır (Anonim,tarih yok). Çok hücreli organizmalarda bulunan hücreler; büyüme, farklılaşma, çoğalma ve göç gibi olayları gerçekleştirebilmek için hücre yapışma (adezyon) molekülleri adı verilen çeşitli hücresel molekülleri kullanarak etraflarındaki komşu hücreler ile birbirlerine tutunurlar ve böylece hücrelerarası bağlantılar oluştururlar (Akkuş ve Sönmez; Sakisaka ve Takai, 2004).

Farklı dokuların bir araya toplanıp organları oluşturması hücresel moleküler ilişkiler sayesinde olmaktadır. Dokularda bulunan hücreler birbirlerine doğrudan özelleşmiş integral zar proteinleri sayesinde tutunurlar. Bu tutunmayı sağlayan integral zar proteinlerine CAM (hücre adezyon molekülleri) , diğer adıyla hücre bağlayıcı moleküller denilmektedir (Güneş, 2013).

Dokuların düzeni, adezyon molekülleri ile olan etkileşimleri ile belirlenmesinin yanı sıra hücre adezyon molekülleri (CAM) iltihaplanmaya, bağışıklığa, yaralanmalara, embriyonik gelişim süresi boyunca kesin hücre göçlerine de aracılık ederler (Yoshida-Noro ve ark., 1984; Bloom ve ark., 2002; Langdon, 2010).

CAM proteileri üç bölümden oluşmaktadır (Güneş, 2013);

1. Hücre içi bölüm: Sitoplazmadaki hücre iskelet proteinleri ile ilişki kurmaktadır.
2. Transmembran bölüm: Hücre zarında alfa sarmal şeklinde uzanmaktadır.
3. Ekstraselüler bölüm: Komşu hücrelerden uzanan CAM'lar ile bağlanırlar. Buna ek olarak hücre zarında bulunan bağlayıcı (adezyon) reseptörleri aracılığı ile ekstraselüler matriks bileşenlerinebağlanırlar.

CAM'lerin hepsi olmasa da çoğu dört gen ailesinden birine aittir (Yoshida-Noro ve ark., 1984; Langdon, 2010):

1. **Kaderinler**, kalsiyum-bağımlı adezyon moleküllerinin büyük bir ailesidir. Örneğin; epitel hücrelerde büyük ölçüde ifade edilen ve memeli embriyosunun erken gelişiminde bulunan E-kaderin (epitel-kaderin) bu ailenin bir üyesidir.

2. **İmunoglobulin (Ig) ailesi;** bu ailede önemli pek çok adezyon molekülü bulunmaktadır. Örneğin; lökositlerin endotel hücrelere yapışması, endotel hücrelerinin üzerindeki hücreler arası adezyon molekülü (ICAM) veya vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ile lökositler üzerindeki integrinler arasındaki heterofilik bağlanma ile meydana gelmektedir.

3. **Selektinler**; Karbonhidrat-Bağlı Adezyon Reseptörleri olan Selektin ailesi; L (lökosit), E (endotelyal) ve P (trombosit) selektin olmak üzere 3 üyeye sahiptir. Bu ailenin adezyon bağlantısı kalsiyuma bağımlıdır

4. **İntegrinler;** hücre-hücre ve hücre dışı matriks yapışma molekülleri ailesidir.

Hücre yapışma molekülleri, hücre etkileşimlerine aracılık etmek için hücre yüzeyinde spesifik protein-protein veya protein- karbonhidrat bağları oluşturarak işlev görürler.

Bu bilgilere ek olarak, hücre yapışma molekülleri veya reseptörleri sıklıkla, bu komplekslerin sitoskeleton ve sinyal iletim yolakları ile etkileşime girmesine izin veren sitoplazmik bazlı proteinlerle doğrudan bağlantılar oluştururlar. Bu bağlamda, hücre yapışması sadece hücreleri diğer hücrelerle ve hücre dışı matriks ile bağlamakla kalmaz, aynı zamanda dış ortamlar ve hücreler içindeki sinyal iletim yolları arasındaki iletişime yardımcı olur (Gutwein ve ark., 2000; Alahari ve ark., 2002; Langdon, 2010). Hücre adezyon molekülleri (CAM) gen ekspresyonun düzenlenmesinde, büyüme ve farklılaşmada rol oynarlar ve kanserde invazyon ve metastazın temelinde rol alırlar (Navarro ve ark., 1991; Joo ve ark., 2002; Langdon, 2010).

Tüm dokular iki bileşenden temel almaktadır bunların birincisi hücre bileşeni ve diğeri ise hücre dışı bileşenidir. Hücre dışı bileşen, ECM'yi oluşturan çeşitli uzmanlaşmış yapılardan oluşmaktadır (Anonim, tarih yok). Bununla birlikte, hücre-hücre veya hücre -hücre matrisi yapışmasına aracılık eden adezyon molekülleri iki temel yapısal sınıfa ayrılır. Birinci sınıf, çoğu zaman bir transmembran proteini olarak plazma zarına tutturulurken ikinci adezyon molekülü sınıfı, hücresel adezyonda yer alan alanları içeren hücre yüzeyi veya hücre dışı matris proteinlerinden oluşur. Neredeyse tüm matris proteinleri, fibronektin, lamininler, vitronektin, kollajenler ve diğer birçok hücre dışı proteinler, bu ikinci tür sınıfın içindedir (Langdon, 2010).

Hücrelerin birbirlerine direkt olarak hücre-hücre adezyonu ile (yapışmasıyla) bağlanabildikleri gibi hücre bağlantısı için yapısal bir çatı sağlayan hücre dışı bileşenler sayesinde de birbirlerine bağlanabilmektedirler. Bu hücre dışı bileşenlere hücre dışı matriks (extrasellular matriks- ECM)adı verilmektedir (Anonim). Hücre adezyonu ve

ECM; hücre yapısının ve işleyişinin gelişimi ve muhafazası için büyük öneme sahiptir. Matriks veya adezyon anormallikleri doku işleyişini etkiler ve insanda lökosit yapışmasında rolü olan herhangi bir molekülü kodlayan gen mutasyonu gibi özel olabilirken kansere sebebiyet veren bir değişiklik gibi hastalıklara neden olmaktadır (Anonim).

Sonuç olarak, insan vücudundaki çeşitli hücresel olayların düzenlenmesine katkı sağlayan adezyon mekanizmasının disregülasyonu tümör oluşumu ve yayılmasında (metastaz) önemli role sahiptir. Kötü huylu (malign) tümörler adezyon moleküllerinin (CAM) ekspresyonunu sağlayarak hücre yüzeyindeki adezyon moleküllerinin artışına ya da azalışına sebep olurlar. Böylece tümör hücrelerinin ana yerinden kopup yayılmalarına sebebiyet verirler (Özyörük ve Şimşek, 2003). Hücre içindeki adezyon moleküllerinin azalması kanserli hücrelerin çevresinden daha kolay bir şekilde ayrılmasını sağlar ve böylece kanser hücresinin diğer dokulara yayılması kolaylaşır (Baba ve Câtoi, 2007; Çalış, 2016) .

Bir deniz süngerinden türetilmiş doğal bir ürün olan heteroneminin lenf-endotelyal hücre bariyer yoluyla tümör hücre intravasasyonunu önleme özellikleriyle ilgili olarak in vitro test ediiği bir çalışmada heteronemin özelliklerini araştırmak için adezyon deneyleri yapılmış ve sonuç olarak heteroneminin, lenf-endotelyal hücrelerin MCF-7 hücrelerine yapışmasını azalttığı bildirilmiştir (Kopf ve ark., 2013).

Sfingozin 1-Fosfat ve reseptörlerinin meme kanseri metastazındaki rolü ile ilgili yapılmış olan başka bir çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin adezyon özellikleri kıyaslanmıştır ve sonuç olarak Sfingozin 1-Fosfat ve reseptörlerinin bu iki tür hücrenin adezyonunda yeterli bir değişikliğe uğramadığı bildirilmiştir (Çalış, 2016).

2.4. İnvazyon ve Metastaz

İnsanların DNA'larında ve kromozomlarının temel birimleri olan genlerinde meydana gelen bazı değişimler sonucunda hücreler kontrolsüz bir biçimde çoğalmaya başlar ve anormal oluşum sergilerler. Bu anormal hücrelerin kanser olarak adlandırılabilmesi için hücrelerin hücre adezyonunda azalma, invazyon (istila) ve metastaz gibi bazı malign özelliklere sahip olması gerekmektedir (Mazur ve ark., 1984; Aliustaoğlu, 2009; Yetimalar ve Çallı, 2014). Bununla birlikte metastaz oluşumu için gerekli olan bazı durumlar bulunmaktadır (Taşdemiroğlu, 2003). Bunlar;

1. Tümör hücresinin hareketli olması,
2. Tümör hücresinin çevre dokulara yapışabilme (adezyon) özelliği,
3. Tümör hücresinin invazyon yeteneği ve
4. Anjiyogenezis'tir.

İnvazyon, tümör hücrelerinin mekanik ve bağışıklık doku bariyerlerini aşarak dokuların içine girmesi olayına verilen isimdir. Doku bariyerlerinin proteinolizi kanser hücrelerinin invazyonu için gereklidir. Hücrelerdeki kontrol altında bulunan İnvazyon aslında yara iyileşmesi, organların yenilenmesi, gebelik ve fetüsün gelişimi gibi fizyolojik olaylara katkıda bulunmaktadır. Kanserde hücrelerinde ise kontrol mekanizması yok olmuş veya çok zayıflamış olacağından kanser hücreleri dokulardan gelen sinyallere ihtiyaç duymadan kendi otokrin sinyalleri ile invazyona sınırsızca devam ederler. İnvazyonun oluşması için ilk olarak tümör hücrelerinin bazal membrana adezyonu geçekleşmelidir ve daha sonra da bazal membranin enzimlerle eritilerek tümör doku içine geçişişi sağlanmış olmalıdır. Bu olay gerçekleşirken tümör hücreleri doku yıkıcı enzimleri (matrix metalloproteinazlar) salgılar. Bu enzimler jelatin ve kollajenin yıkımına sebep olurlar. Ancak dokularda da bu enzimlerin inhibasyonunu sağlayan faktörler (Tissue inhibitors of metalloproteinases- TIMPs) bulunmaktadır. Tümör hücresinin dokuya invazyonu bu iki sistemin etkileşimi sonucu olusur. Doku invazyonunun inhibisyonu anjiyogenezisi de durdurur. Metastazin olusmasi için invazyona ek olarak, tümör hücrelerinin çoğalmasi ve anji yogenezis (yeni damarlarin olusumu) gerekmektedir (Taşdemiroğlu, 2003).

Metastaz; malign tümörlerin, bulunduğu hücrelerden vücudun en uzak bölgelerindeki hücrelere yayılarak lokal ve sistemik bağışıklık faktörlerine rağmen burada yeni hücre kolonileri oluşturmasına denilmektedir (Taşdemiroğlu, 2003; Group, 2005). Metastazla ilgili temel olarak iki teori öne sürülmüştür (Taşdemiroğlu, 2003):

1. Ewing'in Mekanik Teorisi: Tümör metastazları, metastaz görülen organın hemodinamiğii ve damarsal anatomik özelliğine bağlıdır (Ewing, 1928). Esasen, tümör hücrelerinin kan damarlarını ve özellikle de kapillerleri tıkaması sonucu uzak organa yerleşmesi ve çoğalmaya başlaması teorisidir (Ewing, 1928; Taşdemiroğlu, 2003). Ewing aslında, birincil (primer) tümör ile spesifik organ arasındaki dolaşım şeklinin, organa özgü metastatik yayılımların birçoğunu açıklamada yeterli olduğunu savunmuştur (Ewing, 1928; Eichler ve ark., 2011; Göksu ve Kazan, 2017).

2. Paget'in Toprak ve Tohum Teorisi: Organın öz yapısı metastaz oluşumuna karar vermektedir. Yani eğer bulunduğu organ tümör hücresinin beslenmesine ve bölünüp çoğalmasına uygun bir ortam sağlamışsa bu tümör organa yerleşerek metastaz yapmış olur (Paget, 1889; Taşdemiroğlu, 2003). Paget (1889) kanser hücresini tohum (seed) olarak, kanser hücresinin yayıldığı organı ise toprak (soil) olarak tanımlamıştır.

Bu hipotezlere ek olarak son zamanlarda; kanser hücrelerinin temel tümör alanından aktive fibroblastlar gibi kendi stromal içeriklerini (soil) metastaz yaptıkları bölgeye beraberinde getirdiklerine dair bir hipotez ortaya atılmıştır (Eichler ve ark., 2011; Göksu ve Kazan, 2017).

Malign tümör hücrelerinin metastaz yapmaları genetik yeniden programlanma sonrasında başlayarak, önce lokal invazyon yapar ve sonrasında ise tümör vasküler yatağa ulaşarak ve uzak noktalara gider ve metastaz yapar (Göksu ve Kazan, 2017).

Kanserin sebep olduğu ölümlerin en büyük nedeni haline gelen tümör gelişimi ve metastaz, çeşitli biyolojik süreçleri de içinde barındırmaktadır. Hücreler arası yapışmanın (adezyon) azalması, hücre ile hücre dışı matrisin etkileşimleri, ekstrasellular matriksin degredasyona uğraması gibi çeşitli hücresel olaylar tümörün lenf ve kan damarları yoluyla yayılması İnvazyon ve metastaz için önemli basamaklardır (Salo ve ark., 1994).

Metastaz süreci tümör öncelikle tümör hücrelerinin birincil kitleden ayrılıp komşu dokulara istilası (invazyonu) başlar ve çeşitli aşamalardan geçer. Temelde metastaz süreci iki aşamada gerçekleşmektedir; birincisi, intravazasyon, diseminasyon ve ekstravazasyon aşamalarını kapsayan migrasyon aşaması ve ikinci ise kolonizasyon aşamasıdır (Svokos ve ark., 2014; Göksu ve Kazan, 2017).

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm, hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanması olarak tanımlanır. Bu sayede hücreler invazyon ve göç yeteneği kazanırlar (Singh ve Settleman, 2010). Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGFβ), EMD'nin en önemli destekçisidir (Otranto ve ark., 2012). Reseptör tirozin kinazlar ve Wnt/βkatenin sinyal yolağı ise epitelyal-mezenkimal dönüşümün önemli yolakları olarak bilinmektedir. Tümör mikro çevresindeki makrofajlar ve tümör ilişkili fibroblastlar ise hem matris metalloproteinazlar salgılayarak hem de kanser hücrelerinde EMD'ye aracılık eden bu yolakları aktive ederek invazyon ve metastaza katkıda sağlamaktadırlar (Ersöz ve ark., 2016). Metastaz süresince malign tümörler birbirleriyle temas edemez, düzenleri bozulur ve tümör kitlesinden kolaylıkla kopabilecek hale gelirler. İnvaziv tümörlerin katenin ve E-kaderin genlerinde mutasyon olduğu

belirlenmiştir. E-kaderin, promoter DNA hipermetilasyonu ile ekspresyonun bozulması ya da tamamen ortadan kalkması, çoğu metastatik kanserde sıklıkla karşılaşılan bir bulgudur (Göksu ve Kazan, 2017).

Pek çok tümör çeşidi organa spesifik bir yayılım şekli göstermektedir. Örneğin; prostat kanserleri genelde önce kemiğe, sonra melanom, akciğer, karaciğer ve beyine yayılım gösterirler (Eichler ve ark., 2011; Göksu ve Kazan, 2017).

Meme kanseri ise sıklıkla akciğer, karaciğer, kemik ve beyin gibi organlara metastaz yapmaktadır. Meme kanseri metastazı genelde ilk 2 yılda görülmektedir. Tedavi sonrası ilk 5 yıl hastalıksız sağ kalan hastaların %90'ında sonraki 5 yıl içinde, %80'inde ise sonraki 10 yıl içerisinde nüks gelişmeyeceği düşünülmektedir (Ustaalioglu ve ark., 2009; Yetimalar ve Çallı, 2014).

Manoj ve ark. (2012) 'nın yapmış olduğu bir çalışmada yapraklı karayosunu familyasından *Leucobryum bowringii* Mitt ekstraktlarının konsantrasyona bağlı bir şekilde MCF 7 hücrelerinin adezyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği ve aynı zamanda bu bitkinin metanol ekstraktının su ekstraktından daha fazla meme karsinomu invazyonunu inhibe ettiği ve anti-metastatik etki gösterdiği bildirilmiştir (Manoj ve ark., 2012)

Avcı (2015)'nın Juglonun BxPC-3 pankreas kanseri hücrelerindeki adezyon ve invazyon özellikleri ile yapmış olduğu bir araştırmada ise farklı konsantrasyonlarda uygulanan Juglonun pankreas kanseri üzerinde adezyon ve invazyon özelliklerinin doza bağlı şekilde azaldığı gösterilmiştir.

Yenidünya ekstraktının meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattının adezyon, migrasyon ve invazyon aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada adezyon ve migrasyonun, yenidünya özleri tarafından doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde inhibe edildiği aynı zamanda doza bağımlı bir şekilde meme kanseri hücrelerinin invazyonunu da engellediği ve yaprak ekstraktının tohum ekstraktından daha etkili olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2009).

Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan metformininin MCF-7 hücre hattı üzerindeki antproliferatif ve metastaza olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada,metformininin meme kanseri invazyon yolağında görevli olan bazı proteinlerin ekspresyonlarında azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (Beşli, 2018).

Endometriyum kanserinde D vitamininin hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerine olan etkisinin gerçek zamanlı hücre analiz modeli ile araştırıldığı bir çalışmada D vitamininin proliferasyon, migrasyon ve invazyon üzerine etkileri ile ilgili daha fazla çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Duman, 2018).

2.5. Apoptoz

Apoptoz, mitozun karşıt anlamlısı olarak 1972 yılında Kerr tarafından tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972; Kaya ve ark., 2012). Apoptosiz veya apoptoz terimi, eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Öniz, 2004). Apoptozis ya da Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün temel tiplerindendir ve organizmadaki yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerden kurtulmanın bir yoludur. Bir tür hücre ölüm çeşidi olan nekrozdan farklı olarak apoptoz belirli moleküler işlemlerin ardından hücrenin ölümüne neden olur bu döngü organizma için gereklidir (Kaya ve ark., 2012).

İnsan vücudu sürekli bir denge halindedir. Bir yandan yeni hücreler sentezlenirken diğer taraftan var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölüm yolu ile yok edilmektedir bu sayede de denge korunmaktadır. Hücre ölümü iki şekilde gerçekleşmektedir (Hara ve Snyder, 2007).

1. Nekroz (Hasar yoluyla ölüm): Travmatik hücre ölümü olan nekroz organizmanın oksijensiz kalması, toksinlere maruz kalması gibi çeşitli etmenlerden meydana gelen hücre ölümüdür (Kaya ve ark., 2012).

2. Apoptoz (Programlı hücre ölümü): Hücrelerin kendine özgü mekanizmaları ile programlı bir şekilde olan hücre ölümüdür (Kaya ve ark., 2012).

Tablo 2.1. Apoptozis ve Nekroz arasındaki farklar (Öktem ve ark., 2001) .

Tablo 1: Apoptozis ile nekroz arasındaki farklar

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik / patolojik
Eksüdatif yangı	Genellikle var	Yok, ± hücresel immünitede
Işık mikroskopi	Bazofili, piknoz karyoreksis, karyolizis,	Kresentik görünüm eozinofilik partikül
Elektron mikroskopi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik hücreler ve komşu
Mekanizma	Kimyasal ya da yapısal parçalanma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücresel yıkım

Apoptoz, embriyogenez sırasında da meydana gelmektedir, bu hücrelerde belirli hücreler *programlanır* bu nedenle, *programlanmış hücre ölümü* terimi de bu süreci tanımlamak için kullanılmaktadır (Joaquín H Patarroyo S., 2013).

Apoptoz günümüzde; ölümcül sürecin (apoptotik, nekrotik, otofajik veya mitoz ile ilişkili) morfolojik görünümüne, enzimolojik kriterlerine (nükleazların bulunup bulunmamasına veya kaspazlar veya katepsinler gibi farklı proteazların belirgin bir biçimde sınıflandırılmasına), fonksiyonel (programlanmış veya tesadüfi, fizyolojik veya patolojik) veya immünolojik özelliklerine (immünojenik veya non-immünojenik) göre sınıflandırılabilmektedir (Galluzzi ve ark., 2012).

Çok hücreli canlıların normal ve düzgün gelişebilmeleri, seçilen bazı hücrelerin apoptozla ölmesine bağlıdır bu nedenle apoptoz çok hücreli canlıların yaşam döngüsü için gereklidir (Akşit ve Bildik, 2008). Örneğin, insan embriyosunun el parmakları arasındaki perdelerde bulunan hücrelerin apoptozla ölerek kaybolduğu düşünülmektedir (McPhie ve ark., 2003).

Apoptoz sinyalleri alan hücrelerde hücrenin kendi kendini yok etmesi için bazı metabolik ve fizyolojik işlemler başlatılmaktadır. Bunlara ek olarak, apoptoz ve nekroz arasındaki farklar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

2.5.1. Apoptozun düzenlenmesi

Programlanmış hücre ölümü (apoptoz) süreci genellikle farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilmektedir. Apoptoz, normal hücre döngüsünde, bağışıklık sisteminin uygun gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Bu mekanizmaların dışında gelişen uygunsuz apoptoz, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü dahil olmak üzere birçok hastalık faktörü olarak kabul edilmektedir (Elmore, 2007).

Ayrıca, apoptotik süreç genel olarak kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlarla düzenlenmektedir. Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler Tablo 2.2'de detaylı olarak gösterilmiştir. Apoptoz boyunca hücre içine sürekli endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda ve hücre iskeleti düzenlenmesine katılan kalsiyum girişi olmaktadır (Coşkun ve Özgür, 2011).

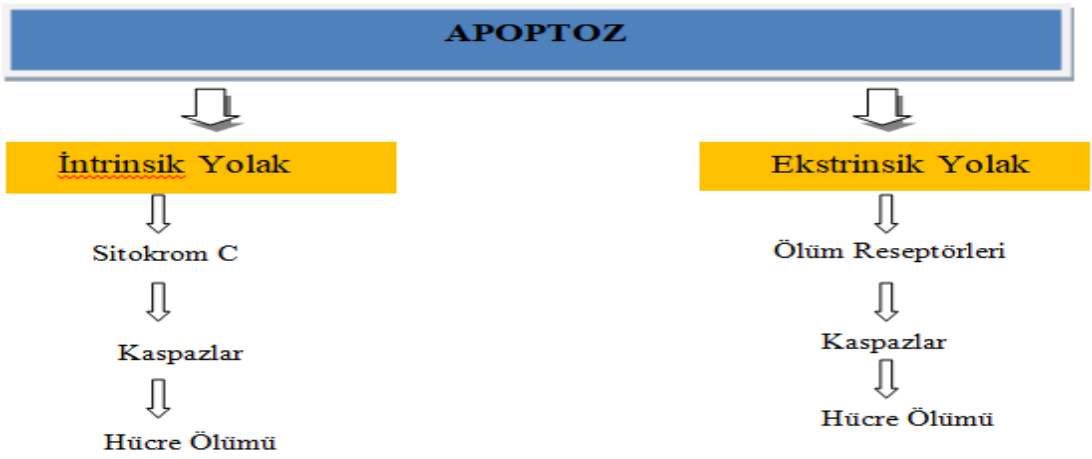
Tablo 3.2. Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler (Öktem ve ark., 2001)

APOPTOZİS VE GENLER	
Apoptozisi baskılayan genler	**Apoptozisi indükleyen genler**
Bcl-2 grubundan; BHRL -1 • bcl-xl, • bcl-w, • bfl-1, • brag-1, • mcl-1, • A1	Bcl-2 grubundan; • Bad, • Bax, • Bak, • Bcl-Xs, • bad, • bik, • Hrk 1
ç-abl geni FADD/MORT, RIP, FAST	ç-my
ras onkogeni	p53,p21
çözünebilir fas, fas (CD95/APO1)	fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST
p35,	Interlökin dönüştürücü enzim benzeri Proteinler (İCE)
A20	LOH (MTS1/CDK41)

2.5.2. Apoptoz yolakları

Apoptoz, genetik olarak önceden belirlenmiş bir dizi moleküler yolla ortaya çıkabilen bir mekanizmadır ve farklı yolaklar ile belirlenir. Bunlardan en belirgin olan iki ana yolak ekstrinsik ve intrinsik yolaklarıdır (Joaquín H Patarroyo S., 2013). Apoptoz yolakları Tablo 2.3'de gösterilmiştir. Bu yolaklar kaspazların dahil olup olmamasına göre ayırt edilmektedir. Buna ek olarak mitokondri farklı apoptoz yolağına bağlanabilir (Hongmei, 2012).

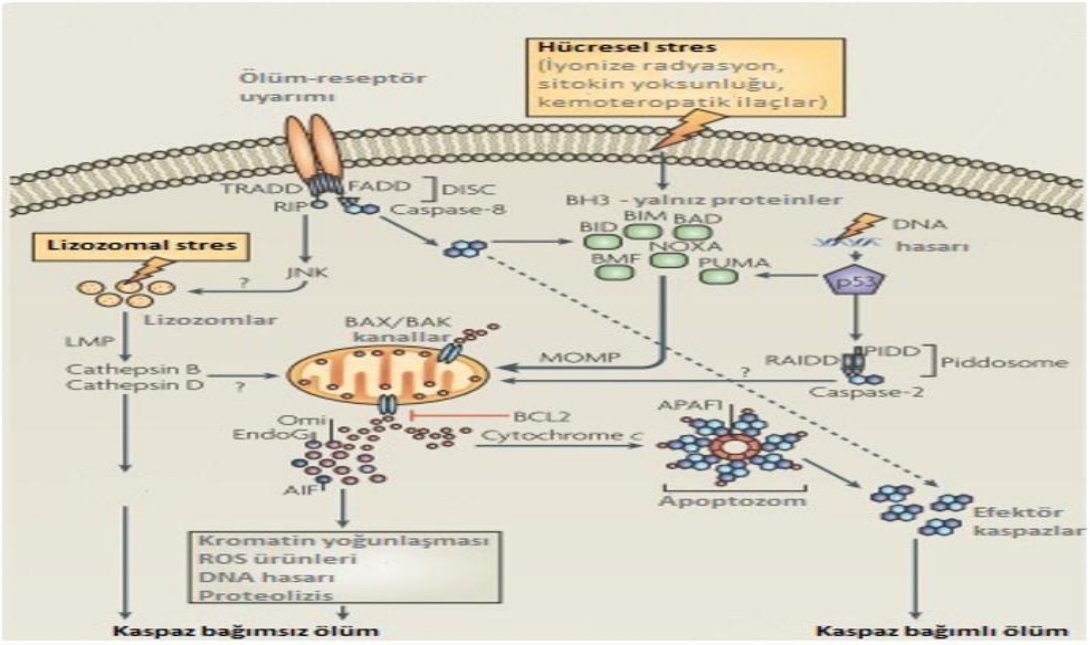
Tablo 2.3. Apoptoz Yolakları



Kaspaza bağımlı apoptoz; klasik programlanmış hücre ölüm yoludur ve bu tip apoptoz yoluna kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-12, kaspaz-7, kaspaz-3 kaskadı katılır. Bu çeşit apoptoz yolağında TNF-alfa reseptörü, FasL reseptörü, TLR, Ölüm reseptörü ve benzeri gibi reseptörler rol almaktadır (Hongmei, 2012).

Ölüm reseptör yolu veya sitoplazmik yol olarak da bilinen ekstrinsik yolakta, apoptoz, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü-1'nün bir ailesi olan, CD95 / Fas (CD95L / FasL reseptörü) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörleri-1 ve -2 (TRAIL-R1 /2) dahil olmak üzere hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin ligandla başlatılan aktivasyonu ile tetiklenmektedir (Joaquín H Patarroyo S., 2013).

Mitokondriyal yol olarak da adlandırılan intrinsik yolakta, apoptoz, mitokondriyal geçirgenliğin çok önemli rol oynadığı hücre içi bir olay zincirinden kaynaklanmaktadır ve bu yolak mitokondriden sitokrom-c salınımı ve ölüm sinyalinin aktifleşmesi ile tetiklenir (Ghobrial ve ark., 2005; Degterev ve Yuan, 2008). Sonuç olarak her iki yolak da bir noktada (Şekil 2.5) birleşerek hücre ölümüyle sonuçlanan, düzenleyici ve yapısal molekülleri bölen kaspazların aktivasyonunu içeren son ortak bir yolakta birleşmektedirler (Ghobrial ve ark., 2005).

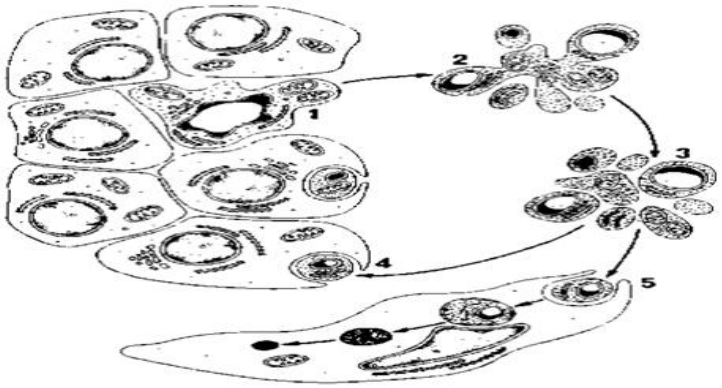


Şekil 2.5. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları (Maiuri ve ark., 2007).

İn vitro çalışmalar, tüm hayvan hücrelerinin apoptoza girmek için gerekli olan proteinleri yapısal olarak ifade ettiğine dair kanıtlar göstermiştir (Lockshin ve Williams, 1965; Lockshin ve Zakeri, 2001).

2.5.3. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları

Apoptoz ekstrinsik veya intrinsik yolaklardan gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden moleküler olaylar zinciridir ve hücrenin fagositozu ile son bulmaktadır (Öztürk, 2002).



Şekil 2.6. Apoptoz Evreleri

Şekil 2.6'da gösterilen, 1 numaralı alan normal hücrelerle çevrilmiş olan apoptotik hücreleri göstermektedir. Erken apoptoz, genel hücre yoğunlaşmasına ve apoptotik hücrelerin komşu hücrelerden ve dokulardan ayrılması ile karakterizedir. 2 numaralı kısma gelince bu aşamada nükleus öğeleri, geniş hücre çıkıntıları oluşturarak farklı bileşimlerde ve ebatlarda membranla sınırlı apoptotik cisimcikleri oluşturmasını göstermektedir. Şeklin 3,4 ve 5.'i kısmı ise, in vivo olarak oluşturulan apoptotik cisimler, epitelyal hücreler tarafından oluşturulan fagositozu göstermektedir (Sluyser, 2002).

Bu bağlamda; erken apoptoz aşamasında, hücreler birleşme bölgelerinden ayrılarak özelleşmiş yüzey organellerini ve hacimlerinin yaklaşık 1/3'ünü kaybederek büzülürler. Bu görünümün, plazma zarındaki iyon kanallarının aktivasyonun bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Wijsman ve ark., 1993; Akşit ve Bildik, 2008). Apoptotik hücrelerden alınan kesitler ışık mikroskobunda incelendiği zaman, hücrelerin etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir (Öktem ve ark., 2001). Bu aşama sonrasında da plazma zarında tomurcuklanmalar meydana gelir ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır (Akşit ve Bildik, 2008). En sonunda ise oluşan apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınarak fagositozu uyarır ve apoptoz süreci tamamlanmış olur (Bar-Dayan ve ark., 2000).

Özetle, morfolojik olarak apoptoz geçiren hücreler nükleer / sitoplazmik yoğunlaşma ve membran çıkıntıları göstermektedir. Bu ilk değişiklikleri, nükleer bileşenlerin parçalanması ve bu fragmanların bitişik hücreler tarafından hızlı bir şekilde tüketilen apoptotik cisimler içinde kapsüllenmesi izlemektedir (Kerr ve ark., 1972).

2.5.4. Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apoptozun belirlenmesinde, Morfolojik Görünteleme Yöntemleri, İmmünohistokimyasal yöntemler ve Biyokimyasal yöntemler olmak üzere 3 temel metod kullanılmaktadır. Bu metdolar kendi içinde farklı yöntemlere ayrılmaktadır:

Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1. Işık Mikroskobu
2. Hemotoksilen Boyama

3. Giemsa Boyama
4. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop
5. Propidium İyodür(PI)
6. Hoechst Dye
7. Elektron Mikroskobu
8. Faz Kontrast Mikroskobu

İmmunohistokimyasal yöntemler

1. Anneksin V Yöntemi
2. TUNEL Yöntemi
3. M30 Yöntemi
4. Kaspaz-3 Yöntemi

Biyokimyasal yöntemler

1. Agaroz Jel Elektroforezi - DNA fragmentasyonu
2. Western Blotlama

2.6. Meme Kanseri

Meme kanserinin ortaya çıkması memedeki hücrelerin kontrolden çıkmasıyla gerçekleşmektedir. Kontrolden çıkan hücreler genellikle röntgende görülebilen bir yumru ya da tümör oluşturabilir. Bu hücreler etrafındaki dokulara yayılırsa metastaz gerçekleşir. Birçok meme kanseri türü memede yumruya yol açabileceği gibi birçoğu da herhangi bir belirti vermeyip mamografi taramalarında kendini göstermektedir. Ayrıca memede görülen yumruların çoğu iyi huylu olup anormal büyüme göstermemekte ve yayılmamaktadırlar (Smith ve ark., 2017).

2.6.1. Meme kanseri belirtileri

Meme kanseri heterojen ve ilerleyici bir hastalıktır ve erken teşhis kanser araştırmalarında çok önemli konulardan birisidir. Birçok meme kanseri türü erken teşhis edildiği takdirde ölüm oranı büyük ölçüde azaltılabilir. Günümüzde meme kanserini

erken teşhis etme adına herhangi bir belirteç bulunmamaktadır (Marić ve ark., 2011). Ancak çeşitli tip ve yapıda tümör belirteçleri bulunmaktadır. Bu belirteçler, hormonlar, enzimler, glikoproteinler, onkofetal antijenler ve reseptörler gibi farklı fonksiyonel protein alt gruplarını içermektedir. Ayrıca genetik mutasyonlar, amplifikasyonlar veya translokasyonlar ve mikrodizi ile genleşmiş profillerdeki (genetik imzalar) değişiklikler gibi tümörlerdeki başka değişiklikler de tümör belirteçlerinin formlarıdır (Kulasingam ve Diamandis, 2008). Kanser biyobelirteçleri DNA, mRNA, proteinler, metabolitler veya apoptoz, anjiyogenez veya proliferasyon gibi işlemler olabilmektedir (Hayes ve ark., 1996).

Meme kanseri teşhisi konulan hastalıkların izlenimi için en yaygın kullanılan serum belirteçleri CA 15-3 ve CEA olup, diğer klinik parametrelerle birlikte klinik öneme sahiptirler. Meme kanserinde en yararlı ve klinik olarak önemli doku bazlı belirteçler, hormonal tedavi için temel olarak kullanılan östrojen ve progesteron reseptörleri ve HER-2 reseptörleridir. Meme kanseri için yeni veya potansiyel olarak yeni belirteçler, kalıtsal meme kanseri geliştirme riski yüksek olan hastaları seçmek için BRCA1 ve BRCA2 genlerini içermektedir (Marić ve ark., 2011).

2.6.2. Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması

Histolojik olarak benzer tümörler farklı prognozlara sahip olabilmekte ve uygulanan tedaviye farklı şekilde yanıt verebilmektedir. Klinik davranışlardaki bu farklılıklar histolojik olarak benzer tümörler arasındaki moleküler farklılıklardan kaynaklandığına inanılmaktadır. Meme kanserinin de kendisine özgü klinik, histopatolojik, farklı fenotip ve moleküler görüntüye sahip heterojen bir hastalık olduğu son yıllarda yapılmış olan mikro-array tabanlı gen ekspresyonu çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Rouzier ve ark., 2005; Çapanoğlu ve Bakar, 2018).

Meme kanserinin moleküler sınıflandırılması, ilk olarak 2000 yılında ekspresyon farklılıklarına dayanan kapsamlı bir araştırmayla Perou ve Sorlie (2000) tarafından önerilmiştir (Eliyatkın ve ark., 2015). Perou ve Sorlie (2000)'nin yapmış olduğu gen ekspresyonuna dayanan çok sayıda çalışma ile meme kanserleri "Lüminal", "HER-2 pozitif ve " bazal "olmak üzere 3 alt grupa bölünmüştür (Perou ve ark., 2000). Bunlara ek olarak ayrıca normal benzeri altgrup da tanımlanmıştır. Böyle moleküler alttipler çok sayıda intrinsik genlerin (aynı tümörün tekrarlanan örneklerinde çok az miktarda farklılık gösteren fakat farklı tümörlerde çok yüksek oranda farklılık gösteren)

ayrımlaşmasıyla ve bunun sonrasında hastaların, transkripsiyonel olarak belli bir düzende gruplandırılmasıyla oluşturulmaktadır (Perou ve ark., 2000; Eliyatkın ve ark., 2015).

Kısaca, meme kanserinin moleküler sınıflandırması temel olarak insan tümörlerinin gen ekspresyon profillerine dayanılarak açıklanmıştır. Transkripsiyonel programlarda varyasyon, insan hücrelerinin ve tümörlerin biyolojik çeşitliliğinin birçoğunu oluşturmaktadır. Her bir hücrede düzenleyici sistemler ve sinyal iletimi, hücrenin kimliğinden çevresel durumuna kadar pek çok bilgiyi iletmekte ve böylece genomdaki her genin ekspresyon seviyesini kontrol etmektedir (Perou ve ark., 2000).
Perou ve arkadaşları (2000) tamamlayıcı DNA mikrodizilerini kullanarak, gen ekspresyonu paternlerindeki varyasyonu karakterize etmişlerdir ve bu sayede gen ekspresyon profillerine dayanan yeni bir meme kanseri sınıflandırması tanımlanmıştır (Perou ve ark., 2000).

Roizer ve arkadaşları (2005) ise yapmış olduğu bir araştırmada meme kanserinin luminal, bazal benzeri, normal benzeri ve erbB2 + altgruplarını belirlenmiş ve bu kanserin farklı prognozları olduğunu göstermişlerdir (Rouzier ve ark., 2005). Bununla birlikte, Tip I IGFreseptörü, benign meme hastalığında ve insan meme kanseri hücrelerinde yaygın bir şekilde eksprese edildiği bildirilmiştir (Foekens ve ark., 1986).
Bu bağlamda meme kanserleri, ilk olarak lüminal A, lüminal B, HER-2, bazal ve normal meme benzeri olmak üzere beş gruba ayrılarak sınıflandırılmıştır (Eliyatkın ve ark., 2015). Çeşitli çalışmalar DNA mikroarray teknolojisi, bu tür moleküler farklılıkları ortaya çıkarmak için ideal olduğunu göstermektedir (Rouzier ve ark., 2005).

2.6.3. Meme kanseri epidemiyolojisi

Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en çok tanı konulan ve kanserden kaynaklanan ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Torre ve ark., 2015) .
Dünyada 70 yaş altı ölüm oranlarına bakıldığında öncelikli nedenlerin %60'ı kronik hastalıklardan kaynaklanmakta olup, birinci sırada kardiyovasküler hastalıklar ikinci sırada ise kanser yer almaktadır (Keskinkılıç ve ark., 2016).
Meme kanseri tüm dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türü olmasının yanında diğer kanser türlerinden daha çok hayatta kalma oranına sahiptir (Sharif ve ark., 2010; Knobf ve ark., 2012; Koch ve ark., 2013).

Meme kanseri tanısı ya asemptomik dönemde yapılan erken tanı taramalarıyla ya da en çok görülen ağrısız el ile kontrol edildiğinde belirti veren tetkiklerle doğrulanır. Meme derisinin kalınlaşması, ödem, portakal kabuğu görünümü, meme ucunda çekilme, renk değişikliği ve akıntı gibi birçok şekilde belirtiler vermektedir (Yarış ve ark., 2014).

Son yıllarda yapılan araştırmalar meme kanserinin tek bir hastalıktan ziyade memenin epitel hücrelerinden kaynaklanan bir dizi farklı tümör olduğunu ortaya koymuştur (Done, 2011). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri %55 oranında görülmekteyken kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülmektedir (Khatib, 2006; ACS, 2019). Meme kanseri gelişmekte olan ülkelerde tüm ölümlerin %14,3'ü ile kadınlarda ilk sırada gelen ölüm nedenidir (Ly ve ark., 2011). Meme kanseri açısından dünya istatistiklerine bakıldığında her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmaktadır (Worldwide, 2005). Türkiye'de ise 2013 yılında 174 bin kişiye meme kanseri teşhisi konulmuştur (TÜİK, 2017).

2.6.4. Meme Kanseri Etiyolojik Bilgiler

Meme kanserini genetik, hormonlar, çevre, sosyobiyoloji ve fizyoloji gibi birbiriyle ilişkili çeşitli faktörler etkileyebilmektedir. Buna ek olarak bir gurup meme kanseri hastasının % 70'inde hiçbir risk faktörü belirlenememiştir (Khatib, 2006).

Sosyoekonomik durum

Sosyoekonomik durumun meme kanseri üzerindeki etkisi için yapılmış olan çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar sosyoekonomik düzey ile meme kanserinin ilişkisi olmadığını gösterirken başka çalışmalar sosyoekonomik ve eğitim düzeyinin artmasıyla meme kanseri risk faktörlerinin de artış gösterdiğini bulmuştur. Yapılmış olan başka bir çalışmada ise ev kadınlarının(%70) meme kanserine yakalanma oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir (Çakır ve ark., 2016).

Yaş

İlerleyen yaşla meme kanseri görülme oranı arasında doğru orantı bulunmaktadır. 35 yaş ve üzerindeki kadınların meme kanserine yakalanma oranı

diğerlerine göre daha yüksektir (Çakır ve ark., 2016). Meme kanseri en çok 40 ila 59 yaş aralığındaki kadınlarda teşhis edilmektedir(Morgan ve ark., 1998).

Aile Öyküsü

Ailede meme kanseri öyküsünün bulunması meme kanseri için yeterli bir risk faktörü oluşturmamaktadır (Çakır ve ark., 2016). Yapılmış olan bir çalışmaya göre ise ailesel meme kanseri öyküsü birinci meme kanseri görülme riskini önemli ölçüde artırmaktadır (Cancer, 2001). Yapılmış olan çalışmalar, menopoz öncesi dönemde ailede meme kanseri öyküsü bulunan kadınların bulunmayanlara göre üç kat daha fazla risk altında olduğunu göstermiştir. Ailede meme kanseri öyküsü olan vakaların %5 ile %10'u otozomal genlerin kalıtımına atfedilmektedir. Birden fazla etkilenmiş akraba bulunması, genetik kalıtım olasılığını ve genç yaşta hastalığa yakalanma riskini arttırmaktadır (Khatib, 2006).

Adet Görme Yaşı ve Menopoz

Kadınlardaki meme kanseri oluşumunun hormonal etkileri uzun süre östrojene maruz kalınması ile tanımlanmaktadır. Meme kanser hücreleri tarafından salgılanan büyüme faktörleri (EGF, FGF, PDGF)' nin oluşumu östrojene bağlıdır(Kuzey, 2007). 12 yaş öncesi adet ve geç menepoz meme kanseri riskini artırmaktadır(Courtney, 2004). Buna ek olarak emzirme meme kanseri riskinin azaltmaktadır ayrıca az emzirme veya doğurmama meme kanseri riskini artırmaktadır (Çakır ve ark., 2016).

Tütün ve Alkol Kullanımı

Sigara ve alkol kullanımı meme kanseriyle ilişkilendirilmiş olup bu hastalığa yakalanma riskini arttırdığı bilinmektedir (Çakır ve ark., 2016).

2.7. MCF-7 Hücre Hattı ve Tarihçesi

Hücre hatları, kanser araştırmalarının moleküler tanısı için temel bir unsur gibi görünmektedir çünkü hücre hatlarının; neredeyse sınırsız bir şekilde kendi kendini kopyalama öz kaynağını kullanma ve temsil etme gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Ayrıca, yüksek derecede homojenite göstermekte ve kontaminasyon nedeniyle

kaybolursa donmuş stoklardan kolayca değiştirilme imkanı sağlamaktadır (Burdall ve ark., 2003; Comşa ve ark., 2015).

Bu bağlamda, meme kanserinde MCF-7 hücre hattı, değişen nükleer reseptör ekspresyon seviyeleri ile birlikte östrojen reseptörü (ER) + tümörlerin sınıflandırılmasında ve birçok alt klonun araştırılmasında yaygın olarak kullanıldığından çok önemli bir adayı temsil etmektedir (Sweeney ve ark., 2012).

MCF-7 hücre hattı ilk olarak 1973'te Michigan Cancer Foundation'da Soule ve arkadaşlarının (1973) yapmış olduğu bir çalışmada 69 yaşındaki metastatik meme kanserli bir kadından alınan bir plevral efüzyondan elde edilmiştir ve o zamandan beri dünya genelinde laboratuvarlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Soule ve arkadaşları (1973) bölgesel nüksetmeler için hastaya 3 yıl boyunca radyoterapi ve hormon tedavisi uygulamışlardır.

Soule ve ark. (1973)'nın bu çalışmasında; tamoksifen uygulanmadan önceki günlerde, hasta muhtemelen yüksek dozlarda sentetik estrojen ve dietilstilbestrol ile tedavi edilerek tümörün hormona duyarlı olduğunu kanıtlamak için beklenenden daha uzun süre kontrol edilmiştir. Sonuç olarak hastalığın hormona duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır, ortalama 1 yıllık sürede beklenenden üç kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yaygın nodüler tekrarlama olaylarından iki ay sonra, 1970 yılının haziran ayında, laboratuvar çalışmaları için plevral efüzyondan örnekler alınmıştır ve MCF-7 hücrelerinin insan kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır ve sitogenetik çalışmalar, 88 kromozomun kök hücre hattı olduğunu göstermiştir (Levenson ve Jordan, 1997; Comşa ve ark., 2015).

Dr. Sam Brooks (1973) tarafından yapılan MCF-7 hücrelerinde $ER^{3'}$ün hem Scatchard hem de sukroz yoğunluğu eğilim analizi ile tanımlanması meme kanseri için çok önemli bir keşif olmuştur (Brooks ve ark., 1973). Dr. Marc Lippman (1975) antiöstrojen tamoksifeninin MCF-7 hücrelerinin büyümesini sınırlandırdığını göstermiştir ve bu sayede ilaç, östrojen etkisinin rekabetçi bir inhibitörü olarak sınıflandırılmıştır ancak yüksek konsantrasyonlarda tamoxifenin hücreleri öldürdüğü saptanmıştır (Lippman ve Bolan, 1975; Levenson ve Jordan, 1997; Comşa ve ark., 2015). Daha sonra yapılan çalışmalar MCF-7 hücrelerini kullanarak tamoksifenin hücre döngüsünün G1 fazında tersinir bir blok oluşturduğunu göstermiştir (Sutherland ve ark., 1983a; Sutherland ve ark., 1983b).

Bunlara ek olarak, birçok farklı araştırmacı grubu tarafından kullanılan MCF-7 hücre hattı arasında yaygın heterojenlik bulunması, mekanizmaların sürekli fenotipik

çeşitliliği üretmek için çoğalan MCF-7 popülasyonları içinde çalışabileceğini göstermektedir (Baguley ve Leung, 2011).

MCF-7 hücreleri en yaygın kullanılan östrojen (ER) pozitif meme kanseri modelidir (Soule ve ark., 1973; Nugoli ve ark., 2003). MCF-7 hücreleri, östrojen (ER) pozitif meme kanseri hücre deneyleri için yapılan araştırmalarda kullanılmasının yanı sıra çoğunlukla, anti-östrojen ilaç direncine ilişkin araştırmalarda kullanılmaktadır. MCF-7 hücre hattı, antihormon tedavisine dirençli çalışmalar için çok uygundur, çünkü bu tür hedeflenmiş tedavi ile tedavi edildiklerinde ER ekspresyonunu kolaylıkla kültüre edilebilmekte ve korunmaktadırlar (Comşa ve ark., 2015).

İnsan meme kanseri MCF-7 hücre hattı, genellikle tek bir varlık olarak görülmesine rağmen, çoğu popülasyonun sadece küçük oranlarını oluşturan çok sayıda bireysel fenotipten oluşmaktadır. Bu fenotipler, gen ekspresyon profili, reseptör ekspresyonu ve sinyal yolağında farklılık göstermektedir. Bireysel fenotiplerin çoğalma hızındaki farklılıklara rağmen, belki de bir çeşit sinyalleme iş birliğiyle, hattın ilerici kültürlenmesi sırasında birçok fenotip dengesi korunmaktadır. Ana hücre hattındaki küçük alt çizgiler uygun seçici koşullar altında genişletilebilmektedir. İn vitro seçim sürecinin zaman ölçeği (6 ay veya daha fazla), meme kanseri hastalarında anti-östrojen tedavisine veya aromataz inhibitörlerine karşı direncin geliştirilmesinde klinik olarak ortaya çıkan uzun süre ile tutarlıdır (Baguley ve Leung, 2011; Comşa ve ark., 2015).

Literatürde MCF-7 hücreleri ile ilgili ilk yapılan araştırma raporlarında klonal varyasyonlar gözlemlenmiştir. Gözlenen farklılıkların çoğu, östrojen tepkinliği veya karsinojenik farelerde tümör oluşturma yeteneği gibi fenotipik özellikler ile ilgili olmasına rağmen karyotipik farklılıkların da olduğu gözlenmiştir (Seibert ve ark., 1983; Nugoli ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda; MCF-7 hücreleri, incelenen varyantlara göre 60 ila 140 arasında değişen kromozom sayılarındaki varyasyonlarla birlikte geniş bir anöploidi göstermiştir ve diğer sitogenetik farklılıkların spesifik marker kromozomlarının varlığı veya yokluğu ile ilgili olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte nadiren markır kromozomların kaybı görülmesine rağmen, yeni aberasyonların ortaya çıkması daha yaygın olduğu da gözlemlenmiştir (Shirazi ve ark., 2011).

Araştırmalardan elde edilen bulgular, MCF-7 hücre hattında yüksek bir genetik instabilite seviyesi önermiştir. Karyotipik farklılıklar, farklı kültür koşulları nedeniyle seçici basınçtaki değişiklikleri yansıtabilmektedir. MCF-7 hücreleri, klonal değişkenliği üretebilen kök hücrelerin bir fraksiyonunu içermektedir (Comşa ve ark., 2015). Bu, MCF-7 hücre hattının meme tümörü heterojenliği için bir model olarak bu

heterojenitesini açıklamaktadır. Farklı MCF-7 varyantları hem genomik hem de RNA ekspresyon seviyelerinde farklılık göstermektedir (Nugoli ve ark., 2003).

Edinilmiş anti-hormana dirençli meme kanseri hücrelerinin özelliklerini araştırmak için, çeşitli anti-hormon ortamlarına adapte edilen MCF-7 hücre popülasyonları oluşturulmuştur. In vitro olarak, MCF-7 hücre hattı modelleri, daha yakından klinik bakım yansıtan in vivo modellere adapte edildiği zaman klinik uygulamaya doğru bir adım daha ileri evrilmiştir (Sweeney ve ark., 2012).

2.8. Yer Elması (*Helianthus tuberosus* L.)

2.8.1. Yer elmasının orjini

Yer elması olarak bilinen ve çok yıllık bir bitki olan *Helianthus tuberosus* L. Asteraceae familyasındandır ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ohio ve Mississippi Nehri vadilerinden elde edilen ve ılıman bir dünyada ekonomik ürün olarak doğallaştırılmış bir ayçiçeği türüdür (Pan ve ark., 2009).

Yer elması (*H. tuberosus*), Avrupalı yerleşimcilerin gelişinden önce bazı Kuzey Amerika Hint kabileleri tarafından yiyecek olarak kullanılmıştır (Şekil 2.7). Keşifçi Champlain, 1605 yılında yer elmasını Kuzey Amerika'dan Fransa'ya götürmüştür. 1600'lü yılların ortalarında, orada bir insan yemi ve hayvancılık yemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Grieve, 1971). Tahıl ürünlerinin aksine, yer elmaları kısır topraklarda iyi gelişebilir ve don ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Ayrıca, tarıma elverişli topraklar için tahıl ekinleri ile rekabet etmez ve yüksek verimli yenilebilir yumrular üretebilmektedir (Li ve ark., 2015). Yer elması (*H.tuberosus*), sıklıkla yıllık olarak yetiştirilmektedir ve 7.5-10 cm uzunluğunda, 3 –5 cm kalınlığında; 1.5- 3 m boyunda bir gövdeye, büyük yapraklara, parlak sarı ayçiçeği benzeri çiçeklere ve patatesleri andıran etli yumrulara sahiptir (Duke, 1983; Pan ve ark., 2009).

Türkiye'de 2011 yılında; yer elmasından (*H. tuberosus*) 2444 ha dikim alanı, 33460 ton üretim 1370 kg/da verim elde edilmiştir. Dikim alanı ve üretimin %80'i Ankara ilinde bulunmaktadır. Buna ek olarak Konya, İzmir, Sinop, Kocaeli Sivas, Zonguldak ve Kayseri gibi illerimizde de yer elması yetiştirilmektedir (İşler, 2011).



Şekil 2.7. Yer elması (İşler, 2011)

2.8.2. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın morfolojik özellikleri

Yer elmasının yaprakları ve çiçekleri yumrusuna göre biraz daha küçüktür (Şekil 2.8a,b) ve yer elması kökünün görüntüsü şekil 2.9'da gösterilmiştir. Ayrıca yer elması hasılı kurutulmakta ve hayvanlara yem olarak verilmektedir. Yer elması yeşilinin silajı ayçiçeği yeşilinde olduğu gibi yapılmaktadır. Silaj kuru maddesinde %10 HP içermektedir (Ergün ve ark., 2004).

a

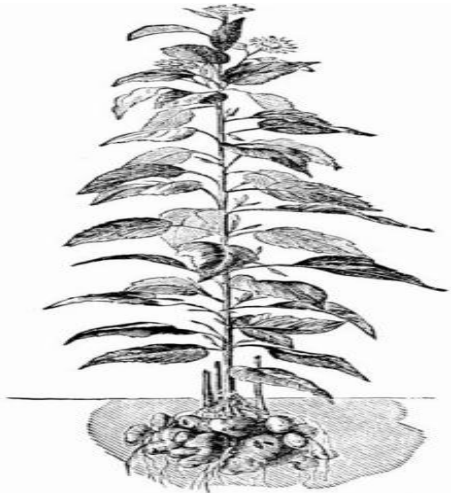


b



Şekil 2.8.a. Yer elması yaprakları, **b.** Yer elması yumrusu (İşler, 2011).

Literatüde bulunan bir raporda yer elması; % 80 oranında su, geri kalan % 15 oranında protein,% 1 yağ, % 75 azot içermeyen ekstrakt,% 60 inulin, % 4 lif ve % 5 kül içerdiği belirtilmektedir. Farklı bir raporda ise % 80 su, % 10 protein, % 76 nişasta,% 1 yağ,% 6 fiber,% 5 kül içerdiği bildirilmiştir. Fosfor miktarı yaklaşık% 0.099'dur; Kalsiyum, % 0.023, demir, 3.4 mg / 100 g, alüminyum, klor, iyot, magnezyum, potasyum, lityum, sülfür ve çinko içermektedir. Az miktarda B ve C vitamini; pürin bazları arginin, histidin, betain, kolin ve hemaglutinin içermektedir (Duke, 1983).



Şekil 2.9. Yer elması kök görüntüsü (İşler, 2011).

2.8.3. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın kullanım alanları

Yer elması (*H.tuberosus*), taze çiğ olarak yenilebilir bir bitki olmasının yanında ilk olarak İrlanda patateslerine benzer iştah açıcı yemeklerde pişirilmiş veya turşusu yapılmış yumruları için yetiştirilmiştir. Yumruları, sığır, koyun ve domuz beslemek için kullanılmaktadır. Gövdesi ve yaprakları yağ, protein ve pektin açısından zengindir ve iyi yem ve silaj yapmaktadır. Yumrulardan fermente edilen alkolün şeker pancarından daha kaliteli olduğu düşünülmektedir (Duke, 1983). Müshil, idrar söktürücü, afrodizyak, spermatogenetik, mide ilacı ve tonik etkileri olan yer elması diyabet ve romatizma için halk tarafından alternatif tıbbi bir bitki olarak kullanılmıştır (Duke ve Wain, 1981; Kays ve Nottingham, 2007).

Yer elması, sadece bir gıda olarak kullanılmamıştır, aynı zamanda kolayca hidrolize olabilen bir fruktan için bir hammadde olarak da kullanılmıştır(Pan ve ark., 2009). Dolayısıyla gıda, ilaç, yem, şeker, kağıt, kozmetik ve biyoetanol endüstrilerinin yanı sıra çöl ve gelgit kontrolünde kullanılmıştır (Chen ve ark., 2013). Yer elmasının yumru köklerdeki fruktoz, kültivar özelliklerine ve hasat zamanına bağlı olarak yumrunun indirgeyici şekerlerinin% 70'i ila% 87'sini oluşturmaktadır. Yer elması aynı zamanda tropik bölgelerde ticari olarak üretilebilmektedir (Aduldecha ve ark., 2016). Yer elması yapraklarının ayrıca yüksek miktarlarda fenolik bileşik içerdiği bilinmektedir (Yuan ve ark., 2008). Yer elması inülin formunda depolandığından, yumruları diyabetik diyetlerde patates ve nişasta yerine kullanılabilmektedir. İnulin, glikoz kalıntısının β (2→1) bağlantısıyla d-fruktoza bağlandığı bir polisakkarittir (Causey ve ark., 2000). Fruktoz monomerleri arasındaki bu özel β-bağlantı

konfigürasyonu nedeniyle, inulin tipi fruktanlar insan sindirim sistemi tarafından bozunmaz, böylece insan kan şekeri seviyesini etkilemez (Causey ve ark., 2000; Bach ve ark., 2013; Li ve ark., 2013).

İnulin tipi fruktanların, hayvan ve insan beslenmesi ile yapılan pek çok çalışma sonucunda prebiyotik olduğu kanıtlanmıştır (Biedrzycka ve Bielecka, 2004). Prebiyotik kavramı, gastrointestinal mikrofloranın hem bileşimi hem de aktivitesinde, konakçıların sağlığına yarar sağlayan spesifik değişikliklere izin veren seçici olarak fermente edilmiş bir madde anlamına gelmektedir (Roberfroid, 2007). β (2 → 1) -fruktan şu anda prebiyotik sınıflandırma için tüm kriterleri karşılayan tek diyetle sindirilemeyen oligosakkarit olarak kabul edilmektedir (Biedrzycka ve Bielecka, 2004; Roberfroid, 2007). Farklı tip inülin fruktanların farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Roberfroid, 2007). Polimerizasyon derecesinin, inulin ve yer elmasının ekonomik değeri ve endüstriyel yararı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Li ve ark., 2015). Şeker hastaları tarafından tatlandırıcı olarak kullanılmak üzere potansiyel bir levüloz kaynağıdır. (Duke, 1983). İnulin aynı zamanda yüksek fruktoz şurubu ve etanol için fonksiyonel gıda ürünleri, hayvan yemi, eko-turizm ve hammaddeler için kullanılmaktadır (Denoroy, 1996; Aduldecha ve ark., 2016)

Önceki fitokimyasal çalışmalar, kumarinlerin (Cabello-Hurtado ve ark., 1998) doymamış yağ asitlerinin (Lin, 1978; Matsuura ve ark., 1993) poliasetilenik türevlerinin (Yoshihara ve ark., 1992; Matsuura ve ark., 1993) ve seskiterpenlerin (Morimoto ve ark., 1966; Miyazawa ve Kameoka, 1983; Baba ve ark., 2005) yer elmasından izole edilen başlıca bileşikler olduğunu açığa çıkarmıştır (Pan ve ark., 2009).

Griffaut ve ark.(2007)'nın yapmış olduğu çalışmada, strese maruz bırakılmış yer elması (*H. tuberosus*) yumrularının parankiminin özellikle Cu-Zn süperoksit dismutazı gibi bazı spesifik polipeptidleri salabildiğini ve uygulanan hücre hattına bağlı olarak bitki ya da hayvan kaynaklı tümör hücrelerinin hangisi olursa olsun colony forming assay yöntemiyle sitotoksik etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Griffaut ve ark., 2007).

Pan ve ark.(2009)'nın yaptığı çalışmada, MCF-7 meme kanseri hücre hattını kullanarak yer elması (*H.tuberosus* L.)'nın tüm bitkisinden dokuz bileşiği sitotoksisitesine bakmak için izole etmişlerdir ve sonuç olarak bu dokuz bileşiğin iki tanesinin sitotoksik ajan olduğunu belirtmişlerdir (Pan ve ark., 2009).

Diğer bir taraftan Yuan ve arkadaşları (2013)'nın yapmış olduğu bir çalışmada yer elması (*H. tuberosus*)'nın yapraklarından 3 adet Hidroksi-8β-

tigloyloksi-1,10-dehidroaliglovinin (1) yeni bilinen bir seskiterpen laktonunun ve seskiterpen laktonları (2- 11) ve bilinen iki flavon (12-13) izole etmişler ve bu bileşiklerin kimyasal yapıları NMR (1D ve 2D) ve kütle spektroskopik yöntemleriyle analiz etmişlerdir. Daha sonra sitotoksik aktiviteleri MCF-7, A549 ve HeLa kanser hücrelerinde MTT assay yöntemi kullanılarak test etmişler ve sonuç olarak, seskiterpen laktonlar 1-11'in her üç kanser hücre çizgisine karşı tutarlı sitotoksisik olduğunu, flavonların 12 ve 13 HeLa hücre çizgilerine karşı seçici inhibisyon aktivitesini gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Petkova ve arkadaşları (2014) Bulgaristan yetiştirilmiş yer elmasının farklı türlerdeki yumruları ve yabani popülasyonları ile bir çalışma yapmışlardır. Yer elması yumrularından elde edilen unun ekstraksiyonunu %70 etanol ve su ile iki farklı işlem ile gerçekleştirmişlerdir ve bu ekstraksiyonların antioksidan aktivitelerini kıyaslamışlardır. Sonuç olarak etanol ekstraktlarının daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Buna ek olarak araştırmacılar yer elmasının vahşi popülasyonundan elde edilen unun, zengin fruktan içeriğinden dolayı değerli bir toplam polifenol ve çözünebilir diyet lif kaynağı olarak değerlendirmişlerdir ve ayrıca bu unların insan ve hayvan beslenmesinde radikal temizleyicileri olarak sağlık yararlarını artıracak yiyeceklerin hazırlanmasında potansiyel olarak kullanıldığını da ortaya koymuşlardır.

Nizioł-Łukaszewska ve ark. (2018)'nın yapmış olduğu bir çalışmada yer elması yaprak ve yumru ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemiyle kıyaslamalı olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, yer elması yaprak ekstraktının yumru ekstraktına göre daha yüksek antioksidan etki gösterdiğini belirlemişlerdir (sırasıyla 5.07 ve 7.14 kat daha yüksek).

2.9. Hücre kültürü

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel malzemelerde; özel besin, sıcaklık, gibi çeşitli ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyona uğramasını önleyecek şekilde yaşatılması ve çoğaltılmasıdır. Hücre kültürü çalışmaları canlılardan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi açısından in vitro çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Zucco ve ark., 1998; Tokur ve Aksoy, 2017).

2.10. Sitotoksisite

Sitotoksisite gibi analizlerin yapılabilmesi için yeterli sayıda hücre elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle hücre kültürü işlemi gerçekleştirilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları steril çalışma ortamında steril özel kaplarla yapılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Sitotoksisite, hücre ölümüne neden olan anlamına gelen bir terimdir. Sitotoksisite araştırmaları, ilaç, bitki gibi maddelerin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi için yapılmaktadır. Sitotoksisite, araştırılan maddenin dozuna ve bu maddenin uygulandığı hücreye maruz bırakılma süresine bağlı olarak hücrelere farklı miktarlarda zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kaldığı zaman apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Tokur ve Aksoy, 2017).

İn vitro şartlarda bazı etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, sitotoksisite çalışmaların en önemli basamağıdır (Niles ve ark., 2007). Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır. Yapılan sitotoksisite çalışması hangi yöntemle yapılırsa yapılsın, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir (Riss ve ark., 2006). Sitotoksisite araştırma metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Crouch ve ark., 1993; Longo-Sorbello ve ark., 2006; Fan ve Wood, 2007; Tokur ve Aksoy, 2017).

Hücre canlılığı ve proliferasyon analizleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve sitotoksik ajanların araştırılması için ilaç keşfinde yaygın olarak kullanılmaktadır. XTT gibi tetrazolyum tuzu kullanılarak yapılan kolorimetrik hücre canlılığı deneyleri, tetrazolyum tuzunun yüksek oranda renkli formazan bileşiklerine indirgenmesine dayanılarak geliştirilmiş bir yöntemdir. XTT radyoaktif olarak kullanılmayı gerektirmemektedir böylece incelenen hücrelerin daha fazla analiz için kullanılabilmesine olanak sağlar ayrıca bu yöntemle daha hassas sonuçlar elde edilir ve diğer hücre canlılık testlerine oranla daha hızlı sonuçlar elde edilmektedir (Tokur ve Aksoy, 2017). Sarı tetrazolyum tuzu olan XTT, metabolik olarak aktif hücrelerde dehidrojenaz enzimleri tarafından oldukça renkli bir formazan boyaya indirgenmiştir. Bu dönüşüm, sadece canlı hücrelerde gerçekleşmektedir bundan dolayı üretilen formazan miktarı, numunedeki canlı hücreler ile orantılıdır (Longo-Sorbello ve ark., 2006.).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Cell Adhesion Assay Kit V13181(Thermo),
Cell Invasion Assay Kit (Collagen I), 24-Well, 8 Mm K917-24 (Bıovısıon),
Tetramethylrhodamine Ethyl Ester (Perchlorate) (Cayman),
Annexın V,
7 Aad Peridinin Chlorophyll Proteinpercp, (Becton Dickinson-Bd),
Dmso (Biochrom),
Tripan Blue (Abcam),
Trypsin-Edta (Biochrom -%0.05 / % 0.02 (W/V), Without Ca2+, Mg2+),
Foetal Bovine Serum (Biochrom),
%1 Penicillin- Steptromycin (Biochrom),
Phosphate Buffer Saline Solution (Pbs); Ph:7,20 (Biochrom),
Falkon Tüpü Pp-Vidalı Kapaklı-15 Ml-Dna/Rnafree (İsolab),
Pastör Pipeti- Steril150 Mm, Taksimatlı, 100 (Lp Italıana),
Serolojik Pipet, Plastik, Pyrogen Free, 5 Ml (Lp Italıana),
Serolojik Pipet, Plastik, Pyrogen Free, 10 M (Lp Italıana),
Nitril Eldiven İthal,
Petri Kutusu- Pp, Steril, 90 Mm (Fıratmed),
Pipet Ucu, Eppendorf, Sarı, 5-100 µl(Lp Italıana),
Pipet Ucu - Şeffaf - 10 Ul (İsolab),
Thoma Lamı ve
Hücre Kültür Flaskı

3.1.1. Kullanılan aletler

Laminar Kabin, İnkübatör, Su Banyosu, Santrifüj, Buzdolabı (+4°C) ve dondurucu (-20°C), Otoklav, Invert Mikroskop (Leica), Öğütücü, Orbital Çalkalıyıcı, Rotary Evaporatör, Hassas Terazi, Liyofilizatör, Işık Mikroskobu(Leica),Floresan mikroplaka okuyucu(Biotek), Floresan mikroskop (ZEN2.3).

3.2. Metod

3.2.1. Yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın ekstraksiyonu

Çalışmanın bitkisel materyalini oluşturan yer elması materyali yıkandıktan sonra kabuğu soyularak yumrusu ve kabuğu ayrı ayrı kurutma kağıdı üzerinde oda ısısında kurutulmuştur. Kurutulan yer elması yumrusu ve kabuğu ayrı ayrı öğütücü yardımı ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Downey ve ark. (2007)'nın kullandığı metod uygulanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Öğütülmüş yer elması yumrusu ve kabuğu ayrı ayrı %60 metanol içerisinde orbital çalkalayıcı ile oda sıcaklığında ve karanlık ortamda ekstrakte edilmiştir. Karışım, Whatman filtre kağıdından filtre edildikten sonra berrak filtrat rotary evaporatör kullanılarak 40 °C'de metanolden uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ham ekstraktlar, ekstraksiyon verimini hesaplamak amacıyla tartılmıştır. Ardından bu ekstraktlar liyofilizatör cihazında liyofilize edilmiştir. Bu işlemin ardından çalışmada kullanılacak olan yer elması yumrusu ve kabuğu, dozlara uygun şekilde tartılıp steril suda çözülerek hazır hale getirilmiş ve +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Hücre kültürü

Büyüklüklerine göre adlandırılan T25 ya da T75'lik flasklar, 96 kuyucuklu ya da 24 kuyucuklu kültür kapları, pastör pipetleri gibi steril malzemeler hücre kültürü aşamasında kullanılmıştır.

3.2.2.1. Hücrelerin dondurulması

Çalışmamızda kullanılan MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF-12A meme epitel hücre hattı Selçuk Ünv. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Hücre hatları kültür çalışmaları için bozulmadan deformasyona uğramadan saklanmalıdır bu nedenle hücre hatları dondurularak güvenli bir şekilde muhafaza edilmektedir. Yerleşmiş bir hücre hattı mikrobiyal kontaminasyona duyarlıdır ve en iyi laboratuvarlarda bile ekipman arızası dolayısı ile kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Dolayısı ile hücre hatlarının yerine konması pahalı ve zaman alıcı

olduğundan, uzun süreli depolama için dondurulup muhafaza edilmeleri hayati önem taşımaktadır.

Dokuların veya hücrelerin sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurularak muhafazası kriyoprezervasyon olarak bilinmektedir. Kriyoprotektif bir ajan olan, dimetilsülfoksit (DMSO) bulunduğu ortamın donma noktasını azaltmaktadır ve ayrıca daha yavaş bir soğutma hızı sağlamaktadır, bu da hücrelerin zarar görmesine ve hücre ölümüne neden olabilen buz kristali oluşum riskini büyük ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle donma solüsyonu hazırlarken DMSO kullanılmıştır. Ayrıca hücre dondurma solüsyonu, gelişmiş hücre canlılığını ve çözdürmeden sonra hücrelerin geri kazanımı için en iyi orandaki fetal sığır serumu (FBS) içermelidir.

%10 FBS ve %1 DMSO karıştırılarak dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Tripsin-EDTA (TrypsinEthylenediaminetetraacetic acid - Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit)'nın oda sıcaklığına gelebilmesi için 5 dk.37˚C'de CO_2 etüvde bekletilmiştir. Steril kabine gerekli olan malzemeler alınarak işleme başlanmıştır. Flasklarda üretilen hücrelerin yıkanması için 1 ml tripsin-EDTA eklenerek aspire edilmiştir. Daha sonra 2ml/flask tripsin-EDTA flasklara eklenerek hücrelerin kalkması için 37˚C CO_2 etüvde 10 dk bekletilmiştir. Hücrelerin kalktığından emin olduktan sonra hücreleri nötralize etmek için 6ml/flask RPMI1640 medium eklenerek flasklardaki solüsyon falkon tüplerine aktarılmıştır. Falkon tüpleri 12.000 rpm 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak pellet çözdürüldükten sonra kriyo tüplere alınmış ve üzerine dondurma solüsyonu eklenerek önce -20 ˚C'de yaklaşık 30 dk bekletildikten sonra -80 ˚C'ye bundan sonra da sıvı azot tankına alınarak muhafaza edilmiştir. Dondurularak muhafaza edilen hücreler gerektiğinde çözdürme işlemi sonrasında yeniden üretilebilmektedir.

3.2.2.2. Hücrelerin çözdürülme işlemi

Çözdürme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır çünkü dondurularak muhafaza edilen hücreler çözdürülürken ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözülebilmekte ve bu sebeple ani olarak serbest sıvı salınmaktadır ve sonuç olarak hipotonik hücreler şişerek patlamaktadır ya da ısınma sırasında hücre içinde kristal oluşumu yeniden başlayabilmektedir ve bu da hücrede mekanik hasara yol açabilmektedir. Çözdürme işlemi için hücreler -80˚C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37˚C'lik su banyosunda yaklaşık 1- 2 dk boyunca çözülene kadar

bekletilmiştir. Daha sonra hücre kültür kabındaki 37˚C'ye ısıtılmış 9 mL RPMI 1640(%10 FBS+%0.1 gentamisin) besiyeri hücrelerin üzerine dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra ilave edilmiştir.

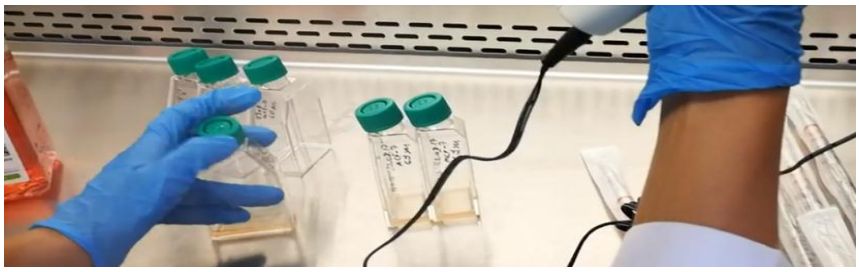
3.2.2.3. Hücrelerin üretilmesi

MCF-7 hücrelerinin çoğaltılmasını desteklemek için geniş uygulanabilirliği olan RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 besiyeri ortamı (medium) ve MCF-12A hücreleri için ise DMEM besiyeri kullanılmıştır. RPMI 1640 Medium, indirgeyici ajan glutatyon ve yüksek vitamin konsantrasyonları içermektedir fakat içeriğinde protein, lipid veya büyüme faktörü yoktur. Bu nedenle, RPMI 1640 Medium, % 10 Fetal Sığır Serumu (FBS)ve hücre kültürü için toksik olmayan, geniş ph aralığına sahip bir antibiyotik olan gentamisin %0.1 oranında eklenerek hazırlanmıştır. Çözdürülen hücreler 15ml'lik falkon tüplerine pastör pipeti yardımıyla konulmuştur üzerlerine 6 ml RPMI1640(%10 FBS+% 0.1 gentamisin) besiyeri eklenerek nazkikçe al ver yapılarak süspanse edilmiştir. Daha sonra bu süspansiyon santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice pipet yardımıyla atık kabına atılmıştır ve pellet flasklara (T25 ya da T75) konulmuştur. Flasklara 8 ml RPMI 1640 medium eklenmiş ve iyice al ver yapılmıştır.

Hücrelerin ekildiğinden emin olabilmek için mikroskopta hücreler kontrol edildikten sonra uygun şartlarda hücrelerin üremesi için inkübe edilmiştir. MCF-7 hücre hattının üreyebilmesi için 24 ila 48 saatte besiyeri ortamı değiştirilerek CO_2 etüvde bekletilmiştir.

3.2.2.4. Hücrelerin ikiye bölünmesi (pasajlama)

Hücreler üretildiği steril kabın %80'ini kapladığı zaman sıkışık (konfluent) durumda olarak adlandırılmaktadır. Kültür kabındaki konfluent hücreler için hem besi ortamı yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt olarak bilinen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu sebeple hücrelerin pasajlanmaları gerekmektedir (Şekil3.1).

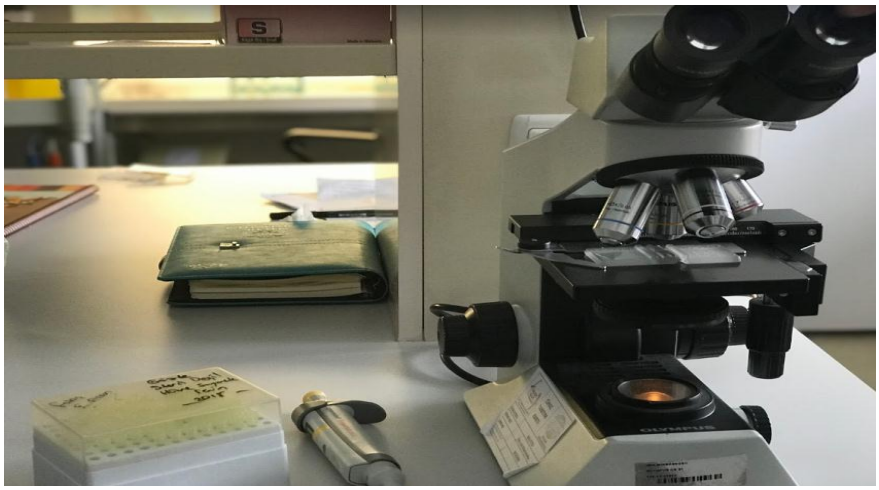


Şekil 3.1.Hücre pasajlama işlemi.

Pasajlama işlemi için tek kullanımlık cam steril pastör pipetlerinden yararlanılmıştır ve işleme başlamadan önce tripsin-EDTA 37˚C su banyosunda bekletilmiştir. Ekilmiş olan hücrelerin konfluent olduğundan emin olmak gerekmektedir bu nedenle mikroskopta hücrelerin doluluk oranı kontrol edilmiştir. Flaskın konfluent olduğundan emin olduktan sonra steril kabinde işleme başlanmıştır. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flaskın alt köşesine damla damla 1ml/flask tripsin-EDTA eklenerek, yüzey 15 saniye kadar nazikçe yıkanmış ve tripsin-EDTA yavaşça çekilerek atık kabına atılmıştır. Daha sonra kültür kabının yüzeyine yapışmış olan hücreleri serbest hale getirmek (kaldırmak) için flasklara 2 ml tripsin-EDTA eklenerek 7 dk 37˚C ve %5 CO_2'li inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra mikroskopta bakılarak hücrelerin kalktığından emin olunmuştur ve 10 mL besiyeri hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve pipet yardımıyla hücreler al-ver yapılmıştır. Süspansiyon santrüj edilmiştir ve sonrasında pellet homojen hale getirilmiştir ve üzerine 7 ml medium eklendikten sonra eşit şekilde iki ya da daha fazla flask ekim yapılmıştır (Şekil 3.1). Hücrelerin kültür kabına homojen şekilde dağılmalarını sağlamak için nazikçe sallanmıştır ve sonra, kaplar hücrelerin üremesi için inkübatöre konulmuştur. Bu işlem yeterince hücre elde edene kadar tekrarlanmıştır.

3.2.2.5. Hücre sayımı

Hücre sayımı, hücre sağlığının ve proliferasyon hızının takip edilmesi gibi hücre bazlı analizlere hücrelerin hazırlanması için uygulanmaktadır. Hücre sayımı, özellikle hücresel tepkilerin kantitatif ölçümleri için doğru, tutarlı ve hızlı olması önemlidir bu nedenle hücre sayımı 3 tekrarla yapılarak ortalaması alınmıştır. Bu çalışmada Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Işık Mikroskobu (Leica).

Hücreleri yeterince ürettikten sonra uygulanacak olan deney için pasajlanarak homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 100 µl hücre sayım şişesine pipet yardımıyla alınıp üzerine 900 µl trifan mavisi boyası eklenerek iyice al-ver yapılmıştır. Thoma lamı ile bu lamın üzerindeki lamelin arasında bulunan oluğun kenarından hücre süspansiyonu sızdırılarak yayılması sağlanmıştır ve Işık mikroskobunda(Leica) 3 tekrarlı sayım yapılmıştır. Şekil 3.2'de hücre sayımı için kullanılan ışık mikroskobu gösterilmiştir. Böylece mililitredeki hücre sayısını belirlemek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır:

Hücre sayısı / mL= Hücre sayısı (tüm lam üzerinde sayılan) $x\ 10^4$

3.3. Sitotoksisite Analizi

Bu çalışmada XTT metodu kullanılarak MCF-7 insan meme kanseri ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre soyu üzerrindeki sitotoksik etki belirlenmiştir.

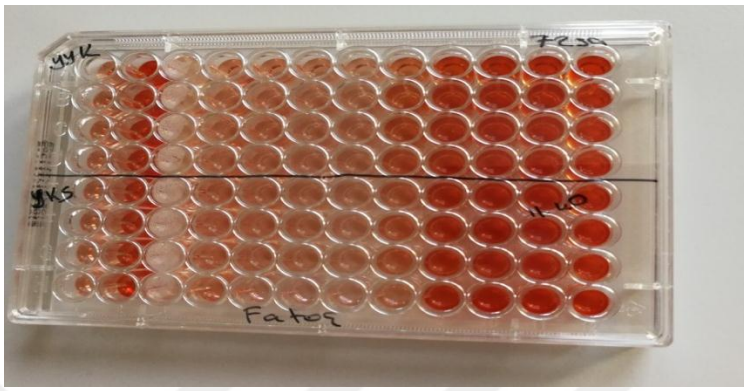
3.3.1. Xtt (2,3-bis (2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2h-tetrazolyum))

XTT metodu aşağıda belirtilen sırayı takip edilerek uygulanmıştır:

1. Öncelikle yer elması yumrusu (kabuğu soyulmuş) ve yer elması kabuğu materyallerinden ana stok ekstraksiyonları gerçekleştirildi.
2. Ana stok için 0.005 gram liyofilize edilmiş olan tohum özütleri tartılarak boş falkonlara konuldu ve özütlerin üzerine steril DMSO eklenerek 1 ml'e tamamlanarak vortexlendi.

3. Daha sonra bu solüsyonun iyice homojenize olabilmesi için 24 saat çalkalayıcıya bırakıldı.

4. XTT deneyi 96 kuyucuklu mikroplakalarda yapılmıştır. Mikroplakanın ilk sütunu medium kontrol, ikinci sütunu hücre kontrol ve üçüncü sütun ilaç kontrol olarak tasarlanmıştır (Şekil3.3).



Şekil 3.3. XTT için hücrelerin ekildiği 96 kuyucuklu plaka.

5. 150µl RPMI 1640 medium öncelikle medium kontrol sütununa eklenmiştir ve sonra ilaç kontrol sütunu hariç hücre kontrol sütununa ve diğer bütün sütunlara 100 µl olacak şekilde medium konulmuştur.

6. Daha sonra mikroplakanın ilaç kontrol sütununa 200 µl ana stok bitki konsantrasyonları konulmuştur ve yüksek dozdan düşük doza ½ oranında yatay olarak seyreltilerek (5000 µM,2500 µM,1250 µM,615 µM, 312.5 µM, 156.25 µM,78.125 µM, 39.06 µM,19.53 µM, 9.765 µM) seri dilüsyon yapılmıştır.

7. Kültüre edilip sayım işlemi gerçekleştirilen insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri ve sağlıklı hücre hattı MCF-12A hücreleri ayrı mikroplakalarda ilaç kontrol sütunu hariç bütün sütunlara $1x10^4$ miktarında ekildikten sonra mikroplakalar 24, 48 ve 72 saat 37ºC'de CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

8. İstenen saatlerdeki inkübasyon saatleri sonunda, mikroplakanın her kuyucuğuna XTT solüsyonu eklenerek 5 saat bekletilmiştir.

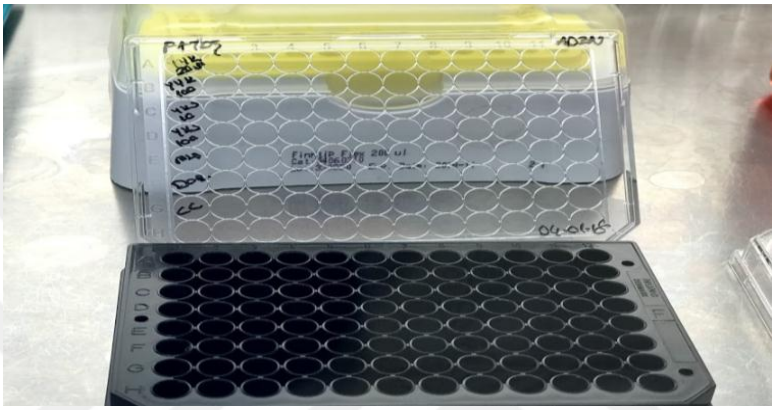
9. Bu süreler sonunda mikroplakalar 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (Biotek) ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve IC_{50} (hücrelerin %50'sinin yaşadığı ilaç konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması ile belirlenmiştir.

3.4. Hücre Adezyon Analizi

Bu çalışmada insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 için Vybrant Hücre Adezyon Kitini kullanılmıştır (V-13181).

1. Deneye ön hazırlık olarak uygun şekilde üretilen hücreler 48 saat serumsuz ortamda bırakılmıştır.

2. Daha sonra 96 kuyucuklu siyah plakaya 100 µl'de 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır(Şekil 3.4).

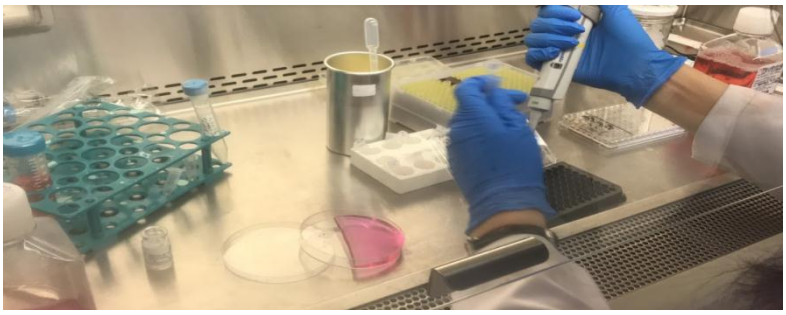


Şekil 3.4. Adezyon analizi için kullanılan olan siyah plaka.

3. Mikroplaka üzerinde 48 saat ve 72 saat için ayrı ayrı kontrol grubu kuyucukları düzenlendikten sonra diğer kuyucukların her birine 100 µl istenen konsantrasyonlarda bitkiler ekilerek 48 saat (yer elması kabuğu,10 µM,50 µM,100 µM ve 134 µM; yer elması yumrusu, 20 µM,50 µM ve 100 µM) ve 72 saat (yer elması kabuğu 20 µM,5 µM ve 2.5 µM; yer elması yumrusu,40 µM,20 µM ve 10 µM) 37˚C CO_2 etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 3.5).

4. İnkübasyon sonrasında kit prosedürüne adım adım uyularak hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve serumsuz RPMI-1640 besiyeri ile resüspense edilmiştir.

5. Daha sonra 5 µl Kalsein AM stok solüsyonu eklenerek hücreler 120 dk 37˚C CO_2 etüvde inkübe edilmiştir.



Şekil 3.5. Steril kabinde adezyon analizi işlemleri.

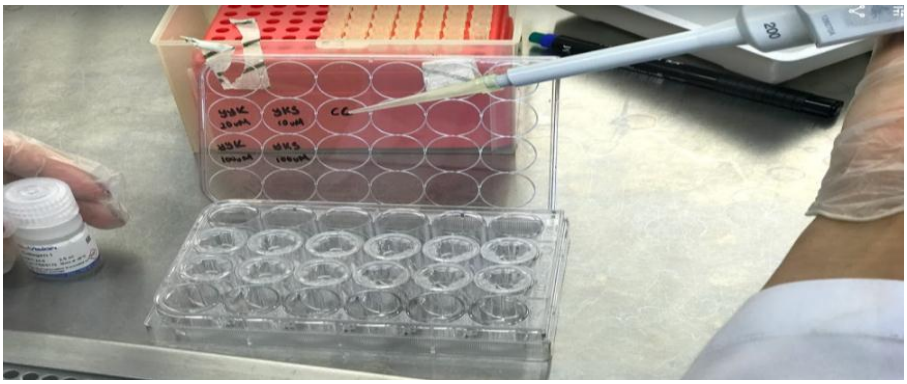
6. Yapışmayan hücreler dikkatli bir şekilde 4 kez yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 200 µl PBS eklenmiştir. Ex/Em = 504 nm/523 nm dalga boyunda floresan mikrolplaka (Biotek) okuyucuda okutularak sonuçlar alınmıştır.

3.5. Hücre İnvazyon Analizi

Hücre invazyonu (istilası) hücrelerin hücre dışı bir matris yoluyla bir bölgeden diğerine göç etme kabiliyetidir. Hücre invazyonu hem normal hücreler hem de kanser hücreleri tarafından kimyasal ya da mekanik uyaranlar da dahil olmak üzere çeşitli özel sinyallere cevap olarak ortaya çıkmaktadır. İnvazyon esnasında ekstraselülar matris, hücreler yeni yerlerine göç etmeden önce hücresel proteazlar tarafından enzimatik olarak parçalanır. Hücre invazyonu, yara onarımı, damar sistemi oluşumu ve gibi normal süreçlerin yanı sıra metastaz sırasında tümör hücreleri tarafından dokuların anormal invazyonu için gerekmektedir. Bu çalışmada Yer elmasının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, hücre invazyonu üzerine etkisi "EZCell Cell İnvasion Assay Kit" (Biovision,K917-24) ile belirlendi. Kit 24 odacıklı bir plakada, kollajen I ile kaplı bir Boyden odasını kullanmaktadır, burada hücreler matrisi istila eder ve daha sonra uyarıcılara veya inhibe edici bileşiklere cevap olarak Boyden odasındaki yarı geçirgen bir zardan geçer. Yüzde hücre istilası doğrudan bir plaka okuyucusunda analiz edilebilmiştir. Analiz aşağıda belirtilen adımlar izlenerek kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. Deneye ön hazırlık olarak MCF-7 hücreleri uygun şekilde üretildikten sonra serumsuz RPMI-1640 besiyerinde 24 saat dk 37˚C CO_2 etüvde inkübe edilerek aç bırakılmıştır.

2. 100’er µl Kolajen I plakanın üst haznesine ekilerek +4 ˚C’ de 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.6).

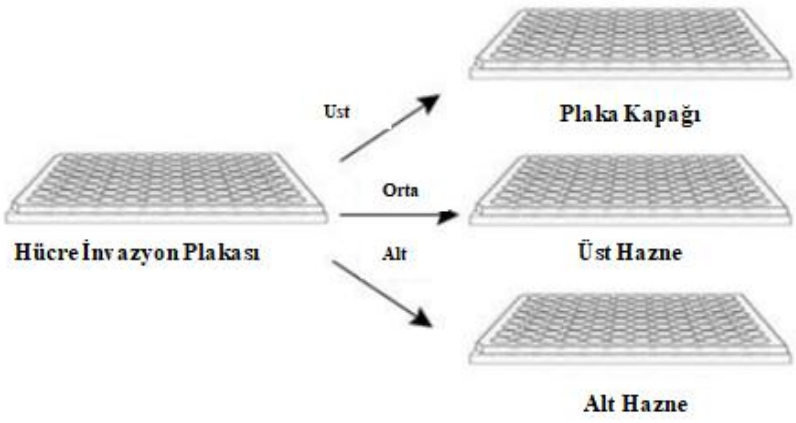


Şekil 3.6. İnvazyon analizi için kullanılan 24 kuyucuklu plaka görüntüsü.

3. Kolajen I kuruyana kadar inkübasyon devam etmiştir ve Kolajen I’in kuruduğundan emin olduktan sonra kuyucuklar 200 µl 1M Tris ile dikkatli bir şekilde 3 kez yıkanmıştır.

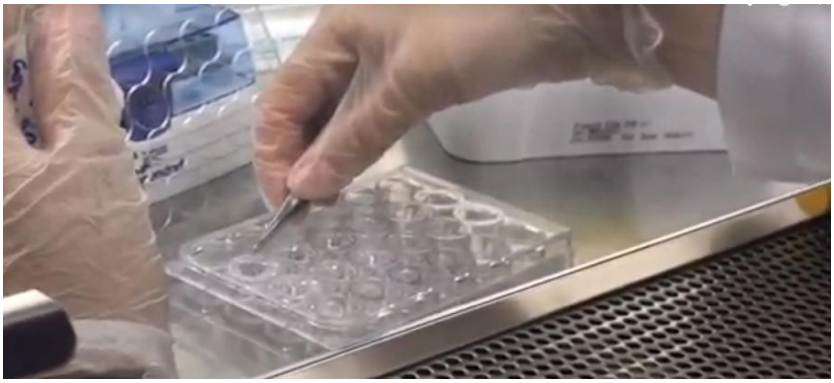
4. Aç bırakılan hücrelerin Thoma Lamı ile sayımı gerçekleştirildikten sonra her kuyucuk için 1.5×10^5 hücre olacak şekilde üst hazneye ekim yapılmıştır.

5. Üst hazneler dikkatli bir biçimde kenarlara alınarak alt bölmelere kuyucuk başına 600 µl serumsuz besiyeri eklenmiştir. Kontrol kuyucuğu için ise alt hazneye 540 µl serumsuz besiyeri ve 60 µl Kontrol İnvazyon İnducer (Kit içinden çıktı) ekilmiştir.



Şekil 3.7. Hücre İnvazyon plakası hazne görüntüleri.

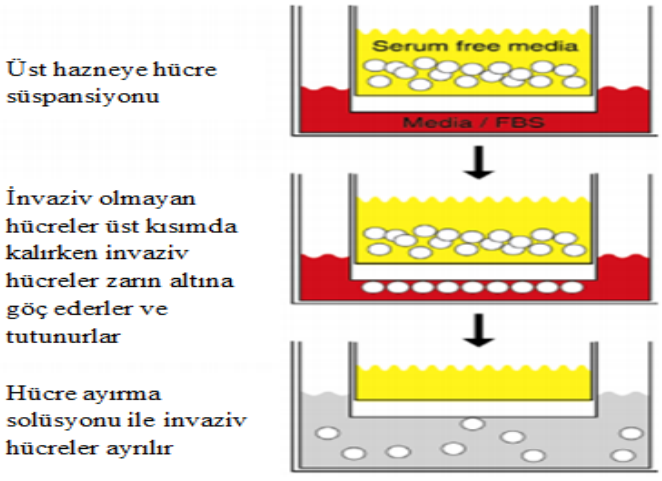
6. Üst hazneler dikkatlice pens yardımıyla besiyeri ekimi yapılan haznelerin üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. İnvazyon analiz işlemleri.

7. Üst haznelere istenen konsantrasyonlarda 200 µl bitkili hücre süspansiyonu eklenerek plakalar istenilen uygun konsantrasyonlara uygun şekilde 48 saat (yer elması kabuğu,10 µM,50 µM,100 µM ve 134 µM; yer elması yumrusu, 20 µM,50 µM ve 100 µM) 72 saat (yer elması kabuğu, 2.5µM, 5 µM ve 20 µM; yer elması yumrusu,10 µM,20 µM ve 40 µM) ve için 37˚C CO_2 etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 3.9).

8. 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri dolan plakalardaki hücreler Işık Mikroskobunda (Leica) alt ve üst hazneler ayrı ayrı olmak üzere sayılmış ve görüntüleri alınmıştır.



Şekil 3.9. Hücrelerin üst hazeneden alt hazneye invazyonu.

9. Daha sonra plakanın üst hazenlerindeki süspansiyon jele zarar vermeden dikkatli bir şekilde aspire edilmiştir.

10. Daha sonra üst hazneler kulak çöpü yardımıyla dikkatli bir şekilde kurutulmuştur (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Hazenelerin kurutulma aşaması.

11. Üst hazneler dikkatlice pens yardımıyla yan taraflara alınmıştır.

12. Plakanın kapağı kapatılarak 5dk 100×g de santrifüj edilmiştir.

13. Santrifüj sonrasında alt haznenin süpernatantı aspire edilmiştir.

14. Alt hazneler 500 µl Wash Buffer ile yıkanmıştır.

15. Plaka 5dk 100×g de santrifüj edildikten sonra alt haznedeki wash buffer aspire edilmiştir.

16. 450 µl ayırma solüsyonuna (1/250 oranında seyreltilmiş) hücre boyası eklenerek iyice karıştırılmıştır.

17. Alt haznelerin her kuyucuğuna 500 µl mix eklenerek üst hazneler alt haznelerin üzerine yerleştirilmiş ve 30 dk 37˚C'de inkübe edilmiştir.

18. İnkübasyon sonrasında üst hazneler dikkatlice cımbız yardımıyla yan taraflara alınmış ve alt haznelerideki süspansiyon floresan okuma için uygun bir plakaya aktarılarak Ex/Em=485/530 nm dalga boyunda florasan okuyucuda (BioTek) okutulmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Hazırlanan İnvazyon plakasının floresan okuyucuya yerleştirilmesi.

3.6. Apoptoz Tayini İçin Kullanılan Yöntemler

Yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının meme kanseri MCF-7 hücre hattı ve MCF-12A sağlıklı hücre hattı doza ve zamana bağlı apoptotik etkilerinin belirlenmesi için mitokondriyal fonksiyon değerlendirmesini sağlayan Tetrametilrodamin etil ester (TMRE) boyası ve erken ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesi için Annexin V/7AAD (Aminoactinomycin D) boyası kullanılmıştır.

3.6.1. Mitokondriyal membran potansiyeli (δψm) ölçümü ile apoptoz analizi

Hücrenin apoptoza gittiğinin bir göstergesi mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişikliklerdir. Yer elması yumrusu ve kabuk ekstraktlarının doza ve zamana bağlı olarak uygulandığı meme kanseri MCF-7 hücre hattı ve MCF-12A sağlıklı hücre hattındaki mitokondriyal membran potansiyel değişiklikleri belirlemek için sitotoksik olmayan hücre geçirgen bir boya olan TMRE (Cayman Chemical, item no*;21426)* kullanılmıştır. TMRE, pozitif yüklü floresans bir boya olup hücredeki negatif yüklü (aktif) mitokondrileri boyar. Depolarize(inaktif) mitokondrilerde membran potansiyelinin azalmasından dolayı gözlenen floresans miktarı da azalır.

1. 5 mg TMRE boyası, 1 ml DMSO içinde çözdürülerek boyanın stok solüsyonu (10 mM) hazırlanmıştır.
2. MCF-7 hücreleri için, her kuyucukta 7.5×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara 24 saatlik inkübasyon için 320µM, 80µM (IC_{50}) ve 10µM konsantrasyonlarında yer elması yumru ve kabuk esktraktları; 48 saatlik

inkübasyon için 20µM, 50 µM ve 100 µM yer elması yumru ekstraktı ve 10 µM,50 µMve 134 µM yer elması kabuk ekstraktı; 72 saatlik inkübasyon için 2.5 µM,5 µM ve 20 µM yer elması kabuk ekstraktı ve 10 µM,20 µM ve 40 µM yer elması yumru ekstraktı ekilmiştir.

3. MCF-12A hücre hattı için ise her kuyucukta 6×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu özel plakalara 225 µM konsantrasyonunda yer elması kabuk ekstraktı eklenerek 72 saat inkübe edilmiştir.

4. İstenilen bitki konsantrasyonların uygun inkübasyon süreleri sonrasında hücrelere 1:10 oranında TMRE boyası eklenmiş ve hücreler 37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon sonrası hücrelerdeki floresans miktarı 550/575nm dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (Biotek,Synergy/H1,CT-MOL-14) ölçülmüş ve hücreler floresans mikroskopta (ZEN 2.3 SP1) görüntülenmiştir.

3.6.2. Annexin V/ 7AAD ikili boyaması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin belirlenmesi

Apoptoz diğer adıyla programlanmış hücre ölümü dokularda hücrenin morfolojik değişikliklerine dayanarak keşfedilmiştir (Kerr ve ark., 1972). Zamanla, hücre küçülmesi, nükleer yoğuşma gibi apoptoz için morfolojik kriterler nükleozolar ile ayrılan DNA iplikleri arasndaki gibi biyokimyasal kriterler ile tamamlanmış ve DNA bantlarının agaroz jelleri üzerinde merdivenli görünmesine neden olmuştur (Wyllie ve ark., 1984)

Literatürde yapılmış olan ilk çalışmalarda bu tipik özellik, apoptozun damgası olarak kabul edilmiştir. Fakat apoptozdaki tüm hücrelerin DNA iplikçiklerini nükleozomlar arasında parçaladığı görülmemektedir ve bu yüzden bu hücreler ancak geç apoptotik yolakta bunu yapabilmektedirler (Oberhammer ve ark., 1993). Apoptoz tayini için kullanılan diğer bir parametre, plazma zarının iç kısmında bulunan negatif yüklü bir fosfolipid olan fosfatidilserin (PS) hücresinin yüzeyindeki görünümüdür. Apoptozun erken evresinde hücre zarının bütünlüğü korunur, ancak hücreler zar fosfolipidlerinin asimetrisini kaybeder (Fadok ve ark., 1992; Homburg ve ark., 1995; Martin ve ark., 1995; Diaz ve Schroit, 1996). PS hücre yüzeyinde açığa çıkar ve apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından tanınması ve uzaklaştırılması için spesifik sinyallerden birini oluşturur (Fadok ve ark., 1992; Verhoven ve ark., 1995). Annexin V

(veya Annexin A5), kalsiyum bağımlı bir şekilde fosfatidilserin (PS) bağlayan hücre içi proteinlerin annexin ailesinin bir üyesidir. PS normalde sadece sağlıklı hücrelerde plazma zarının hücre içi broşüründe bulunur, ancak erken apoptoz sırasında, zar asimetrisi kaybolur ve PS dış broşürün içine geçer. Annexin V daha sonra apoptotik hücreleri spesifik olarak hedeflemek ve tanımlamak için kullanılabilir. Sadece Annexin V bağlaması apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayrım yapamaz. Nekrotik ve apoptotik hücreler arasında ayrım yapmak için 7-aminoactinomisin D (7-AAD) çözeltisinin kullanılmıştır. Erken apoptotik hücreler 7-AAD tarafından boyanamaz yalnızca Annexin V ile boyanırken, geç evre apoptotik hücreleri bu boyalar ile pozitif olarak boyanacaktır.

1. MCF-7 hücreleri için, her kuyucukta 7.5×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara:

   - 24 saatlik inkübasyon için;

   10µM, 80µM ve 320µM konsantrasyonlarında yer elması kabuk ekstraktlarından ve 10µM, 80µM ve 320µM konsantrasyonlarında yer elması yumru ekstraktlarından,

   - 48 saatlik inkübasyon için;

   10 µM,50 µMve 134 µM kabuk ekstraktlarından ve 20µM, 50 µM ve 100 µM yer elması yumru ekstraktlarından,

   - 72 saatlik inkübasyon için ise,

   2.5 µM,5 µM ve 20 µM kabuk ekstraktlarından ve 10 µM,20 µMve 40 µM yer elmasu yumru ekstraktlarından ekilmiştir.

2. MCF-12A hücre hattı için ise her kuyucukta 6×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu özel plakalara 225 µM konsantrasyonunda yer elması kabuk ekstraktı eklenerek 72 saat inkübe edilmiştir

3. İstenilen bitki konsantrasyonların uygun inkübasyon süreleri sonrasında plakanın her kuyucuğu PBS ile yıkanmıştır ve daha sonra kuyucuklara 500µl PBS içinde 1× Annexin V solüsyonundan ve 1×7AAD solüsyonundan eklenerek 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

4. 15 dk sonunda hücreler 2 kez 1000 µl PBS ile yıkanarak floresan mikroskopta (ZEN 2.3 SP1) Annexin V için 633/660 nm,7 AAD için 488λ/647 nm dalga boyunda görüntü alınmıştır.

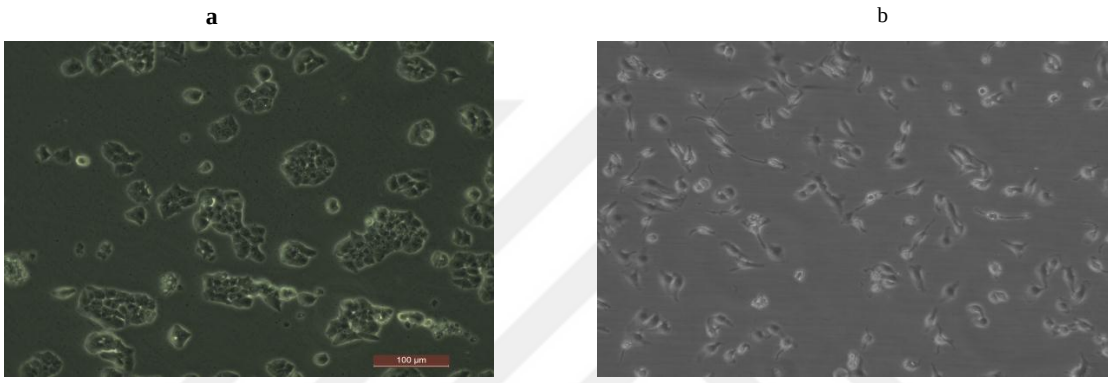
3.6.3 İstatistiksel Analiz

Deneylerde yer elması yumrusu ve kabuğu ekstraktlarının ardışık konsantrasyonlarının MCF-7 meme kanseri ve MCF-12A sağlıklı epitel hücreleri üzerindeki sitotoksisite analizi için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarının her biri 3 tekrar şeklinde yapılmıştır. Her tekrara ait absorbans/floresans değerleri, mikroplaka okuyucu tarafından ortalama ve ± SD değerleri olarak hesaplanmıştır ve $p<0.0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Yer elması yumrusu ve kabuğu ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonlarına ait doz cevap eğrileri, Graphpad Prism 8.2.0 istatistik yazılımında oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. MCF-7 Meme Kanseri ve MCF-12A Sağlıklı Meme Epitel Hücre Morfolojisi

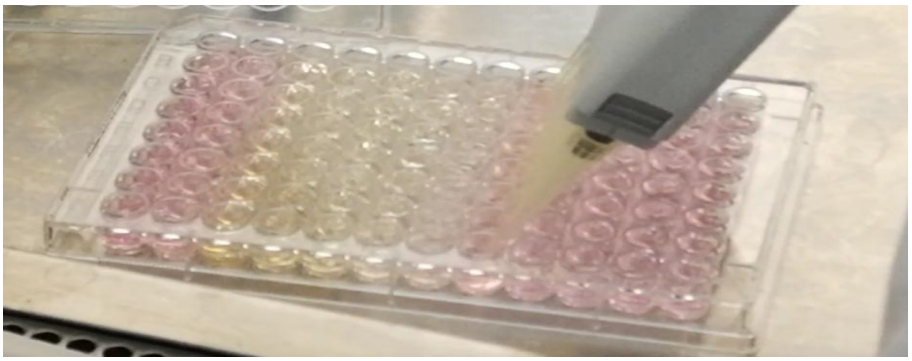
T75 kültür flaskında 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılarak üretilen MCF-7 ve MCF-12A hücrelerinin görüntüsü inverted mikroskopta (Leica) kontrol edilmiştir (Şekil 4.1a,b).



Şekil 4.1.a. inverted mikroskoptan alınan MCF-7 hücre görüntüsü(40x), **b.** inverted mikroskoptan alınan MCF-12A hücre görüntüsü (40x).

4.2. Yer Elması Yumru ve Kabuk Ekstraktlarının Sitotoksisite Sonuçları

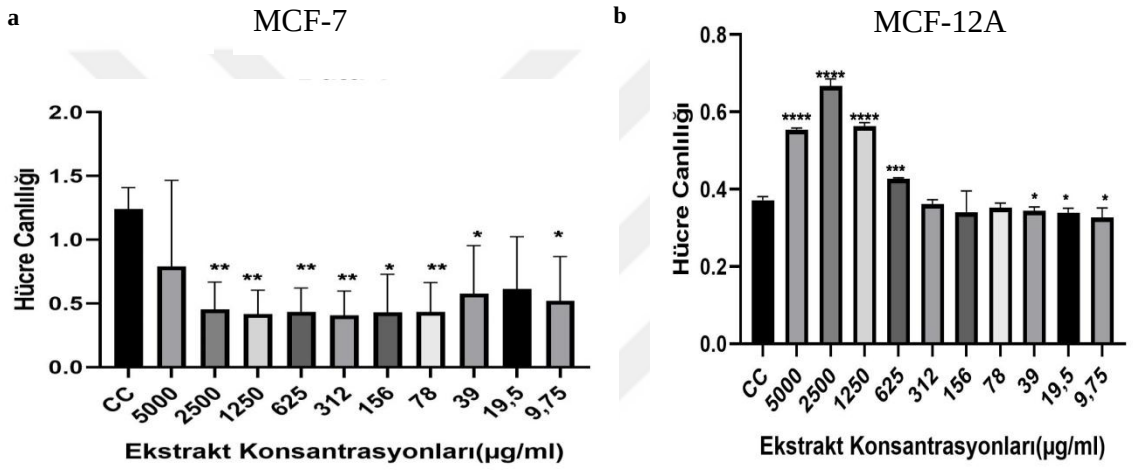
Yer elmasının yumru ve kabuğunun ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hattına 24, 48 ve 72 saat uygulamaları ile IC_{50} doz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla XTT testi uygulanmıştır (Şekil 4.2).



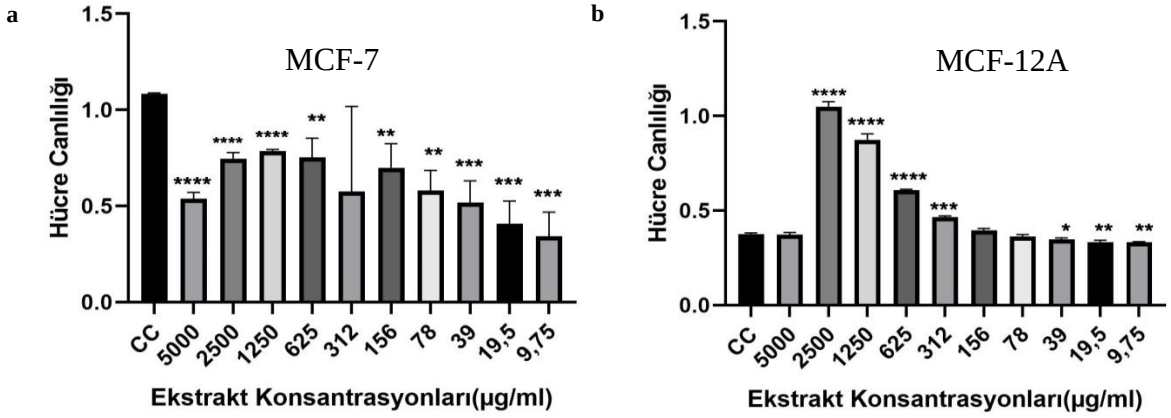
Şekil 4.2. XTT solüsyonu eklendikten sonra hücrelerin renk değiştirdiği plaka görüntüsü.

Her iki ekstraktın 5000 µM,2500 µM,1250 µM,615 µM, 312.5 µM, 156.25 µM,78.125 µM, 39.06 µM,19.53 µM, 9.765 µM olmak üzere 10 farklı konsantrasyonun sitotoksisite etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.3. a ve b, 4.4.a ve b, 4.5. a ve b).

24 saat uygulama sonrasında XTT sonuçlarına göre yer elması yumrusu (kabuğu soyulmuş) ekstraktının MCF-7 ve MCF-12A hücrelerinde IC_{50} 79.16 µM ve 21.46 µM olarak hesaplanmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4.3.a ve b). Yer elması kabuğunun ekstraktının MCF-7 hücrelerinde IC_{50} değeri 78.69 µM, MCF-12A hücrelerinde canlılığın %80'lerin altına düşmediği bu sayede toksik etkide bulunmadığı belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.4.a ve b).



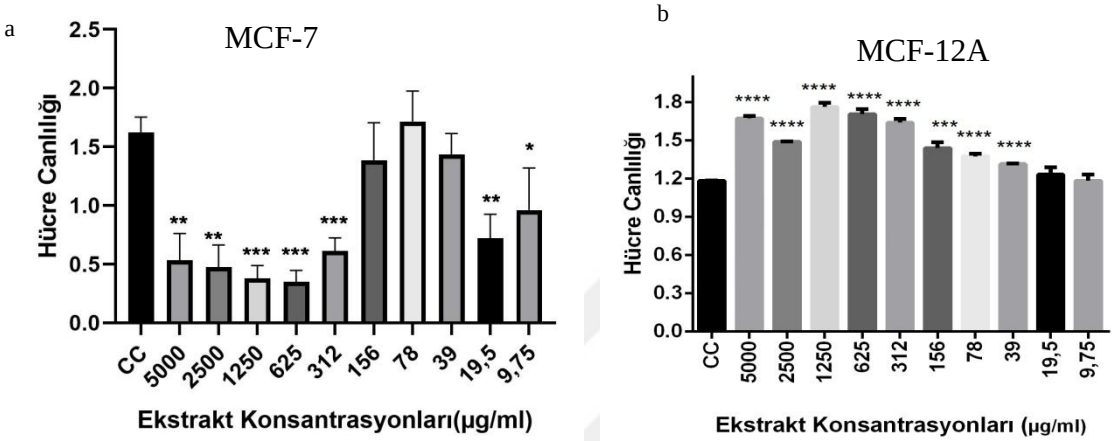
Şekil 4.3.a. Yer elması yumrusunun MCF-7 hücre hattı üzerine 24 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması yumrusunun MCF-12A hücre hattı üzerine 24 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi ($p<0.0001$).



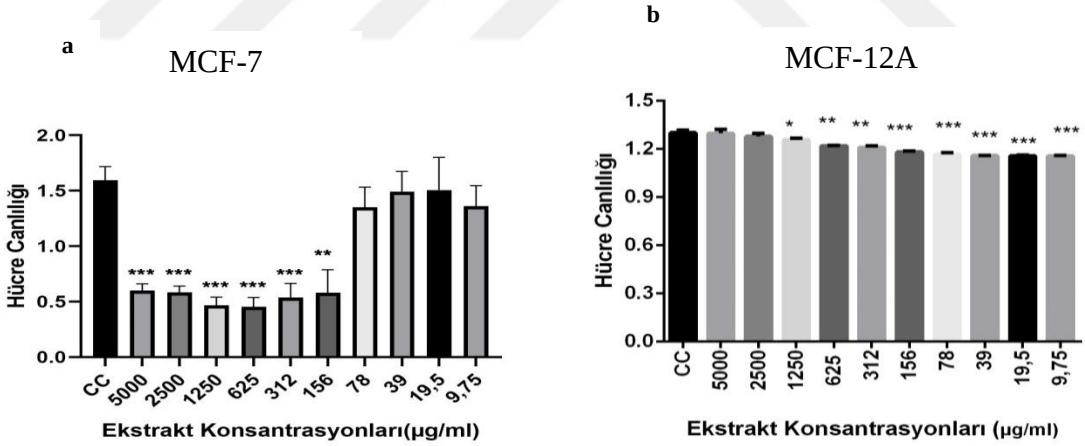
Şekil 4.4.a. Yer elması kabuğunun MCF-7 hücre hattı üzerine 24 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması kabuğunun MCF-12A hücre hattı üzerine 24 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi ($p<0.0001$).

48 saat uygulama sonrasında XTT sonuçlarına göre yer elması yumrusu (kabuğu soyulmuş) ekstraktının MCF-7 IC_{50} değeri 108.80 µM olarak hesaplanmıştır ve MCF-

12A hücrelerinde toksik etki gözlemlenmemiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.5.a ve b). Yer elması kabuğunun ekstraktının MCF-7 hücrelerinde IC_{50} değeri 134.23µM, olarak hesaplanmıştır bu değer istatistik olarak da anlamlı bulunmuştur ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücrelerinde toksik etkide bulunmadığı belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.6.a ve b).



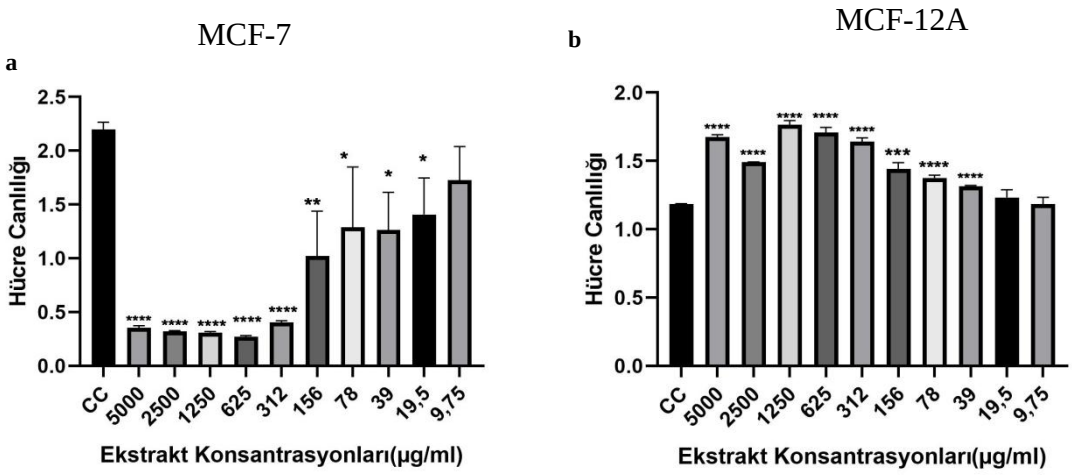
Şekil 4.5.a. Yer elması yumrusunun MCF-7 hücre hattı üzerine 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması yumrusunun MCF-12A hücre hattı üzerine 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi ($p<0.0001$).



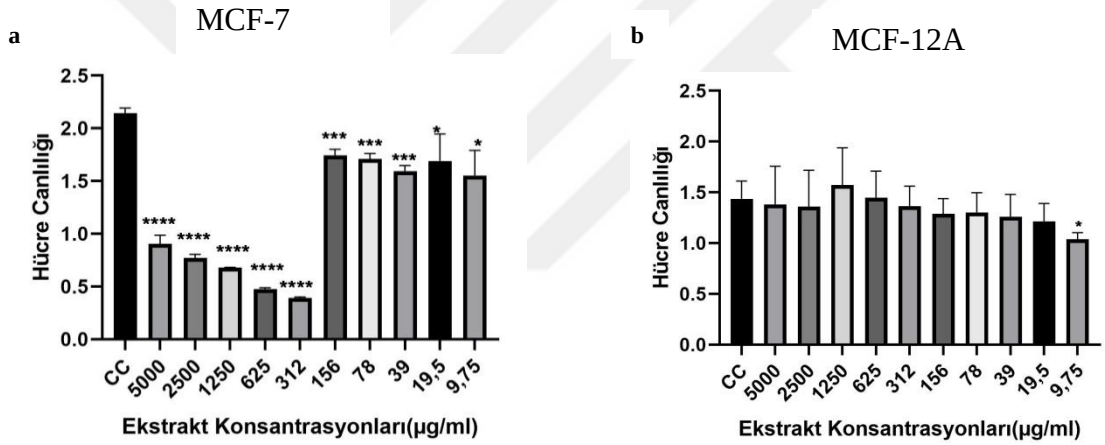
Şekil 4.6.a. Yer elması kabuğunun MCF-7 hücre hattı üzerine 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması kabuğunun MCF-12A hücre hattı üzerine 48 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi($p<0.0001$).

72 saat uygulama sonrasında XTT sonuçlarına göre yer elması yumrusu (kabuğu soyulmuş) ekstraktının MCF-7 hücre soyunda IC_{50} değeri 20.08 µM olarak hesaplanmıştır ($p<0.0001$) ve MCF-12A hücrelerinde toksik etkide bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.a ve b). Yer elması kabuğunun ekstraktının MCF-7 hücrelerinde IC_{50} değeri 4.75 µM, MCF12A hücrelerinde ise IC_{50} değeri 225.99 µM

olarak hesaplanmıştır bu değer istatistik olarak da anlamlı bulunmuştur (p<0.001) (Şekil 4.8.a ve b).

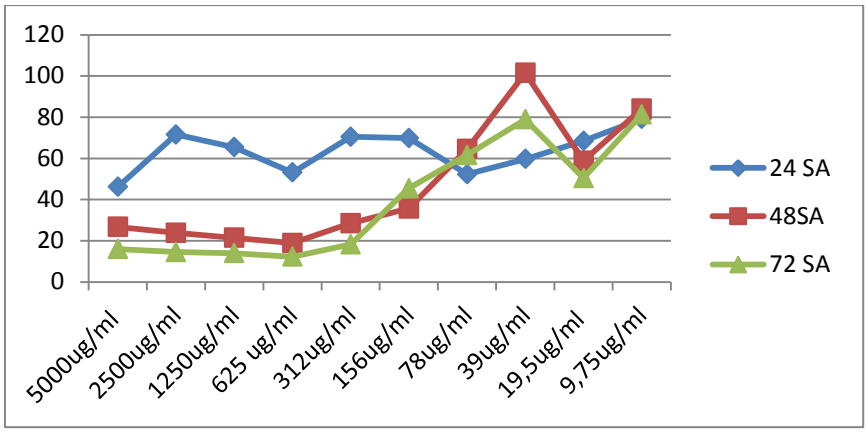


Şekil 4.7.a. Yer elması yumrusunun MCF-7 hücre hattı üzerine 72 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması yumrusunun MCF-12A hücre hattı üzerine 72 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi (p<0.0001).



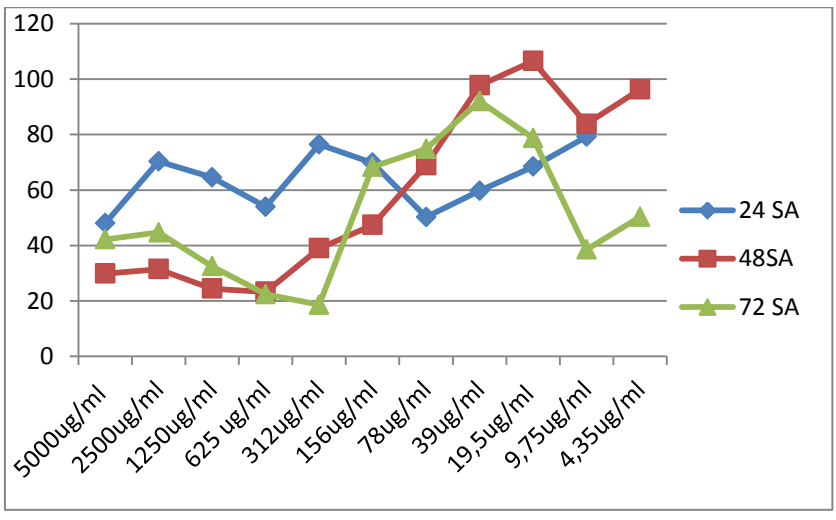
Şekil 4.8.a. Yer elması kabuğunun MCF-7 hücre hattı üzerine 72 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi, **b.** Yer elması kabuğunun MCF-12A hücre hattı üzerine 72 saat inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi (p<0.0001).

Yer elması yumru ekstraktının MCF-7 meme kanseri ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hatları üzerine 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarının kıyaslamalı XTT sonuçları Şekil 4.9' da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saat inkübasyonunda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 79.16 µM), MCF-12A sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermediği gözlemlenmiştir. 48 saat uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 108.80 µM), MCF-12A sağlıklı hücrelerde herhangi bir toksik göstermediği gözlemlenmiştir. 72 saat uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 20.08 µM), MCF-12A sağlıklı hücre hattında ise toksik etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil4.9. Yer elması yumru ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri üzerine 24,48 ve 72 saatlik sitotoksisite değerlerinin kıyaslamalı sonuçları.

Yer elması kabuğu ekstraktının MCF-7 meme kanseri ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hatları üzerine 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarının kıyaslamalı XTT sonuçları Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saat inkübasyonunda MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 78.69 µM), MCF-12A sağlıklı hücrelerinin ise toksik etkisi olmadığı gözlenmiştir. 48 saat uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 134.23µM), MCF-12A sağlıklı meme epitel hücrelerinde toksik etkisi olmadığı gözlenmiştir. 72 saat uygulamasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde etkili olan dozun (IC_{50}: 4.75 µM), MCF-12A sağlıklı hücre hattında canlılığın doza bağlı bir şekilde değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. Yer elması yumru ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri üzerine 24,48 ve 72 saatlik sitotoksisite değerlerinin kıyaslamalı sonuçları.

Kısaca, Yer elması yumrusu ve kabuğunun MCF-7 kanser hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat uygulamalarının sitotoksisite analizlerine göre 24 saat için uygulanan

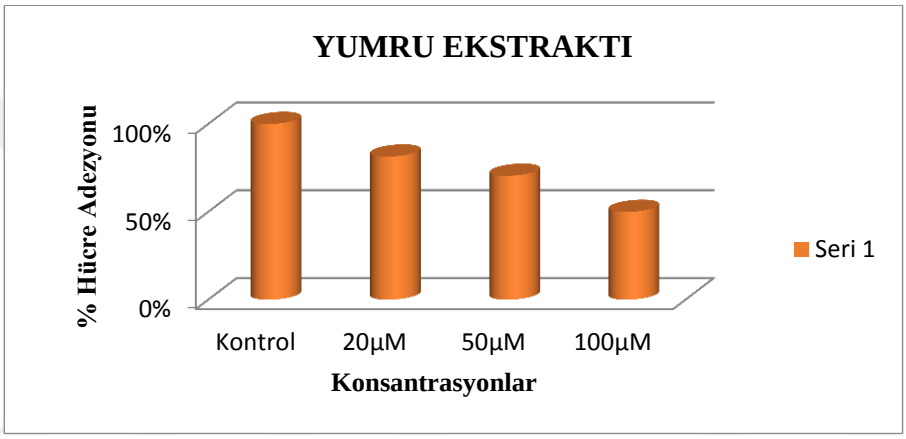
yumru ve kabuk ekstraklarında hücre canlılığının %80 ve üzerinde olduğu belirlenmiştir. 48 saat ve 72 saat uygulamalarında ise canlılığın %50 oranında anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı yapılacak olan diğer araştırmalar için en etkin doz konsantrasyonları 48 ve 72 saat bitki uygulamalarının IC_{50} değerleri ve bu değerlere uygun doz konsantrasyon değerleri seçilmiştir. Sonuç olarak yer elması yumru ekstraktının MCF-7 hücre hattı için 48 saatlik inkübasyonu sonucu, %50'sini öldürdüğü en etkin doz olan 100µM konsantrasyonu ve kontrol grubu olarak %50 'den fazla canlılık görülen 50µM ve %50 'den az canlılık görülen 20µM konsantrasyonları, 48 saatteki yer elması kabuk ekstraktının MCF-7 hücre hattı için %50'sini öldürdüğü en etkin doz olan 134µM konsantrasyonu ve kontrol grubu olarak %50 'den fazla canlılık görülen 10µM, 50µM ve 100µM konsantrasyonları antimetastatik ve apoptotik etkilerin incelenmesi için seçilmiştir. Aynı şekilde şekilde 72 saatteki yer elması yumru ekstraktının MCF-7 hücre hattı için %50'sini öldürdüğü en etkin doz olan 20µM konsantrasyonu ve kontrol grubu olarak %50 'den fazla canlılık görülen 10µM ve %50 'den az canlılık görülen 40µM konsantrasyonları ve 72 saatteki yer elması kabuk ekstraktının MCF-7 hücre hattı için %50'sini öldürdüğü en etkin doz olan 5µM konsantrasyonu ve kontrol grubu olarak bir alt ve üst dozları olan 2.5µM ve 20µM konsantrasyonları antimetastatik ve apoptotik etkilerin incelenmesi için seçilmiştir.

Kontrol grubu olarak kullanılmış olan MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hattının yer elması yumru ve kabuk ekstraktları üzerinde canlılığın %80'lerin altına düşmediği ve böylece toksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Canlılık oranının yüksek olduğu bu durumlarda hücre invazyon ve adezyon analizlerinde kontrol grubundan farklı sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle antimetastatik etkilerinin araştırılması için yapılmış olan hücre adezyon ve invazyon analizlerinde MCF-12A hücre hattı kullanılmamıştır. Apoptotik etkilerinin araştırılması için ise XTT sonucunda elde edilen ve %50'sini öldürdüğü en etkin dozun en anlamlı sonucu olan kabuk ekstraktının 225 µM konsantrasyonu kullanılmıştır.

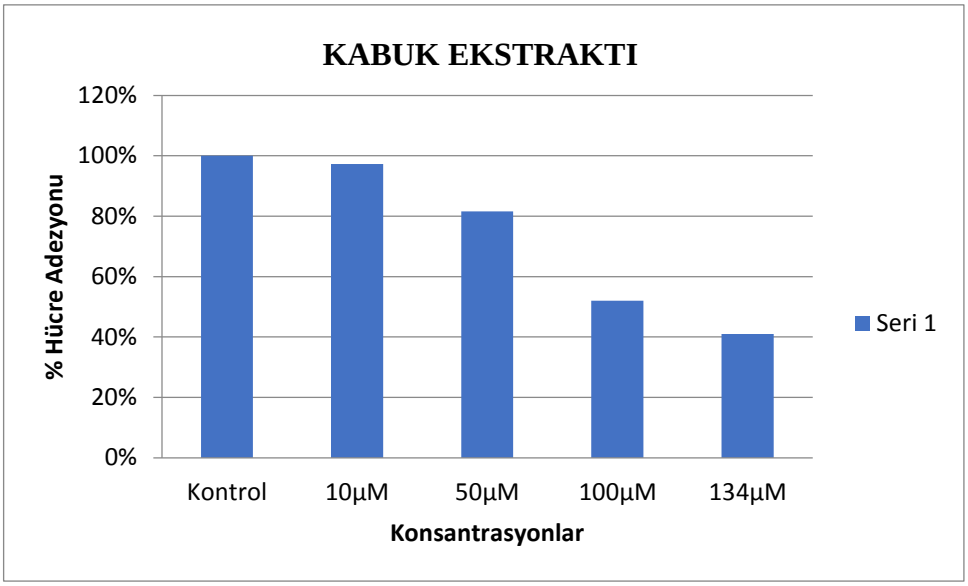
4.3. Yer Elması Ekstraktların MCF-7 Hücre Adezyonu Üzerine Etkilerinin Sonuçları

4.3.1. 48 saat sonuçları

Vybrant Hücre Adezyon Analiz Kiti kullanılarak yapılan adezyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 20 µM, 50 µM 100 µM konsantrasyonlarında 48 saat yer elması yumru ekstraktı uygulamasının kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %19,%29 ve %50 şeklinde anlamlı bir biçimde azalmış olduğu, IC_{50} dozunun düz değeri olan 100 µM konsantrasyonunda anlamlı bir sonuç elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.11). Bununla birlikte; 10 µM,50 µM, 100 µM ve 134 µM konsantrasyonlarında 48 saat yer elması kabuk esktraktı uygulanmasının hücrelerin adezyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %3, %18, %48 ve %59 şeklinde azalttığı ve anlamlı bir sonuç elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



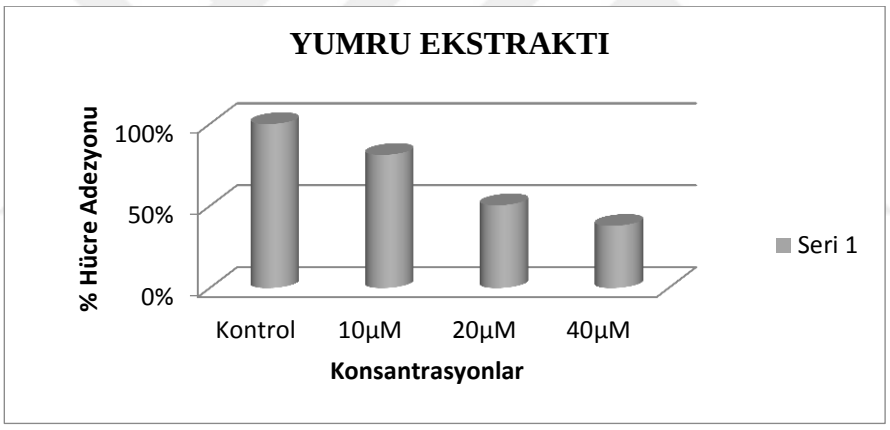
Şekil 4.11. Yer elması yumrusunun MCF-7 hücre hattı üzerine 48 saat uygulamasının adezyon üzerine konsantrasyona bağlı etki grafiği.



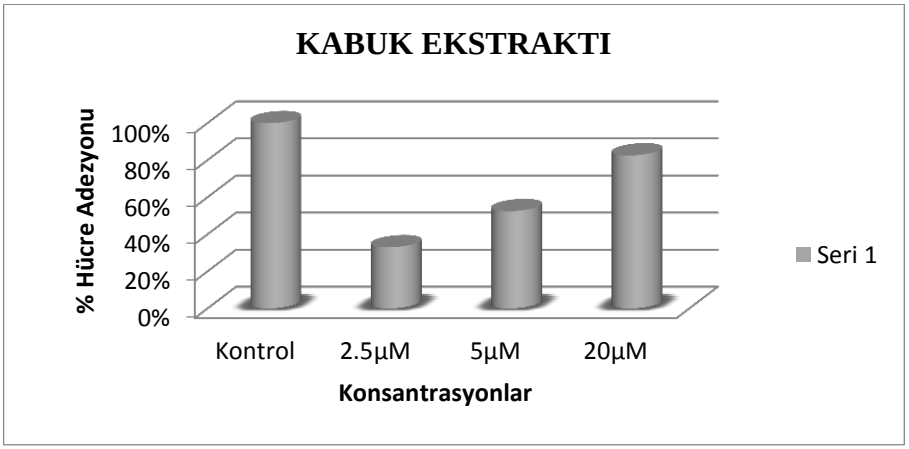
Şekil 4.12. Yer elması kabuğunun MCF-7 hücre hattı üzerine 48 saat uygulamasının adezyon üzerine konsantrasyona bağlı etki grafiği.

4.3.2. 72 saat sonuçları

Vybrant Hücre Adezyon Analiz Kiti kullanılarak yapılan adezyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 10 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarında 72 saat yer elması yumru ekstraktı uygulanmasının hücrelerin adezyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %19, %50 ve %62 oranında azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Bununla birlikte, MCF-7 hücre hattında 2.5 µM,5 µM 20 µM konsantrasyonlarında 72 saat yer elması kabuk uygulanmasının hücrelerin adezyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, %67, %47 ve %17 oranında anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). 72 saat bitki ekstraktı uygulamasında 2,5 µM ve 5 µM konsantrasyonluk kabuk özütünün MCF-7 meme kanseri hücre adezyonuna anlamlı bir şekilde etki ettiği, yumru ekstraktlarının ise 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücre adezyonuna anlamlı derecede etki ettiği belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Yer elması yumrusunun MCF-7 hücre hattı üzerine 72 saat uygulamasının adezyon üzerine konsantrasyona bağlı etki grafiği.



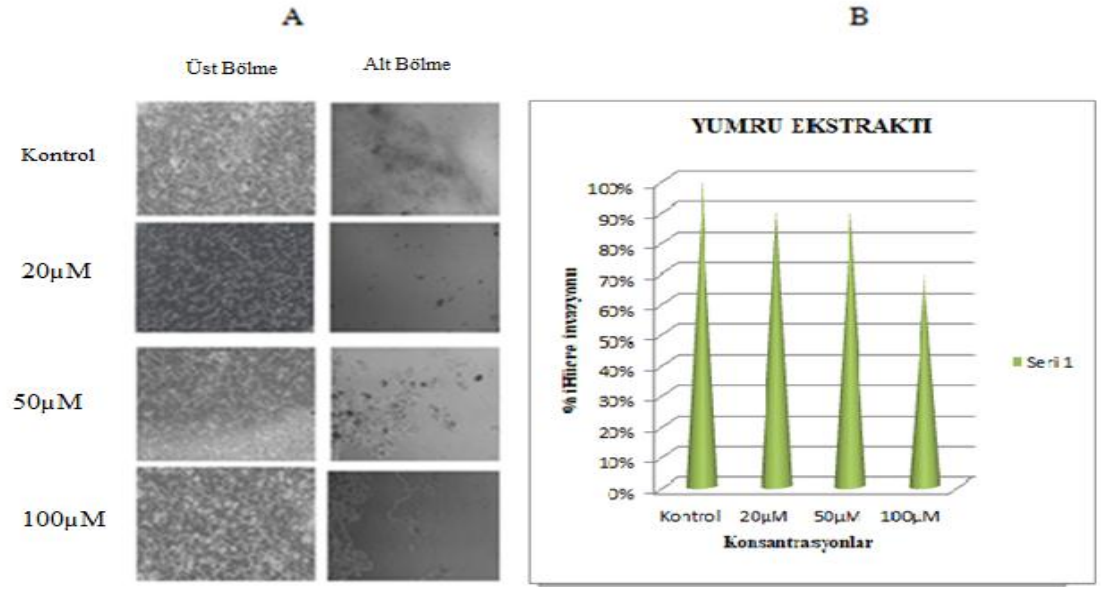
Şekil 4.14. Yer elması kabuğunun MCF-7 hücre hattı üzerine 72 saat uygulamasının adezyon üzerine konsantrasyona bağlı etki grafiği.

4.4.Yer Elması Ekstraktların MCF-7 Hücre İnvazyonu Üzerine Etkilerinin Sonuçları

4.4.1. 48 saat sonuçları

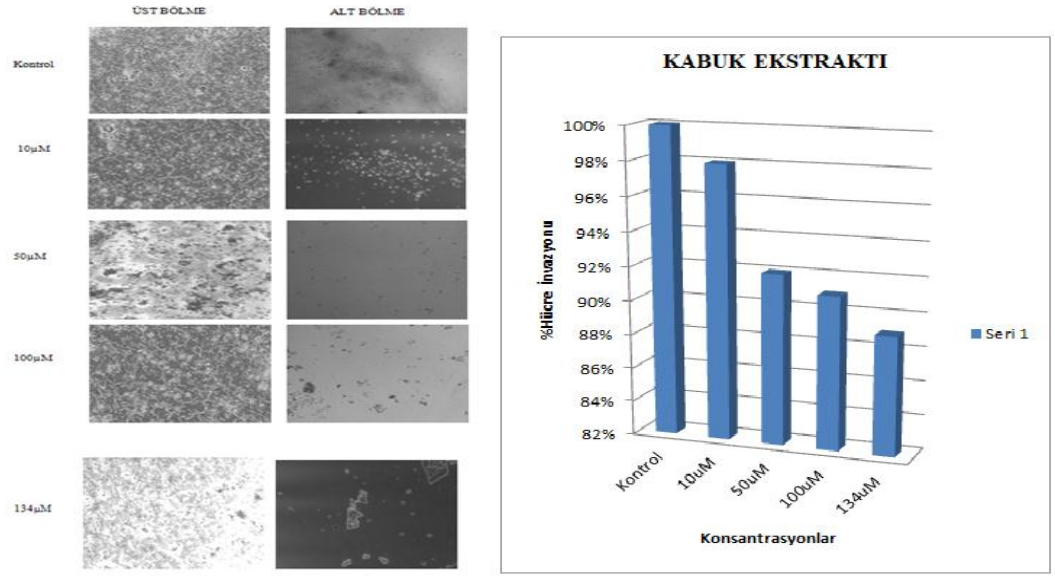
"EZCell Cell İnvasion Assay" Kiti kullanılarak yapılan invazyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 20 µM,50 µM 100 µM konsantrasyonlarında 48 saat yer elması yumru ekstraktı uygulanmasının hücrelerin invazyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %2, %30 ve %35 oranında azalmış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre 48 saat yumru ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde invazyona 50 µM 100 µM konsantrasyonlarında etkili bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15a ve b).

Bununla birlikte, hücre invazyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 10 µM,50 µM 100 µM ve 134 µM konsantrasyonlarında 48 saat yer elması kabuk ekstraktı uygulanmasının hücrelerin invazyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %2, %8, %9 ve %11 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil4.16a).



Şekil 4.15.a. Yer elması yumrusunun 48 saat MCF-7 hücreleri üzerindeki inkübasyonunun ışık mikroskobu görüntüleri(Leica), **b**. Floresan mikroplaka okuyucu absorbans sonuçları (Biotek).

a **b**

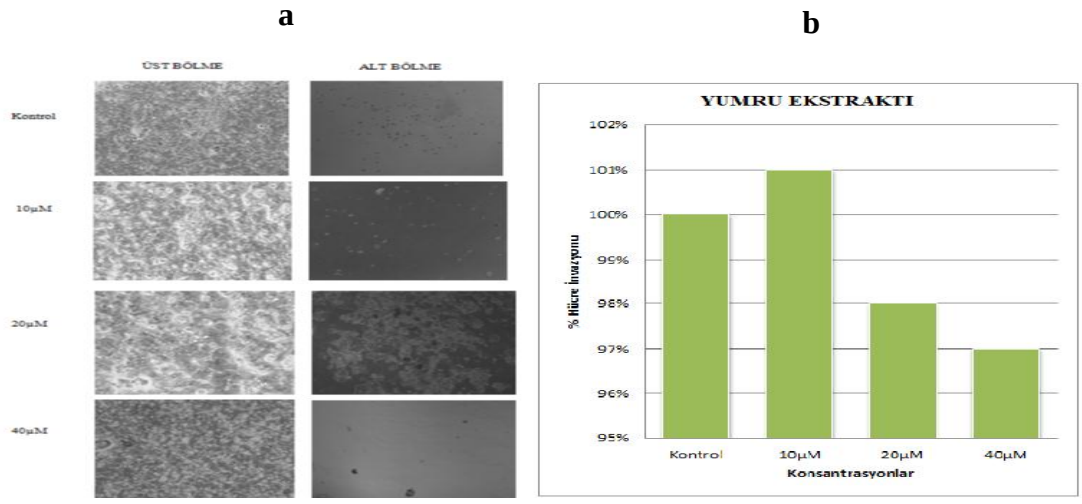


Şekil 4.16.a. Yer elması kabuğunun 48 saat MCF-7 hücreleri üzerindeki inkübasyonunun ışık mikroskobu görüntüleri (Leica), **b**. Floresan mikroplaka okuyucu absorbans sonuçları (Biotek).

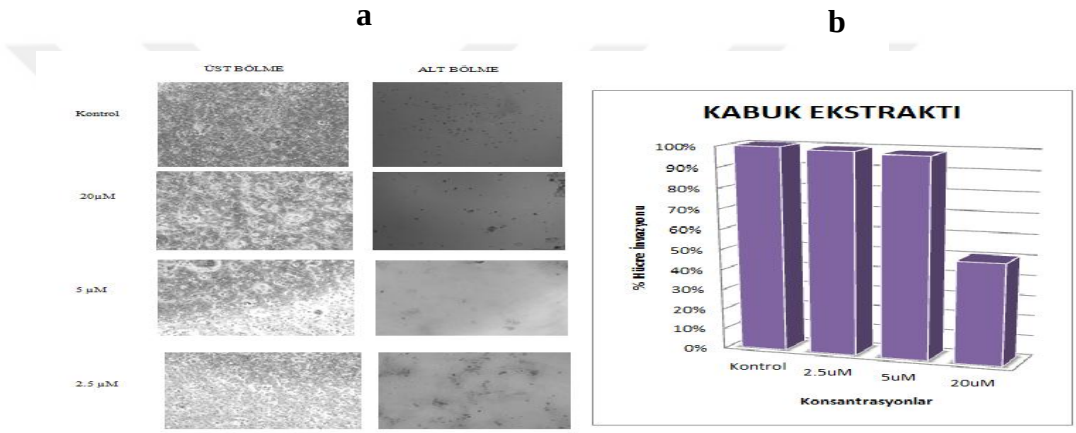
4.4.2. 72 saat sonuçları

EZCell Cell İnvasion Assay" Kiti kullanılarak yapılan invazyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 10 µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarında 72 saat yer elması yumru uygulanmasının hücrelerin invazyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %1 oranında arttırıp, %2 ve %3 oranında azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17.a ve b).

EZCell Cell İnvasion Assay" Kiti kullanılarak yapılan invazyon analizi ile, MCF-7 hücre hattında 2.5 µM, 5 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında 72 saat yer elması kabuk uygulanmasının hücrelerin invazyon özelliklerini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %1, %2 ve %50 oranında azalış olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.18.a ve b). Elde edilen verilere göre 20 µM konsantrasyonun etkili olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17.a. Yer elması yumrusunun 72 saat MCF-7 hücreleri üzerindeki inkübasyonunun invazyon Işık mikroskobu görüntüleri (Leica,40x), **b.** Floresan mikroplaka okuyucu absorbans sonuçları (Biotek).



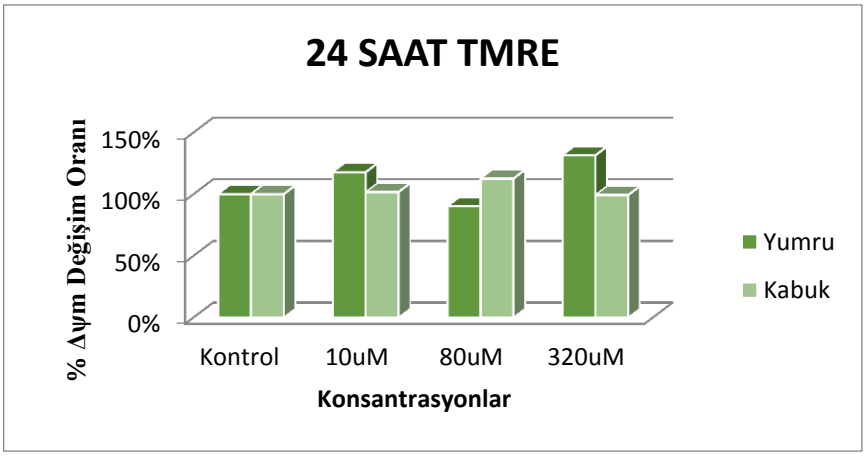
Şekil 4.18.a. Yer elması kabuğunun 72 saat MCF-7 hücreleri üzerindeki inkübasyonunun invazyon Işık mikroskobu görüntüleri (Leica,40x), **b.** Floresan mikroplaka okuyucu absorbans sonuçları (Biotek).

4.5. Yer elması ekstratlarının MCF-7 hücre hattı üzerindeki TMRE boyama ile mitokondriyal membran potansiyeli (δψm) ölçüm sonuçları

4.5.1. 24 saat sonuçları

Yer elması yumrusunun 10 µM, 80 µM ve 320 µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki 24 saat inkübasyonunun TMRE boyası ile boyanmasının floresan okuyucuda (BioTek) alınan sonuçlarına göre mitokondriyal membran potansiyelinde kontrol grubuna göre sırasıyla %18'lik artış, %10'luk azalış ve %32 'lik artış gözlenmiştir. Yer elması kabuğunun 10µM, 80µM ve 320µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki 24 saat inkübasyonunun TMRE boyası ile boyanmasının floresan okuyucuda (BioTek) alınan sonuçlarına göre mitokondriyal membran potansiyelinde

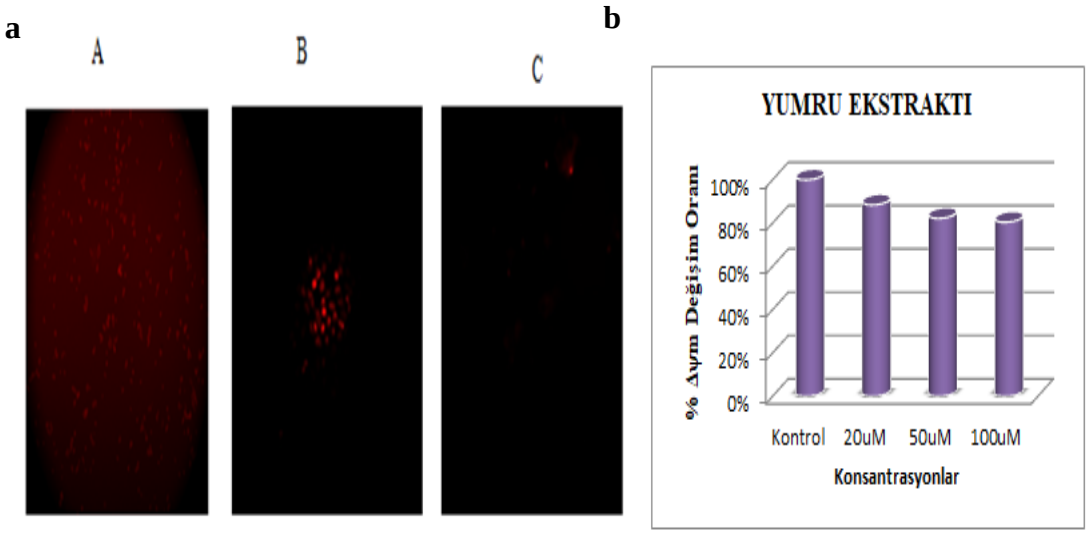
kontrol grubuna göre sırasıyla %2'lik, %13'lük ve %2 'lik artış gözlenmiştir (Şekil 4.19).



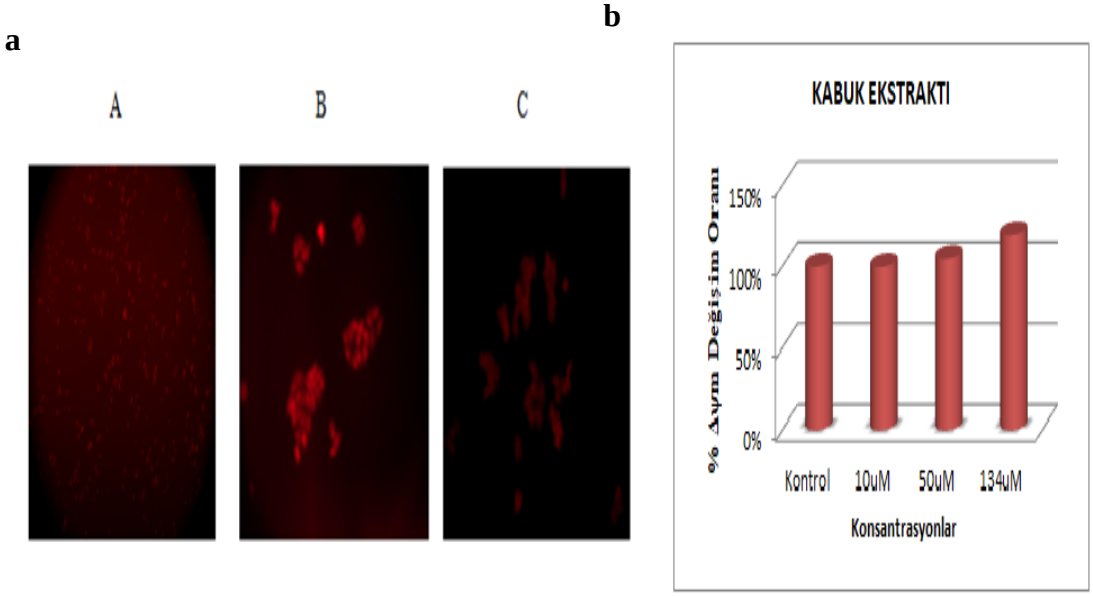
Şekil 4.19. Yer elması yumrusunun ve kabuğunun MCF-7 hücre soyu üzerine 24 saat inkübasyonunun TMRE boyama % absorbans değişim grafiği.

4.5.2. 48 saat sonuçları

Yer elması yumru ekstraktlarının 20µM, 50µM ve 100µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki 48 saat inkübasyonunun TMRE boyası ile boyanmasının floresan okuyucuda (Biotek) alınan absorbans sonuçlarına göre mitokondriyal membran potansiyelinde kontrol grubuna göre sırasıyla %12, %18 ve %20 'lik azalma gözlenmiştir (Şekil 4.20.a ve b). Yer elması kabuğunun 10 µM, 50 µM, ve 134 µM konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerindeki 48 saat inkübasyonunun TMRE boyası ile boyanmasının floresan okuyucuda (Biotek) alınan sonuçlarına göre mitokondriyal membran potansiyelinde kontrol grubuna göre sırasıyla %0, %5 ve %20 'lik artış gözlenmiştir (Şekil 4.21.a ve b). Bu sonuçlara göre 48 uygulamada kabuk ekstraktı anlamlı bir şekilde mitokondriyal membran potansiyelini arttırıken yumru ekstraktında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.20.a. Yer elması yumru ekstraklarının MCF-7 hücreleri üzerine 48 saat inkübasyonunun TMRE ile boyanarak alınan floresan mikroskop görüntüsü (ZEN 40X). A. Hücre kontrol, B. 20 µM ve C. 100 µM, **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**



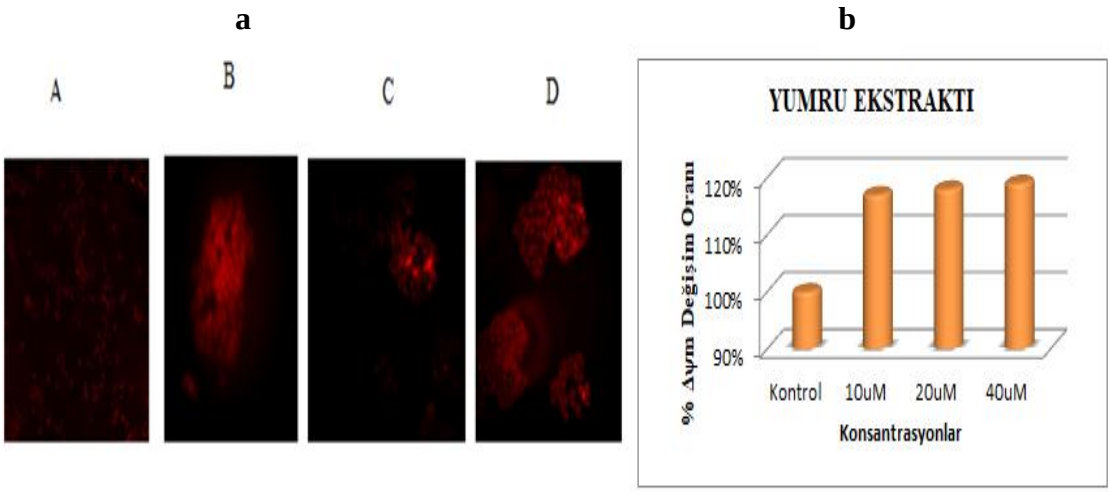
Şekil 4.21.a. Yer elması yumru ekstraklarının MCF-7 hücreleri üzerine 48 saat inkübasyonunun TMRE ile boyanarak alınan floresan mikroskop görüntüsü (ZEN 40X). A. Hücre kontrol, B. 50 µM ve C. 134 µM, **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**

4.5.3. 72 saat sonuçları

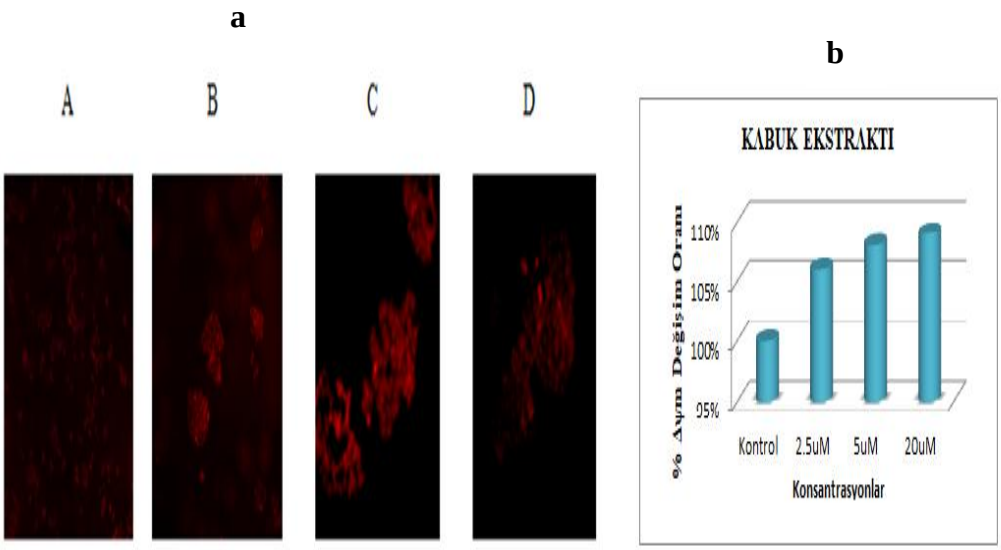
Sırasıyla; 10µM, 20µM ve 40µM konsantrasyonlarında yer elması yumru ekstraklarının MCF-7 hücrelerindeki 72 saat uygulanmış TMRE ile floresan mikroplaka okuyucuda (Biotek) elde edilen floresans ölçümleri sonuçlarında mitokondriyal

membran potansiyelinde kontrol grubuna göre sırasıyla %18, %17 ve %19 artış gözlenmiştir (Şekil 4.22a ve b).

Sırasıyla; 2.5µM, 5µM ve 20µM konsantrasyonlarında yer elması kabuk ekstraklarının MCF-7 hücrelerindeki 72 saat uygulanmış TMRE ile floresan mikroplaka okuyucuda (Biotek) elde edilen floresans ölçümleri sonuçlarında mitokondriyal membran potansiyelinde kontrol grubuna göre sırasıyla %9, %3 ve %1 artış gözlenmiştir (Şekil 4.23.a ve b).



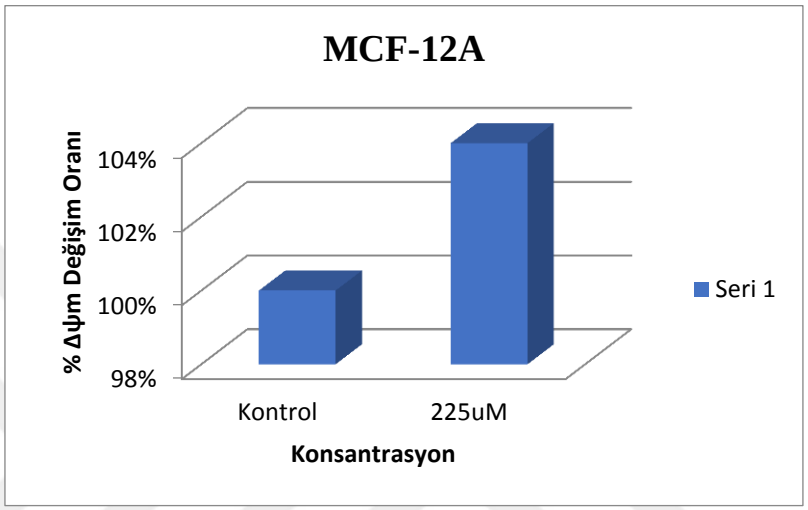
Şekil 4.22.a. Yer elması yumru ekstraklarının MCF-7 hücreleri üzerine 72 saat inkübasyonunun TMRE ile boyanarak alınan floresan mikroskop görüntüsü (ZEN40X). A. Hücre kontrol, B. 10 µM , C. 20 µM ve D.40 µM, **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**



Şekil 4.22.a. Yer elması yumru ekstraklarının MCF-7 hücreleri üzerine 72 saat inkübasyonunun TMRE ile boyanarak alınan floresan mikroskop görüntüsü (ZEN40X). A. Hücre kontrol, B. 10 µM , C. 20 µM ve D.40 µM, **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**

4.5.4. MCF-12A hücrelerinin TMRE boyama sonuçları

225µM konsantrasyonunda yer elması kabuk ekstraktının 72 saat MCF-12A hücreleri üzerindeki inkübasyonu sonrasında TMRE boyama ile mitokondriyal membran potansiyelinde kontrole göre %4'lük bir artış gözlenlenmiştir (Şekil 4.23). Bu sonuç hücrelerin apoptoza gittiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.23. Yer elması kabuğunun MCF-12A hücrelerindeki 72 saat inkübasyonunun TMRE boyası ile absorbans ölçüm grafiği

4.6. Yer Elması Ekstratlarının MCF-7 Hücre Hattı Üzerindeki Annexin V/7AAD Boyama Sonuçları

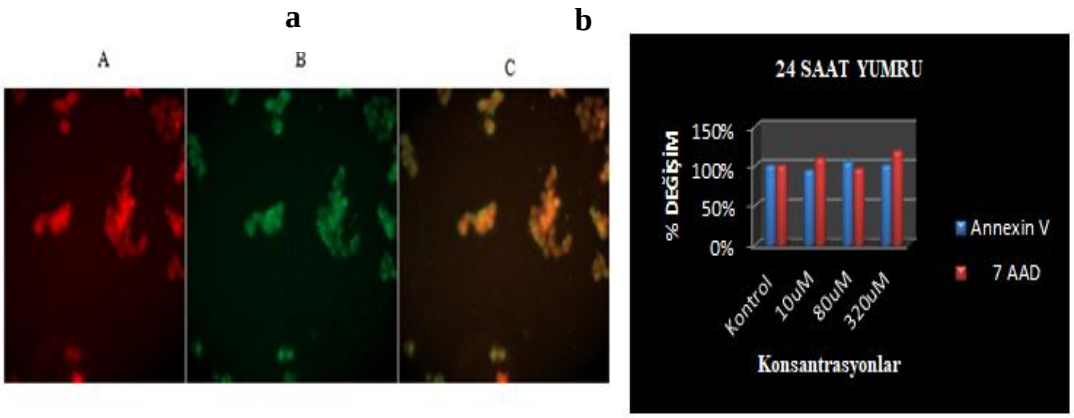
Bu çalışmada zamana ve doza bağlı sitotoksik etkileri belirlenen *Asteraceae* familyasına ait olan yer elması (*Helianthus tuberosus* L .) yumrusu ve yerelması kabuk ekstraktlarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonundaki erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranların belirtilebilmesi için Annexin Vve 7-AAD (Aminoactinomycin D) boyaları kullanılmıştır. Annexin V, apoptoza giden hücrelerde hücre zarının yüzeyine çıkan fosfatidilserin (PS) moleküllerine bağlanan Ca^{+2} bağımlı bir proteindir. 7-AAD (Aminoactinomycin D) ise bir nükleik asit boyasıdır geç apoptotik hücrelerin tespiti için kullanılmaktadır. Annexin-V ve 7-AAD beraber kullanıldığında, erken apoptotik hücreler anneksin-V ile boyanırken, geç apoptotik hücreler hem annexin-V hem de 7-AAD ile boyanırlar. Canlı hücreler boyanma göstermezler. Bu çalışmada IC_{50} değerleri üzerinden belirlenen konsantrasyonlar kullanılmıştır. MCF-7 hücre apoptozu Annexin V kullanılarak floresan mikroskopta (ZEN 2.3 SP1) değerlendirilmiş ve ayrıca floresan

mikrolplaka (Biotek) okuyucuda Annexin V/7AAD boyaları okutularak absorbans sonuçları elde edilmiştir.

4.6.1. 24 saat sonuçları

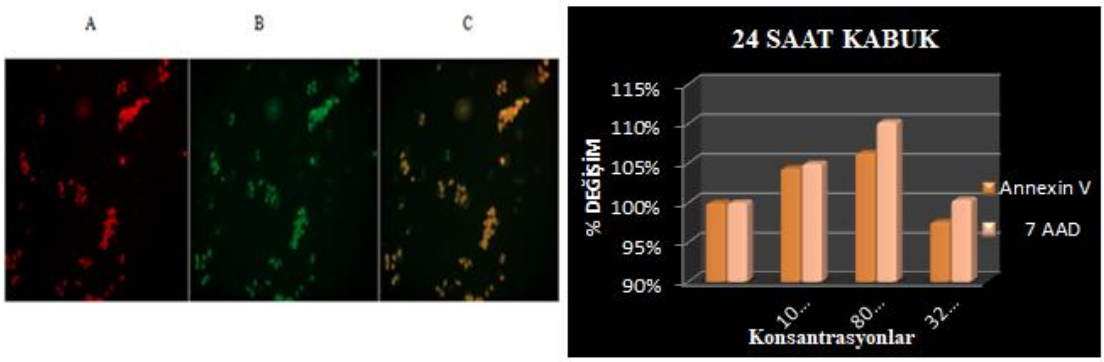
Yer elması yumru eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 24 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan mikroplaka okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği Şekil 4.24.b' de verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması yumru ekstraktlarının 10µM, 80 µM ve 320 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %1, %4 ve %0,1'i erken apoptoza giderken; %9, %1 ve %0,8'inin geç apoptoza gittiği görülmektedir. Sonuç olarak,erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerin konsantrasyona bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlenmiştir.

Yer elması kabuk eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 24 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği Şekil 4.25.b' de verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması kabuk ekstraktlarının 10µM, 80 µM ve 320 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %4, %6 ve %1'i erken apoptoza giderken; %5,%10 ve %0,1'inin geç apoptoza gittiği görülmektedir.



Şekil 4.24.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması yumrusunun (80 µM Annexin V/ 7AAD boyaması (ZEN,40X büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b.** absorbans ölçüm grafiği.

a **b**



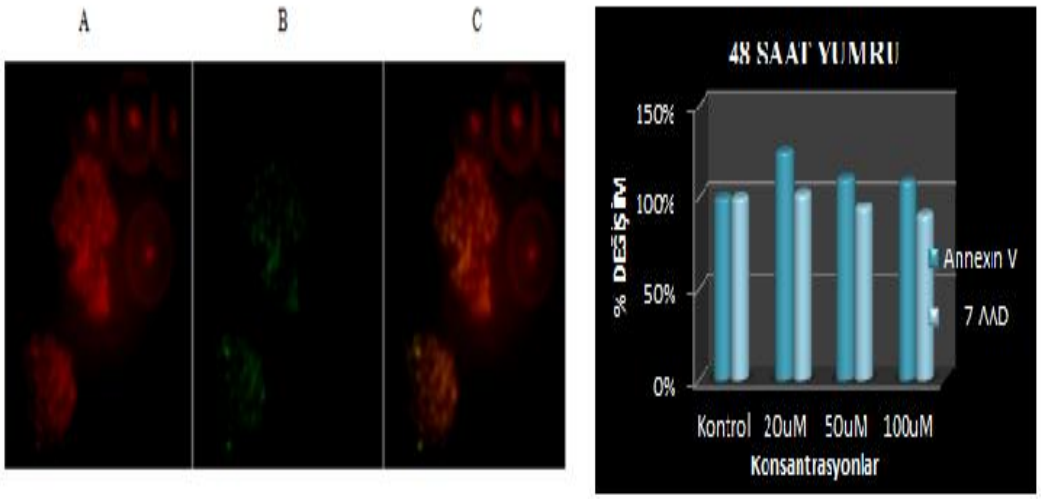
Şekil 4.25.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması kabuğunun (80 µM Annexin V/ 7AAD boyaması(ZEN,40X büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b**. absorbans ölçüm grafiği.

4.6.2. 48 saat sonuçları

Yer elması yumru eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 48 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği yukarıda verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması yumru ekstraktlarının 20µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %26, %10 ve %9'i erken apoptoza giderken; %2,%1 ve %0,9'unun geç apoptoza gittiği görülmektedir.

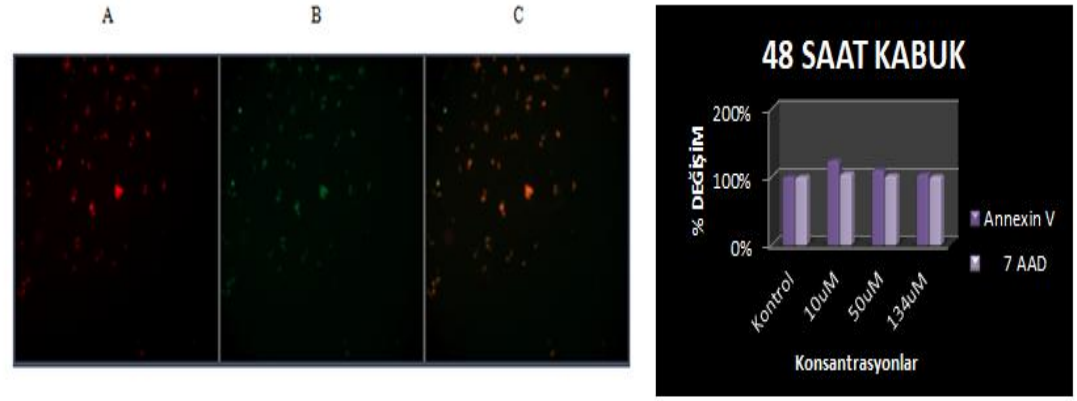
Yer elması kabuk eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 48 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği yukarıda verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması kabuk ekstraktlarının 10µM, 50 µM ve 134 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %24, %10 ve %4'ü erken apoptoza giderken; %5,%2 ve %1'ünün geç apoptoza gittiği görülmektedir.

a **b**



Şekil 4.26.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması yumrusunun (100 µM Annexin V/ 7AAD boyaması(ZEN,40X büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b**. absorbans ölçüm grafiği.

a **b**



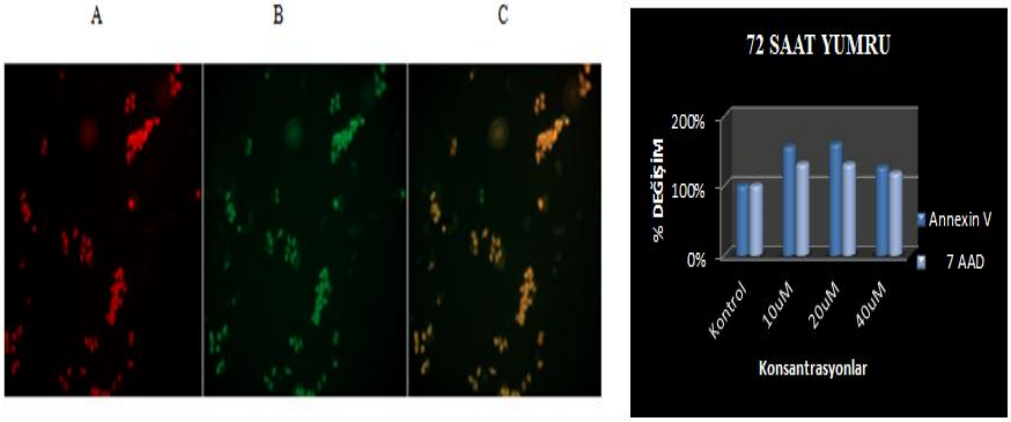
Şekil 4.27.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması kabuğunun (134 µM Annexin V/ 7AAD boyaması (ZEN,40X büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**

4.6.3. 72 saat sonuçları

Yer elması yumru eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 72 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği yukarıda verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması yumru ekstraktlarının 10µM, 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %56, %60 ve %27'si erken apoptoza giderken; %31, %31 ve %18'inin geç apoptoza gittiği görülmektedir.

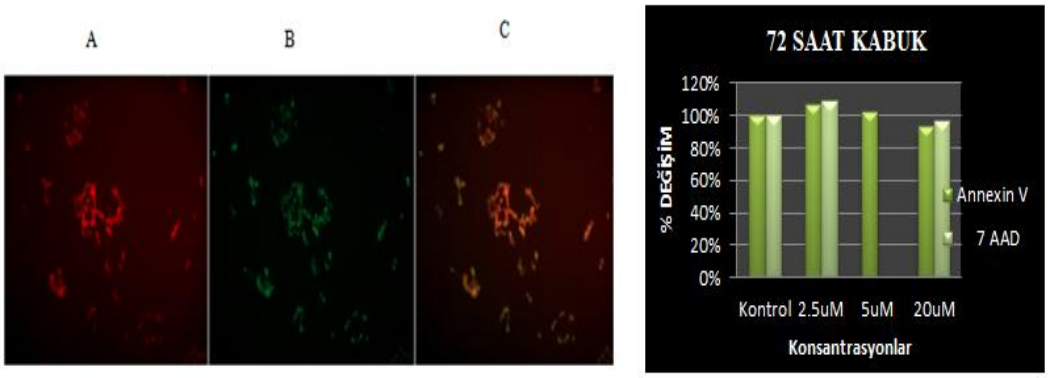
Yer elması kabuk eksraktlarının konsantrasyona bağlı olarak 72 saat MCF-7 hücre hattı üzerine uygulanması ile erken apoptotik ve geç apoptotik hücre oranları floresan okuyucu ile (Biotek) belirlenmiştir. Annexin V boyama ile erken apoptotik ve 7 AAD boyama ile geç apoptotik hücrelerin kontrole göre % değişim grafiği yukarıda verilmiştir. Bu grafiğe göre yer elması kabuk ekstraktlarının 2.5µM, 5 µM ve 20 µM konsantrasyonlarında kontrole göre sırasıyla %6, %3 ve %0,9'ü erken apoptoza giderken; %9, %1 ve %1'inin geç apoptoza gittiği görülmektedir.

a **b**



Şekil 4.28.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması yumrusunun (40 µM Annexin V/ 7AAD boyaması(ZEN,40X büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**

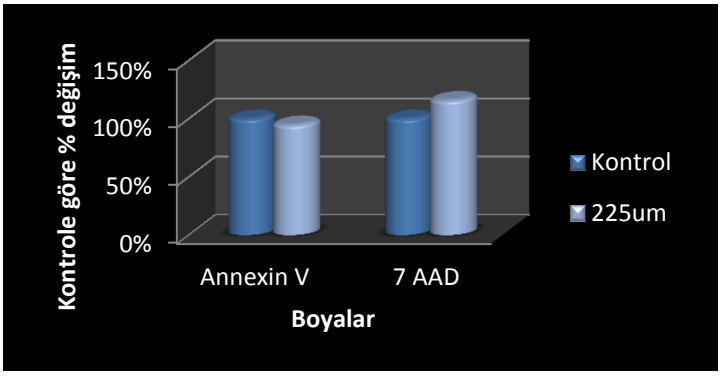
a **b**



Şekil 4.29.a. MCF-7 meme kanser hücre hattında yer elması kabuğunun (5 µM Annexin V/ 7AAD boyaması(X40 büyütme) (A. Annexin V, B. 7 AAD, C. Annexin V/ 7 AAD çakıştırma), **b.** absorbans ölçüm grafiği**.**

4.7. MCF-12A Hücrelerinin Annexın V/ 7AAD Boyama Sonuçları

225µM konsantrasyonunda yer elması kabuk ekstraktının 72 saat MCF-12A hücreleri üzerindeki inkübasyonu sonrasında Annexin V/ 7AAD boyaması sonucunda, erken apoptotik hücrelerin kontrole göre %5 azaladığı ve geç apoptotik hücrelerin ise kontrole göre %4 arttığı belirlenmiştir (Şekil4.30).



Şekil 4.30. MCF-12A sağlıklı meme epitel hücre hattında yer elması kabuğunun (225 µM) Annexin V/ 7AAD boyama absorbans ölçüm grafiği**.**

5. TARTIŞMA

Kanser dünya genelinde ölüm oranı en yüksek olan hastalıklardan birisidir. Dünyada, kadınlardaki kanser sebepli ölümlerin başında meme kanseri gelmektedir. Yapılan epidemiyolojik ve deneysel araştırmalar, beslenme yoluyla alınan doğal içeriklerin kemopreventif ajanlar kadar etkili olabileceğini ve meme kanseri görülme sıklığının azalacağını göstermektedir. Son yıllarda bu amaçla farklı yöntemler kullanılarak yapılan araştırmalarla yer elması (*Helianthus tuberosus* L.)'nın antikarsinojenik, toksik vb. etkileri birçok kanserli hücre tipinde incelenmiştir. Ayrıca yer elması, içerisinde birçok hastalığa karşı koruyucu özelliği olan "inülin" maddesi bulundurması ve bağırsaklardaki toksin maddelerin yok olmasına da yardımcı olmasıyla kanser tedavisi için başvurulan alternatif bir bitkidir.

Literatürde yer elmasının sitotoksisitesinin MTT yöntemi ile yapılmış oldukça nadir çalışma bulunmasına rağmen, antimetastatik ve apoptotik etkilerinin araştırılmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Griffaut ve ark. (2007)'nın yapmış olduğu çalışma bu çalışma ile uyumlu olarak yer elması yumrularının tümör hücrelerine karşı spesifik sitotoksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. Benzer başka bir çalışmada yer elması bitkisinin tüm olarak metanol ekstraksiyonu yapılmış ve ent-17-oksokaur-15, -en-19-oik asit, ent-17-hidroksikaur-15, -en-19-oik asit, ent-15b-hidroksikaur-16,-en-19-oik asit metil ester, ent-15-nor-14-oksolabda-8, 12E-dien-18-oik asit, 4,15-izoatriplikolit angelat, 4,15-izoatriplikolid metilakrilat, (+) - pinoresinol, ()-oliolid ve vanilin olmak üzere 9 bileşiğin yer elması bitkisinin bu çalışmada olduğu gibi MCF-7 meme kanseri hücre soyundaki sitotoksisitesi değerlendirilmiş ve 4,15-izoatriplikolit angelat ve 4,15-izoatriplikolid metilakrilat bileşiklerinin sitotoksik ajan olduğu rapor edilmiştir (Pan ve ark., 2009). Bu çalışmada ise yer elması yumrusunun ve kabuğunun total ham ekstraksiyonunun sitotokisk etkisi 48 saat için yumru ekstraktı daha etkiliyken 72 saat için kabuk ekstratının daha etkili olduğu bulunmuştur.

Diğer yandan, Yuan ve ark. (2013)'nın yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, yer elması yapraklarından elde edilen bileşiklerin (Hidroksi-8β-tigloyloksi-1,10-dehidroaliglovinin(1) yeni bilinen bir seskiterpen laktonunun ve seskiterpen laktonları (2- 11) ve bilinen iki flavon (12-13)) MCF-7 meme kanseri hücre soyu için sitotoksik

etkisini MTT yöntemiyle 48 saatlik inkübasyon yaparak araştırmışlar ve sonuç olarak bu bileşiklerden bazılarının (seskiterpen laktonlar 1-11'in) MCF-7 hücre hattı için sitotoksik etkisinin bulunduğunu rapor etmişlerdir (Yuan ve ark., 2013).Bu çalışmada ise 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon ile yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının MCF-7 ve MCF-12A hücre soylarındaki sitotoksisitesi farklı bir yöntem olan XTT metodu ile analiz edilmiş ve Yuan ve ark.(2013)'nın çalımasını destekler nitelikte 48 saatlik inkübasyonda yer elması yumru ve kabuk esktraktlarının MCF-7 hücre hattında anlamlı sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Yer elmasının yumru ve yapraklarının ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan birkaç çalışmada da yer elmasının %70'lik etanol ve su ekstraksiyonlarının daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Petkova ve ark., 2014) ve yer elması yaprak ekstraktının yumru ekstraktına göre daha yüksek antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir (Nizioł-Łukaszewska ve ark., 2018).

Bu çalışmada yer elmasının hem yumrusunun hem de kabuğunun metanol ekstraktının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki antimestatik etkileri adezyon ve invazyon analizleri ile ilk defa belirlenmiş olduğu için tartışma oldukça sınırlı kalmıştır. Yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde saatlere ve konsantrasyonlara göre adezyon kıyaslaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yer elması yumru ve ekstraktlarının 48 saat uygulamasının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde artan konsatrasyona bağlı olarak % hücre adezyonunu azalttığı belirlenmiştir. 48 saat için, kabuk ekstraktının yumru ekstraktına göre daha etkili olduğu gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde 72 saat yer elması yumrusu ve kabuğu uygulamasından elde edilen sonuçlara göre her iki ekstraktın da % hücre adezyonu üzerinde anlamlı azaltıcı etkisi olduğu fakat, kabuk ekstraktlarının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde % invazyona etkisi kit ile incelenmiştir. Elde edilen verilere göre ekstraktların 48 saat uygulamasında yumrunun kabuğa göre daha etkili olduğu görülürken72 saat uygulamasında kabuk ekstraktlarının yumruya göre daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan birçok farklı bitki ekstraktlarını; örneğin *Leucobryum bowringii* Mitt karayosunu ekstraktının (Manoj ve ark.2012), Juglonun (2015), yenidünya yaprak ve tohum ekstraktlarının (Kim ve ark.2009) bu çalışmada olduğu gibi MCF-7 veya diğer kanser hücrelerindeki adezyon ve invazyonu inhibe ettikleri rapor edilmiştir

Literatürde yer elmasının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki apoptotoik etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır bu nedenle bu çalışma özgün değer taşımaktadır. Mitokondri işlev bozukluğu apoptoz indüklenmesinde önemli bir etkendir. Bazı apoptotik sistemlerde Δψm (membran potansiyeli) kaybı olabilir ya da olmayabilir. TMRE, pozitif yüklü floresans bir boya olup hücredeki negatif yüklü (aktif) mitokondrileri boyar. Depolarize (inaktif) mitokondrilerde membran potansiyelinin azalmasından dolayı gözlenen floresans miktarı da azalır.

XTT metodu ile sitotoksik açıdan etkin oduğu tespit edilen yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının zamana bağlı IC_{50} dozları ve bu dozlara uygun seçilen kontrol dolzarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücreleri üzerindeki mitokondriyal membranda meydana gelen değişiklikler TMRE boyama ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, yer elması ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücrelerine 24 saat uygulamasının TMRE boyası ile boyanması ile hücrelerin % mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişiklikler kontrol grubu ile kıyaslanmış ve sonuç olarak yumru ekstraktının daha fazla artışa sebep olduğu böylece yumru ekstraktının daha etkili olduğu belirlenmiştir. 48 saat uygulamasında, kabuk ekstraktının yumruya göre 72 saat uygulamasında ise bunun aksine yumru ekstraktının daha etkili olduğu grülmüştür. MCF-12A sağlıklı meme epitel hücrelerinin XTT metodu ile belirlenen toksik dozu yer elması kabuk ekstraktının 72 saat uygulamasında 225µM konsantrasyonunda bulunmuştur. Bu nedenle kabuk ekstraktının 225 µM konsantrasyonu TMRE ile boyanmış ve sonuç olarak hücrelerin % mitokondriyal membran potansiyelinde %4' lük bir artış meydana gelmiştir.

Apoptoza yönlendirilen belirlemek için Annexin V/ 7 AAD boyamasıdır. Yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının zamana bağlı IC_{50} dozları ve bu dozlara uygun seçilen kontrol dolzarının MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF-12A sağlıklı meme epitel hücreleri üzerine apoptotik etkileri Annexin V/ 7 AAD yöntemi ile floresan mikroplaka okuyucuda istatistiksel olarak ve floreasan mikroskopta görüntü alınarak belirlenmiştir. IC_{50} değerlerine göre belirlenen dozlar kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. Elde edilen verilere göre, Yer elması yumru ekstraktının 48 saat uygulamada kabuğa göre apoptozu daha çok arttırdığı gözlenmiştir Bununla beraber, 72 saat inkübe edilen yer elması yumrusunun IC_{50} dozu olan 20µM konsantrasyonun kontrol grubuna göre erken apoptozu %60 oranında arttırdığı ve geç apoptozu ise kontrol grubuna kıyasla %31 oranında arttırdığı ve 72 saat MCF-7 hücreleri ile inkübe edilen yer elması yumrusu içn kontrol dozu olan 10µM konsantrasyonun kontrol

grubuna göre erken apoptozu %56 oranında arttırdığı ve geç apoptozu ise kontrol grubuna kıyasla %31 oranında arttırdığı gözlemlenmiştir. Elde edilen verilere göre 72 saat uygulamasında her iki yöntemde de yumru ekstraktlarının daha etkili olduğu birbibirini destekler nitelktedir. Bunlara ek olarak, MCF-12A sağlıklı meme epitel hücrelerinde, sitotoksik açıdan etkin oduğu tespit edilen yer elması kabuk ekstraktının 72. saatteki IC_{50} dozu olan 225 µM dozu üzerinde apoptoz tayini yapılmıştır. Elde edilen verilere göre MCF-12A hücrelerinin 225 µM konsantrasyonunun Annexin V/ 7AAD boyama sonuçlarına göre kontrole kıyasla erken apoptotik hücrelerin %4 oranında azaldığı ve geç apoptotik hücrelerin ise kontrole kıyasla %16 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. TMRE boyama ve Annexin V boyama sonuçları MCF-12A hücreleri için birbirini destekler niteliktedir.

5.1. Öneriler

Bu çalışmada yer elması yumru ve kabuk ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik, metastatik ve apoptotik etkileri belirlenmiştir. Elde edilen verilere gör yer elması ekstraktlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmda yer elmasının MC-7 meme kanseri hücreleri üzerinde antimetastastik özellikleri belirlemek için yapılan adezyon ve İnvazyon analizleri ile ilk defa belirlenmiş ve sonuçları birbirini destekler nitelikte bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kabuk ekstraktlarının antimetastatik özelliklerinin daha etkili olduğu görülmüştür.

Çalışmamız ile yer elmasının MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki antimetastatik ve apoptotik etkilerinin varlığı ilk kez belirlenmesi ile yer elmasının meme kanseri tedavisi için yeni bir terapötik ajan adayı olabileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

ACS, 2019, Breast Cancer, https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html:

Aduldecha, C., Kaewpradit, W., Vorasoot, N., Puangbut, D., Jogloy, S. ve Patanothai, A., 2016, Effects of water regimes on inulin content and inulin yield of Jerusalem artichoke genotypes with different levels of drought tolerance, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40 (3), 335-343.

Akkuş, D. ve Sönmez, M. F., Hücre Adezyon Molekülü: Nektin, *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 21 (3), 205-211.

Aksoy, G., 2000, Birincil ve ikincil korumada hemşirenin rolü, *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitisü Yayınları*, 6, 48-53.

Akşit, H. ve Bildik, A., 2008, Apoptozis, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 55-63.

Alahari, S. K., Reddig, P. J. ve Juliano, R., 2002, Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors, In: International review of cytology, Eds: Elsevier, p. 145-184.

Alison, M. R., 2001, Cancer, In: Encyclopedıa Of Lıfe Scıences, Eds, *Nature Publishing Group* www.els.net, p.

Aliustaoğlu, M., 2009, Temel Kanser Fizyopatolojisi, *Klinik Gelişim*, 22 (3), 46-49.

Angahar, L. T., 2017, An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction, *MOJ Biology and Medicine*, 1 (4).

Anonim, Hücre Adezyonu Ve Hücre Dışı Matriks (Ekstrasellüler Matriks-Ecm), https://studylibtr.com/doc/1384773/h%C3%BCcre-adezyonu-ve-h%C3%BCcre-d%C4%B1%C5%9F%C4%B1-matriks--ekstrasell%C3%BCler-matriks:

Baba, A. I. ve Câtoi, C., 2007, Comparative oncology, Publishing House of the Romanian Academy Bucharest, p.

Baba, H., Yaoita, Y. ve Kikuchi, M., 2005, Sesquiterpenoids from the leaves of Helianthus tuberosus L, *J Tohoku Pharm Univ*, 52, 21-25.

Bach, V., Jensen, S., Clausen, M. R., Bertram, H. C. ve Edelenbos, M., 2013, Enzymatic browning and after-cooking darkening of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.), *Food chemistry*, 141 (2), 1445-1450.

Baguley, B. C. ve Leung, E., 2011, Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines, In: Breast Cancer-Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways, Eds: InTech, p.

Bar-Dayan, Y., Kaveri, S., Kazatchkine, M. ve Shoenfeld, Y., 2000, Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?, *Medical hypotheses*, 55 (2), 103-108.

Beşli, N., 2018, Metforminin Mcf-7 Hücre Hattında İnvazyon Ve Metastaza Olan Etkisinin Araştırılması ,*İstanbul Üniversitesi*.

Biedrzycka, E. ve Bielecka, M., 2004, Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization, *Trends in Food Science & Technology*, 15 (3-4), 170-175.

Bloom, B. J., Nelson, S. M., Alario, A. J., Miller, L. C. ve Schaller, J. G., 2002, Synovial fluid levels of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1:

relationship to joint inflammation in children with chronic arthritis, *Rheumatology international*, 22 (5), 175-177.
Borenfreund, E. ve Puerner, J. A., 1985, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology letters*, 24 (2-3), 119-124.
Boyle, P., 2008, Dünya Kanser Raporu, *Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu*.
Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A., 2018, Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 68 (6), 394-424.
Brooks, S. C., Locke, E. R. ve Soule, H. D., 1973, Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma, *Journal of Biological Chemistry*, 248 (17), 6251-6253.
Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. ve Speirs, V., 2003, Breast cancer cell lines: friend or foe?, *Breast cancer research*, 5 (2), 89.
Cabello-Hurtado, F., Durst, F., Jorrín, J. V. ve Werck-Reichhart, D., 1998, Coumarins in Helianthus tuberosus: characterization, induced accumulation and biosynthesis, *Phytochemistry*, 49 (4), 1029-1036.
Can, G., 2015, Onkoloji hemşireliği, Nobel Tıp Kitabevleri, p.
Cancer, 2019, https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/statistics: [09.06.2019].
Cancer, C. G. o. H. F. i. B., 2001, Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease, *The Lancet*, 358 (9291), 1389-1399.
Cancer, I. A. f. R. o., 1992, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. v. 55: Solar and ultraviolet radiation.
Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tungland, B. C. ve Slavin, J. L., 2000, Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men, *Nutrition Research*, 20 (2), 191-201.
Chen, F., Long, X., Yu, M., Liu, Z., Liu, L. ve Shao, H., 2013, Phenolics and antifungal activities analysis in industrial crop Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves, *Industrial crops and products*, 47, 339-345.
Comşa, Ş., Cimpean, A. M. ve Raica, M., 2015, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research, *Anticancer research*, 35 (6), 3147-3154.
Coşkun, G. ve Özgür, H., 2011, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20 (3).
Courtney, M. T., Mark, E., Daniel, B., Kenneth, L.M. , 2004, Sabiston Textbook of Surgery p.
Crouch, S., Kozlowski, R., Slater, K. ve Fletcher, J., 1993, The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity, *Journal of Immunological Methods*, 160 (1), 81-88.
Çakır, S., Kafadar, M. T., Arslan, Ş. N., Türkan, A., Kara, B. ve İnan, A., 2016, Meme kanseri tanısı konmuş kadınlarda risk faktörlerinin güncel veriler ışığında gözden geçirilmesi, *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi*, 2 (3), 186-194.
Çalış, İ. U., 2016, Meme kanserinin metastazında sfingozin 1-fosfat ve reseptörlerinin rolü, *ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
Çapanoğlu, G. ve Bakar, E., 2018, Meme Kanseri Ve Meme Kanseri Metastazında Rol Oynayan Moleküler Prognostik Faktörler, *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3 (2), 40-44.

Degterev, A. ve Yuan, J., 2008, Expansion and evolution of cell death programmes, *Nature reviews Molecular cell biology*, 9 (5), 378.

Denoroy, P., 1996, The crop physiology of Helianthus tuberosus L.: a model oriented view, *Biomass and bioenergy*, 11 (1), 11-32.

Diaz, C. ve Schroit, A., 1996, Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry, *Journal of Membrane Biology*, 151 (1), 1-9.

Doll, R. ve Peto, R., 1981, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 66 (6), 1192-1308.

Done, S., 2011, Breast Cancer-Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics, *InTech*, p. IX.

Duke, J. A. ve Wain, K., 1981, Medicinal plants of the world, *Computer index with more than*, 85 (000), 3.

Duke, J. A., 1983, *Helianthus tuberosus* L., In: Handbook of Energy Crops Eds, p.

Duman, İ., 2018, Endometriyum Adenokarsinoma Hec1a Hücrelerinde D Vitamininin Proliferasyon, Migrasyon Ve İnvazyon Üzerine Etkisi, *Mersin Üniversitesi*.

Eichler, A. F., Chung, E., Kodack, D. P., Loeffler, J. S., Fukumura, D. ve Jain, R. K., 2011, The biology of brain metastases—translation to new therapies, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8 (6), 344.

Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S. ve Vardar, E., 2015, Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk, *Meme Sagligi Dergisi/Journal of Breast Health*, 11 (2).

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516.

Ergün, A., Çolpan, İ., Yıldız, G., Küçükersan, S., Tuncer, Ş., Yalçın, S., Küçükersan, M. ve Şehu, A., 2004, Yemler ve Yem Hijyeni ve Teknolojisi, *Pozitif Yayınları*, 2, 69-102.

Ersöz, E., Can, O. B. ve Uzunoğlu, S., 2016, Eksozomların Kanserdeki Rolü, *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3 (1), 144-152.

Ewing, J., 1928, Neoplastic Diseases, ed. 3, Philadelphia, W, *B. Saunders Company*, 26.

Fadok, V., Voelker, D., Campbell, P., Cohen, J., Bratton, D. ve Henson, P., 1992, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *The Journal of Immunology*, 148 (7), 2207-2216.

Fan, F. ve Wood, K. V., 2007, Bioluminescent assays for high-throughput screening, *Assay and drug development technologies*, 5 (1), 127-136.

Ferlay, J., Forman, D., Mathers, C. ve Bray, F., 2012, Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010, *The Lancet*, 379 (9824), 1390-1391.

Foekens, J., Henkelman, M., Fukkink, J., Blankenstein, M. ve Klijn, J., 1986, Combined effects of buserelin, estradiol and tamoxifen on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro, *Biochemical and biophysical research communications*, 140 (2), 550-556.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., Dawson, T., Dawson, V., El-Deiry, W. ve Fulda, S., 2012, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell death and differentiation*, 19 (1), 107.

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. ve Adjei, A. A., 2005, Targeting apoptosis pathways in cancer therapy, *CA: a cancer journal for clinicians*, 55 (3), 178-194.

Gilbert, D. F. ve Boutros, M., 2016, A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay, In: High-Throughput RNAi Screening, Eds: Springer, p. 75-84.

Göksu, E. ve Kazan, S., 2017, Metastazların Moleküler Mekanizmaları.
Grieve, M., 1971, A Modern Herbal, p.
Griffaut, B., Debiton, E., Madelmont, J., Maurizis, J. ve Ledoigt, G., 2007, Stressed Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) excrete a protein fraction with specific cytotoxicity on plant and animal tumour cell, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770 (9), 1324-1330.
Group, B. I. G.-C., 2005, A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 353 (26), 2747-2757.
Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechtersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K. ve Altevogt, P., 2000, Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (20), 15490-15497.
Güneş, H. V., 2013, Moleküler hücre biyolojisi, İstanbul Tıp Kitabevi, p.
Hara, M. R. ve Snyder, S. H., 2007, Cell signaling and neuronal death, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 117-141.
Hayes, D. F., Bast, R. C., Desch, C. E., Fritsche Jr, H., Kemeny, N. E., Jessup, J. M., Locker, G. Y., Macdonald, J. S., Mennel, R. G. ve Norton, L., 1996, Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88 (20), 1456-1466.
Hejmadi, M., 2009, Introduction to cancer biology, Bookboon, p.
Homburg, C., de Haas, M., Von dem Borne, A., Verhoeven, A. J., Reutelingsperger, C. ve Roos, D., 1995, Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro, *Blood*, 85 (2), 532-540.
Hongmei, Z., 2012, Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review, In: Apoptosis and Medicine, Eds: Intech, p.
İşler, N., 2011, Yer Elması Tarımı, M.K.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü http://www.mku.edu.tr/files/898-b6855b8d-c9c6-455c-8472-4421c93179dd.pdf: [05.06.2018].
Joaquín H Patarroyo S., a. M. I. V. V., 2013, In: Apoptosis and Activation-Induced Cell Death Eds: InTech, p.
Joo, Y.-E., Rew, J.-S., Choi, S.-K., Bom, H.-S., Park, C.-S. ve Kim, S.-J., 2002, Expression of E-cadherin and catenins in early gastric cancer, *Journal of clinical gastroenterology*, 35 (1), 35-42.
Karolina, A., Ekaterina, A., Elena, A., Lilia, T. ve Kirienne, B., 2000, Usage of the inulin containing phytopreparation made of Jerusalem artichoke tubers in medical practice, *Odessa Hydrometeorological Institute, Odessa, Ukraine*.
Kaya, C., Çalışkan, Y. ve Yönden, Z., 2012, Apoptozis, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3 (11), 26-37.
Kays, S. J. ve Nottingham, S. F., 2007, Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: Helianthus tuberosus L, CRC press, p.
Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26 (4), 239.
Keskinkılıç, B., Gültekin, M., Karaca, A., Öztürk, C., Boztaş, G., Karaca, M., Utku, E., Hacıkamiloğlu, E., Turan, H. ve Dede, İ., 2016, Türkiye kanser kontrol programı, *Ankara, Sağlık bakanlığı*, 32.
Key, T. J., Verkasalo, P. K. ve Banks, E., 2001, Epidemiology of breast cancer, *The lancet oncology*, 2 (3), 133-140.

Khatib, O. M. N., 2006, Guidelines for the early detection and screening of breast cancer, *EMRO Technical Publication*, 30.

Kim, M.-S., You, M.-K., Rhuy, D.-Y., Kim, Y.-J., Baek, H.-Y. ve Kim, H.-A., 2009, Loquat (Eriobotrya japonica) extracts suppress the adhesion, migration and invasion of human breast cancer cell line, *Nutrition research and practice*, 3 (4), 259-264.

Knobf, M. T., Ferrucci, L. M., Cartmel, B., Jones, B. A., Stevens, D., Smith, M., Salner, A. ve Mowad, L., 2012, Needs assessment of cancer survivors in Connecticut, *Journal of Cancer Survivorship*, 6 (1), 1-10.

Koch, L., Jansen, L., Brenner, H. ve Arndt, V., 2013, Fear of recurrence and disease progression in long- term (≥ 5 years) cancer survivors—a systematic review of quantitative studies, *Psycho- Oncology*, 22 (1), 1-11.

Kopf, S., Viola, K., Atanasov, A. G., Jarukamjorn, K., Rarova, L., Kretschy, N., Teichmann, M., Vonach, C., Saiko, P. ve Giessrigl, B., 2013, In vitro characterisation of the anti-intravasative properties of the marine product heteronemin, *Archives of toxicology*, 87 (10), 1851-1861.

Kulasingam, V. ve Diamandis, E. P., 2008, Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 5 (10), 588.

Kuzey, P. D. G. M., 2007, *Güneş Kitabevi*, p. 1060.

Langdon, S. P., 2010, Cancer cell culture, Springer, p.

Levenson, A. S. ve Jordan, V. C., 1997, MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line, *Cancer research*, 57 (15), 3071-3078.

Li, L., Li, L., Wang, Y., Du, Y. ve Qin, S., 2013, Biorefinery products from the inulin-containing crop Jerusalem artichoke, *Biotechnology letters*, 35 (4), 471-477.

Li, W., Zhang, J., Yu, C., Li, Q., Dong, F., Wang, G., Gu, G. ve Guo, Z., 2015, Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke, *Carbohydrate polymers*, 121, 315-319.

Lin, S., 1978, Study on the chemical constituents of Helianthus tuberosus L, *Compositae). Huaxue*, 4, 115-117.

Lippman, M. E. ve Bolan, G., 1975, Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture, *Nature*, 256 (5518), 592.

Lockshin, R. A. ve Williams, C. M., 1965, Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth, *Journal of insect physiology*, 11 (2), 123-133.

Lockshin, R. A. ve Zakeri, Z., 2001, Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory, *Nature reviews Molecular cell biology*, 2 (7), 545.

Logomasini, A., The True Causes of Cancer, *Competitive Enterprise Institute*.

Longo-Sorbello, G., Saydam, G., Banerjee, D. ve Bertino, J., 2006, Cytotoxicity and cell growth assays. In "Cell biology: a laboratory handbook", Ed; Celis JE, Elseiver Academic Press, Burlington.

Ly, M., Antoine, M., André, F., Callard, P., Bernaudin, J.-F. ve Diallo, D. A., 2011, Breast cancer in Sub-Saharan African women: review, *Bulletin du cancer*, 98 (7), 797-806.

Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. ve Kroemer, G., 2007, Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature reviews Molecular cell biology*, 8 (9), 741.

Manoj, G., Kumar, T., Varghese, S. ve Murugan, K., 2012, Effect of methanolic and water extract of Leucobryum bowringii Mitt. On growth, migration and invasion of MCF 7 human breast cancer cells in vitro.

Marić, P., Ozretić, P., Levanat, S., Orešković, S., Antunac, K. ve Beketić-Orešković, L., 2011, Tumor markers in breast cancer–evaluation of their clinical usefulness, *Collegium antropologicum*, 35 (1), 241-247.

Martin, S., Reutelingsperger, C., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R., LaFace, D. M. ve Green, D. R., 1995, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *Journal of Experimental Medicine*, 182 (5), 1545-1556.

Matsuura, H., Yoshihara, T. ve Ichihara, A., 1993, Four new polyacetylenic glucosides, methyl β-D-Glucopyranosyl helianthenate CF, from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.), *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57 (9), 1492-1498.

Mazur, M. T., Hsueh, S. ve Gersell, D. J., 1984, Metastases to the female genital tract: analysis of 325 cases, *Cancer*, 53 (9), 1978-1984.

McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A. ve Neve, R. L., 2003, DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3, *Journal of Neuroscience*, 23 (17), 6914-6927.

Miyazawa, M. ve Kameoka, H., 1983, Helianthol A, a sesquiterpene alcohol from Helianthus tuberosus, *Phytochemistry*, 22 (4), 1040-1042.

Morgan, J. W., Gladson, J. E. ve Rau, K. S., 1998, Position paper of the American Council on Science and Health on risk factors for breast cancer: established, speculated, and unsupported, *The breast journal*, 4 (3), 177-197.

Morimoto, H., Sanno, Y. ve Oshio, H., 1966, Chemical studies on Heliangine: A new sesquiterpene lactone isolated from the leaves of Helianthus tuberosus L, *Tetrahedron*, 22 (9), 3173-3179.

Navarro, P., Gómez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M. ve Cano, A., 1991, A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis, *The Journal of Cell Biology*, 115 (2), 517-533.

Nejat, D. ve Nur , B., 2015, Kanser Biyolojisi, In: Onkoloji Hemşireliği, Eds: Can, G.: Nobel Tıp Kitabevleri, p.

Niles, A. L., Moravec, R. A., Hesselberth, P. E., Scurria, M. A., Daily, W. J. ve Riss, T. L., 2007, A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers, *Analytical biochemistry*, 366 (2), 197-206.

Nizioł-Łukaszewska, Z., Furman-Toczek, D. ve Zagórska-Dziok, M., 2018, Antioxidant activity and cytotoxicity of Jerusalem artichoke tubers and leaves extract on HaCaT and BJ fibroblast cells, *Lipids in health and disease*, 17 (1), 280.

Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., Nguyen, C., Birnbaum, D., Douzery, E. J., Cohen, P. ve Theillet, C., 2003, Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications, *BMC Cancer*, 3 (1), 13.

Oberhammer, F., Wilson, J., Dive, C., Morris, I., Hickman, J., Wakeling, A., Walker, P. R. ve Sikorska, M., 1993, Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation, *The EMBO journal*, 12 (9), 3679-3684.

Otranto, M., Sarrazy, V., Bonté, F., Hinz, B., Gabbiani, G. ve Desmouliere, A., 2012, The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling, *Cell adhesion & migration*, 6 (3), 203-219.

Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D., 2001, Apoptozisin önemi, *Toraks Dergisi*, 2 (1), 91-95.

Öniz, H., 2004, Apoptoz: Ölmeye yatmak, *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi*, 14 (1).

Öztürk, F., 2002, Apopitoz.

Özyörük, d. D. ve Şimşek, d. Z., 2003, Adezyon Molekülleri ve Tümör Metastazı, *Dirim*, 29-34.

Paget, S., 1889, The distribution of secondary growths in cancer of the breast, *The Lancet*, 133 (3421), 571-573.

Pan, L., Sinden, M. R., Kennedy, A. H., Chai, H., Watson, L. E., Graham, T. L. ve Kinghorn, A. D., 2009, Bioactive constituents of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke), *Phytochemistry Letters*, 2 (1), 15-18.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H. ve Akslen, L. A., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406 (6797), 747.

Petkova, N., Ivanov, I., Denev, P. ve Pavlov, A., 2014, Bioactive substance and free radical scavenging activities of flour from Jerusalem artichoke (H*elianthus tuberosus* L.) tubers–a comparative study, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1 (Özel Sayı-2), 1773-1778.

Prensipler, D. K. K. T., 2000, İn: Topuz E, Aydıner A, Karadeniz AN; eds, *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitisü Yayınları*, 34-47.

Ringer, D. ve Schnipper, L., 2001, Principles of Cancer Biology. İn: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds, *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*, 21-35.

Riss, T. L. ve Moravec, R. A., 2004, Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays, *Assay and drug development technologies*, 2 (1), 51-62.

Riss, T. L., Moravec, R. A., O'Brien, M. A., Hawkins, E. M. ve Niles, A., 2006, 28 Homogeneous Multiwell Assays for Measuring Cell Viability, Cytotoxicity, and Apoptosis, *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*, 385.

Roberfroid, M., 2007, Prebiotics: the concept revisited, *The Journal of nutrition*, 137 (3), 830S-837S.

Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M. ve Wagner, P., 2005, Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy, *Clinical cancer research*, 11 (16), 5678-5685.

Sakisaka, T. ve Takai, Y., 2004, Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules, *Current opinion in cell biology*, 16 (5), 513-521.

Salo, T., Mäkelä, M., Kylmäniemi, M., Autio-Harmainen, H. ve Larjava, H., 1994, Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 during early human wound healing, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 70 (2), 176-182.

Seibert, K., Shafie, S. M., Triche, T. J., Whang-Peng, J. J., O'Brien, S. J., Toney, J. H., Huff, K. K. ve Lippman, M. E., 1983, Clonal variation of MCF-7 breast cancer cells in vitro and in athymic nude mice, *Cancer research*, 43 (5), 2223-2239.

Sharif, F., Abshorshori, N., Tahmasebi, S., Hazrati, M., Zare, N. ve Masoumi, S., 2010, The effect of peer-led education on the life quality of mastectomy patients

referred to breast cancer-clinics in Shiraz, Iran 2009, *Health and quality of life outcomes*, 8 (1), 74.

Shirazi, F. H., Zarghi, A., Kobarfard, F., Zendehdel, R., Nakhjavani, M., Arfaiee, S., Zebardast, T., Mohebi, S., Anjidani, N. ve Ashtarinezhad, A., 2011, Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds, In: Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis, Eds: InTech, p. 85-112.

Singh, A. ve Settleman, J., 2010, EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer, *Oncogene*, 29 (34), 4741.

Sluyser, M., 2002, Apoptosis in normal development and cancer, CRC Press, p.

Smith, R. A., Andrews, K. S., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram- Baptiste, D., Saslow, D., Brawley, O. W. ve Wender, R. C., 2017, Cancer screening in the United States, 2017: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening, *CA: a cancer journal for clinicians*, 67 (2), 100-121.

Smoke, T. ve Smoking, I., 2004, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *IARC, Lyon*, 1-1452.

Society, A. C., 2008, Cancer facts & figures, The Society, p.

Soule, H., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. ve Brennan, M., 1973, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), 1409-1416.

Sutherland, R. L., Green, M. D., Hall, R. E., Reddel, R. R. ve Taylor, I. W., 1983a, Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19 (5), 615-621.

Sutherland, R. L., Hall, R. E. ve Taylor, I. W., 1983b, Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells, *Cancer research*, 43 (9), 3998-4006.

Svokos, K., Salhia, B. ve Toms, S., 2014, Molecular biology of brain metastasis, *International journal of molecular sciences*, 15 (6), 9519-9530.

Sweeney, E. E., McDaniel, R. E., Maximov, P. Y., Fan, P. ve Jordan, V. C., 2012, Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations, *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 9 (2), 143-163.

Taşdemiroğlu, E., 2003, Tümör-Metastaz İlişkisi; 154 Pediatrik Solid Malign Tümör Olgusunun Analizi.

Tokur, O. ve Aksoy, A., 2017, In Vitro Sitotoksisite Testleri.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet- Tieulent, J. ve Jemal, A., 2015, Global cancer statistics, 2012, *CA: a cancer journal for clinicians*, 65 (2), 87-108.

TÜİK, 2017, http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572:

Ustaalioglu, B. B., Bilici, A., Seker, M., Salman, T., Gumus, M., Barisik, N. O., Salepci, T. ve Yaylaci, M., 2009, Metastasis of lobular breast carcinoma to the uterus in a patient under anastrozole therapy, *Oncology Research and Treatment*, 32 (7), 424-426.

Vainio, H. ve Bianchini, F., 2002, Weight control and physical activity, Iarc, p.

Verhoven, B., Schlegel, R. ve Williamson, P., 1995, Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes, *Journal of Experimental Medicine*, 182 (5), 1597-1601.

WHO, 2002, National cancer control programmes: policies and managerial guidelines, World Health Organization, p.

Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., Van de Velde, C., Cornelisse, C. J. ve Van Dierendonck, J. H., 1993, A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41 (1), 7-12.

Worldwide, C. S., 2005, London Cancer Research Report *UK*, 45-46.

Wyllie, A., Morris, R., Smith, A. ve Dunlop, D., 1984, Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis, *The Journal of pathology*, 142 (1), 67-77.

Yarış, F., Şahin, M. K. ve Dikici, M. F., 2014, Aile Hekimliğinde Meme Kanserlerine Yaklaşım, *Turkiye Klinikleri Journal of Family Medicine Special Topics*, 5 (2), 46-54.

Yetimalar, M. H. ve Çallı, A. O., 2014, İnvaziv Duktal Meme Kanserinde Geç Genital Nüks: Olgu Sunumu, *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*, 17 (4).

Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. ve Takeichi, M., 1984, Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody, *Developmental biology*, 101 (1), 19-27.

Yoshihara, T., Matsuura, H., Ichihara, A., Kikuta, Y. ve Koda, Y., 1992, Tuber Forming Substances Of Jerusalem Artichoke (Helianthus Tuberosus L, In: Progress in Plant Growth Regulation, Eds: Springer, p. 286-290.

Yuan, X., Gao, M., Wang, K., Xiao, H., Tan, C. ve Du, Y., 2008, Analysis of chlorogenic acids in *Helianthus tuberosus* Linn leaves using high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Se pu= Chinese journal of chromatography*, 26 (3), 335-338.

Yuan, X., Cheng, M., Gao, M., Zhuo, R., Zhang, L. ve Xiao, H., 2013, Cytotoxic constituents from the leaves of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and their structure–activity relationships, *Phytochemistry Letters*, 6 (1), 21-25.

Zucco, F., De Angelis, I. ve Stammati, A., 1998, Cellular models for in vitro toxicity testing, In: Animal Cell Culture Techniques, Eds: Springer, p. 395-422.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Fadime Beyazyüz
Uyruğu	**:**	Türk Vatandaşı
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	ERZURUM-04.02.1991
Telefon	**:**	5076406612
Faks	**:**	
e-mail	**:**	Fadime_kocamanhotmail.com

EĞİTİM

Derece	**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise :	**Meltem Lisesi**	**2007**
Üniversite :	**Fatih Üniversitesi**	**2012**
Yüksek Lisans :		
Doktora :		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR