

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ALABAŞ (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) BİTKİSİ YUMRUSUNUN
ETANOL EKSTRAKTININ HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE
SERGİLEYECEĞİ SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK ve
ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hamide İlay USMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ALABAŞ (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) BİTKİSİ YUMRUSUNUN
ETANOL EKSTRAKTININ HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE
SERGİLEYECEĞİ SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK ve
ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hamide İlay USMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALABAŞ (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) BİTKİSİ YUMRUSUNUN
ETANOL EKSTRAKTININ HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE
SERGİLEYECEĞİ SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK ve
ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hamide İlay USMAN
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FLY-2020-5204 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALABAŞ (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) BİTKİSİ YUMRUSUNUN
ETANOL EKSTRAKTININ HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE
SERGİLEYECEĞİ SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK ve
ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hamide İlay USMAN
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 12/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Esra AYDEMİR (Danışman)

Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ

ÖZET

ALABAŞ (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) BİTKİSİ YUMRUSUNUN ETANOL EKSTRAKTININ HEPG2 HÜCRELERİ ÜZERİNDE SERGİLEYECEĞİ SİTOTOKSİK, ANTİMETASTATİK ve ANTİANJİYOGENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hamide İlay USMAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Temmuz 2021; 40 sayfa

Kanser hücre döngüsünde meydana gelen aksaklıklar ile ortaya çıkan hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır. Yıllar geçtikçe kanserin insanlar üzerinde artan insidansı sebebiyle bu hastalığa çare bulmak daha önemli bir hale gelmiştir. Günümüzde kullanılan çeşitli tedavi yöntemlerinin hastalar için oldukça fazla yan etkiye sahip olduğu açıktır. Bu zorlu tedavi süreci bilim insanlarını yeni tedaviler veya yeni kemoterapötik bileşenler bulmaya yönlendirmektedir.

Tarihte bitkilerin hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılması çok eskilere dayanmaktadır. Günümüzde de doğal bileşenlere olan ilgi gittikçe artmaktadır. Kanser ilaçlarında etken maddesi bitkisel kaynaklardan elde edilmiş birçok örnek bulunmaktadır. Sofralarımızda sıkça bulunan *brassicaceae* sebzeleri de içerdikleri çeşitli metabolitler sayesinde önemli antikanser etkilere sahiptir. Buradan yola çıkılarak bir *brassica* sebzesi olan alabaş bitkisinin antosiyanin, izotiyosiyanat, glukosinolat ve fenolik bileşen içeriğinin yüksekliği de göz önüne alınarak, kanserle mücadeleye katkıda bulunabilecek veriler elde etmek hedeflenmiştir.

Bu tez çalışmasında alabaş (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) türüne ait örneklerin yumru kısımlarından elde edilen etanol ekstraktının sitotoksik, antimetastatik ve antianjiyogenik özellikleri araştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt iki farklı hücre hattı üzerine uygulanmıştır. Hücreler üzerindeki sitotoksik aktivite WST-8 kiti, antimetastatik aktivite MMP-9 kiti, antianjiyogenik aktivite ise VEGF kiti uygulanarak incelenmiştir. Apoptotik bir marker olan kaspaz-3 miktarı ise kaspaz-3 kiti kullanılarak incelenmiştir.

Sonuçlar ekstraktın hücre tipi, zaman ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir. Ekstrakt HepG2 hücreleri için sitotoksiktir. Elde edilen deney sonuçlarına göre, HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı üzerine mor alabaş ekstraktlarının uygulanması sonucunda IC₅₀ değeri 24 saat için 25.97 µg/mL, 48 saat için 23.39 µg/mL ve 72 saat için 14.52 µg/mL olarak hesaplanmıştır. 293T için IC₅₀ değeri 24 ve 48 saat için saptanmamış fakat 72 saat için bu değer 25.73 µg/mL olarak saptanmıştır.

Ekstrakt VEGF ve MMP-9 miktarları üzerinde istatistiksel olarak önemli bir değişime neden olmamıştır. Kaspaz-3 miktarının ise arttığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar

alabaş ekstraktının apoptotik etki gösterdiğini fakat antianjiyogenik ve antimetastatik etkisi olmadığını işaret etmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: 293T, Alabaş, Antikanser, HepG2, MMP-9, VEGF

JÜRİ: Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ



ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, ANTIMETASTATIC AND ANTIANGIOGENIC EFFECTS OF ETHANOL EXTRACT OF KOHLRABI (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) PLANT TUBER ON HEPG2 CELLS

Hamide İlay USMAN

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

July 2021; 40 pages

Cancer is a disease that results from the uncontrolled proliferation of cells that occurs with disruptions in the cell cycle. Over the years, due to the increasing incidence of cancer in humans, it has become more important to find a cure for this disease. It is clear that the various treatment methods used today have quite a lot of side effects for patients. This challenging treatment process leads scientists to find new treatments or new chemotherapeutic components.

The use of plants as a therapeutic in diseases dates back to ancient times. Today, the interest in natural ingredients is increasing. There are many examples of cancer drugs whose active ingredient is derived from herbal sources. *Brassicaceae* vegetables, which are frequently found on our tables, also have important anticancer effects thanks to the various metabolites they contain. Based on this, it is aimed to obtain data that can contribute to the fight against cancer, taking into account the high content of anthocyanin, isothiocyanate, glucosinolate and phenolic component of the kohlrabi plant, which is a *brassica* vegetable.

In this thesis, the cytotoxic, antimetastatic and antiangiogenic properties of ethanol extract obtained from the tubers of kohlrabi (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) species were investigated. The obtained extract was applied to two different cell lines. The cytotoxic activity on the cells was examined by applying the WST-8 kit, the antimetastatic activity by the MMP-9 kit, and the antiangiogenic activity by applying the VEGF kit. The amount of caspase-3, an apoptotic marker, was analyzed using the caspase-3 kit.

The results showed that the extract has a cytotoxic effect depending on the cell type, time and concentration. The extract is cytotoxic to HepG2 cells. According to the experimental results obtained, the IC₅₀ value was calculated as 25.97 µg/mL for 24 hours, 23.39 µg/mL for 48 hours and 14.52 µg/mL for 72 hours as a result of the application of purple kohlrabi extracts on HepG2 liver cancer cell line. The IC₅₀ value for 293T was not determined for 24 and 48 hours, but this value was determined as 25.73 µg/mL for 72 hours.

The extract did not cause a statistically significant change on the amounts of VEGF and MMP-9. It was observed that the amount of caspase-3 increased. The results

indicate that the kohlrabi extract has an apoptotic effect, but not an antiangiogenic and antimetastatic effect.

KEYWORDS: 293T, Anti-cancer, HepG2, Kohlrabi, MMP-9, VEGF

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

Prof. Dr. Bülent KAYA

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ



ÖNSÖZ

Çağımızın hastalığı olan kanser ile mücadele gün geçtikte önemli hale gelmektedir. Dünya sağlık örgütü, gelecek yıllarda kanser vakalarının hızla artmaya devam edeceğini öngörmektedir. Kanser hücrelerinin telomeraz aktiviteleri, üstün proliferasyon hızları, dokulara invazyon ve metastaz yeteneği ile vücuda yayılım gösterebilme ve kontak inhibisyon kaybı gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu sahip olduğu özellikler kanserle savaşı zorlaştırmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi gibi tedaviler hastalarda önemli yan etkilere neden olmaktadır. Bu sebeple, daha seçici tedavi yöntemlerinin araştırılması hız kesmeden devam etmektedir.

İnsanlık tarihi boyunca bitkiler, hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. *Brassica* bitkilerinin hücre tipine ve kullanılan doza bağlı olarak kanser tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Antikanser özellikleriyle öne çıkan brokolinin de bulunduğu *brassicaceae* familyasına ait alabaş bitkisinin, yumrusu kullanılarak hazırlanan etanol ekstraktının karaciğer kanseri hücreleri için sitotoksik etki göstermesi beklenirken normal hücrelerin etkilenmemesi hedeflenmiştir. Hücre ölümünün, apoptozun kilit enzimi kaspaz-3'ün miktarının ölçülerek moleküler düzeyde doğrulanması planlanmıştır. Alabaş bitkisinin antianjiyogenik ve antimetastatik etkileri için de VEGF ve MMP-9 miktarları incelenmiştir.

Alabaş bitkisinin kanser üzerindeki etkileriyle ilgili çalışma sayısının kısıtlı olması nedeniyle projeden elde edilen bulgular bu konu için uluslararası alanda bilgi birikimine katkıda bulunacaktır. Proje sonunda ulaşılabilecek sonuçlar ise ileri düzey ön klinik çalışmalar için kullanılıp bu alanda daha geniş kapsamlı yeni çalışmalar için bir basamak görevi görecektir.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışmanım Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullanılan insan karaciğer kanseri hücre hattını temin ettiğimiz Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda görev yapan Dr. Öğr. Üyesi Çağrı ÖNER'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince ve akademik hayatımda önemini hatırlayacağım bilgi ve tecrübelerini aktarmaktan mutluluk duyan saygı değer hocam Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a,

Yüksek lisansa başladığımdan bu yana desteğini esirgemeyen laboratuvar sorumlumuz Dr. Ayşegül Cansu KİLİT'e ve Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Araştırma sırasında bizi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine ve personellere destekleri ve iyi niyetlerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Uzaktan da olsa manevi olarak her zaman yanımda olan, destekleri ile beni umutlandıran değerli dostlarım Elif YALÇIN ve Emrah SÜNDÜK' e teşekkür ederim.

Son olarak, koşulsuz sevgisi ile her zaman yanımda olan, manevi destekleri ile beni ayakta tutan, beni bugünlere getiren, yapmak istediklerimden bahsettiğimde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ilk öğretmenlerim, sırtımı yasladığım en kuvvetli dayanaklarım, hayattaki en büyük moral kaynağım canım aileme, annem Gülal USMAN, babam Oktay USMAN'a beni yetiştirirken yaptıkları fedakarlıklar ve bana olan güvenlerinden dolayı ve her türlü zorlu süreci birlikte geçirdiğim iyi ki var diye hep şükrettiğim kardeşim Ali Aybars USMAN'a yürekten teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	x
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Apoptoz	5
2.1.2. Anjiyogenez.....	8
2.2. Karaciğer Kanseri.....	9
2.3. <i>Brassicaceae</i> Bitkileri	10
2.3.1. Alabaş bitkisi	11
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	15
3.2. Bitkisel Materyal	15
3.3. Alabaş Bitkisi Yumrusunun Etanol Ekstraktının Hazırlanması	15
3.4. Alabaş Bitkisi Etanol Ekstraktı Dozlarının Hazırlanması	17
3.5. WST-8 Hücre Proliferasyon Kiti.....	17
3.6. Tripan Mavisi Testi	17
3.7. Kaspaz-3 Enzim Miktarının Araştırılması	18
3.8. VEGF Miktarının Araştırılması.....	18
3.9. MMP-9 Miktarının Araştırılması	19
3.10. İstatiksel Analiz.....	19
4. BULGULAR	20
4.1. Alabaş Bitkisi Ekstraktının 293T ve HepG2 Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler.....	20
4.1.1. 293T hücre hattı.....	20
4.1.2. HepG2 hücre hattı.....	23

4.2. Alabaş Bitkisi Ekstraktının 293T ve HepG2 Hücre Hatları Tripan Mavisi Testi Sonuçları.....	27
4.2.1. 293T hücre hattı.....	27
4.2.2. HepG2 hücre hattı.....	27
4.3. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde Kaspaz-3 Miktarı Üzerindeki Etkisi..	28
4.4. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde MMP-9 Miktarı Üzerindeki Etkisi ...	29
4.5. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde VEGF Miktarı Üzerindeki Etkisi	30
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR	34
7. KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Alabaş (*Brassica oleraceae* L. var. *gongylodes* L.) Bitkisi Yumrusunun Etanol Ekstraktının HepG2 Hücreleri Üzerinde Sergileyeceği Sitotoksik, Antimetastatik ve Antianjiyogenik Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

12/07/2021

Hamide İlay USMAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
mL	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

293T	: İnsan Embriyonik Böbrek Epitel Hücre Hattı
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Bax	: Bcl-2 ilişkili X Proteini
Bcl-2	: B Hücre Lenfoma 2
Bcl-XL	: B-Hücre Lenfoma-Ekstra-Large
Caco-2	: İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinomu
CAD	: Kaspaz aktive edici DNaz
CO ₂	: Karbondioksit
COX-2	: Prostaglandin-endoperoksit sentaz 2
DL	: Dalton's Lenfoma
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAz	: Deoksiribonükleaz
DR	: Ölüm Reseptörü
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
FBS	: Fetal Bovin Serum
HBV	: Hepatit B virüsü
HCC	: Hepatosellüler kanser
HCV	: Hepatit C virüsü
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HT29	: İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
IC ₅₀	: Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu
ICAD	: İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
IL	: İnterlökin
iNOS	: Nitrik Oksit Sentaz
Kaspaz	: Sistein Aspartat Spesifik Proteazları
LPS	: Lipopolisakkarit
M.Ö.	: Milattan Önce
MAPK	: Mitojen Aktif Protein Kinaz
MCF-7	: Meme Kanseri Hücre Hattı
MEM-NEAA	: Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acid
MMP	: Matriks Metaloproteinazlar
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NIH-3T3	: Fare Embriyonik Fibroblast
OD	: Optik Dansite Değeri
PARP	: Poli Adenozin Riboz Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin

PlGF	: Plasental Büyüme Faktörü
RAW 264.7	: Fare Makrofaj Hücre Hattı
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
SFN	: Sülfurafan
SiHa	: Serviks Karsinomu Hücre Hattı
SW480	: Primer İnsan Kolon Adenokarsinomu Hücre Hattı
SW620	: Metastatik İnsan Kolon Adenokarsinomu Hücre Hattı
T0	: Başlangıç zamanı
TRAF	: TNF Reseptörü Bağımlı Faktör
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-8	: Tetrazolyum Hücre Proliferasyon Kiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2020 yılında en sık görülen 10 kanser için; a) her iki cinsiyet için ortak vaka ve ölüm oranı dağılımı; (b) Erkeklerde gözlenen vaka ve ölüm oranı dağılımı; (c) Kadınlarda gözlenen vaka ve ölüm oranı dağılımı	4
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin temel özellikleri.....	5
Şekil 2.3. Apoptotik hücre ölümünün farklı aşamaları	6
Şekil 2.4. İçsel ve dışsal yoldan kaspaz kaskadı ve inhibitörleri	7
Şekil 2.5. Tümör anjiyogenezin betimlemesi	8
Şekil 2.6. 2020'de karaciğer kanseri için bölge spesifik ve cinsiyete göre yaş-standartlaştırılmış insidans oranları.....	10
Şekil 2.7. Glukosinolatın mirosinaz enzimi tarafından izotiyosiyanat oluşturması.....	11
Şekil 2.8. a) Mor renk alabaş bitkisi; b) yeşil renk alabaş bitkisi	12
Şekil 2.9. Soluk beyaz renkte olan alabaş bitkisinin iç kısmı	12
Şekil 3.1. Erüst Tarımdan gelen alabaş örnekleri	15
Şekil 3.2. a) Bitki kısımlarının ayrıştırılması; b) Bitki örneklerinin temizlenme aşaması; c) Hesaplamalar için gerekli tartımların alınması; d) %90 etanol eklenmiş su banyosuna alınmaya hazır olan örnekler	16
Şekil 4.1. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi	20
Şekil 4.2. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi	21
Şekil 4.3. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi	21
Şekil 4.4. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	22
Şekil 4.5. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	22
Şekil 4.6. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	23
Şekil 4.7. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi	24

Şekil 4.8. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi	24
Şekil 4.9. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi	25
Şekil 4.10. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenilen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	25
Şekil 4.11. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenilen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	26
Şekil 4.12. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenilen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	26
Şekil 4.13. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	27
Şekil 4.14. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	28
Şekil 4.15. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarı üzerine etkisi.....	28
Şekil 4.16. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki hücre içi MMP-9 miktarı üzerine etkisi	29
Şekil 4.17. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerinden salınan MMP-9 miktarı üzerine etkisi	29
Şekil 4.18. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki hücre içi VEGF miktarı üzerine etkisi.....	30
Şekil 4.19. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC ₅₀ , IC ₅₀ ve 2x IC ₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi	30

1. GİRİŞ

Kanser hücrelerin anormal / kontrolsüz çoğalması ve metastazı ile tanınan hastalıkların genel adıdır. Dünya genelindeki en ölümcül hastalıklardan birisidir (Reddy vd. 2003; Tewari vd. 2019; Ruiz-Torres vd. 2017). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2030 yılında 13,1 milyon insanın kanserden öleceğini tahmin etmektedir (Xu ve Mao 2016; Pandey vd. 2015). Hepatosellüler kanser (HCC), dünya çapında kanser ölümlerinin en yaygın üçüncü nedenidir (Parikh ve Hyman 2007; Asghar ve Meyer 2012). Yaşa veya ırka dayalı önemli bir ayrım olmaksızın dünya çapında kanser ölüm oranlarındaki artış dikkate alındığında, bu hastalığın insidansını azaltmaya yönelik her türlü çalışma bu konu için sarf edilen çabaya değmektedir (Barrios vd. 2010).

Vücutta var olan tümörlerin oluşumu, nedenleri, tanısı, tedavisi ve kalıtımla ilişkisini inceleyen onkoloji; proje sayısı, klinik araştırmalar, araştırma ve geliştirme harcamaları açısından son yıllarda en dikkat çeken bilim dallarından biridir (Xu ve Mao 2016). Çok sayıda ilaç, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır fakat hali hazırda hiçbir ilaç tamamen etkili ve güvenli değildir. Kemoterapinin zararları arasında, sağlıklı hücrelerde toksik etki, bayılma, saç dökülmesi, anemi, kolay morarma ve kanama gibi ciddi yan etkiler bulunmaktadır. Günümüzde, bu yan etkilerin azaltılması ve tedavi başarısı daha yüksek yöntemlerin ortaya konması için yapılan çalışmalar oldukça dikkat çekicidir (Majolo vd. 2019).

M.Ö 480’de Hipokrat “Olumlu sağlık, insanın temel yapısı ve çeşitli gıdaların gücü hakkında hem doğal hem de insan becerilerinden kaynaklı bilgileri gerektirir” demiştir. Geçmişte Hipokrat’ın “insanın temel yapısı” olarak adlandırdığı terime bugün “genetik” denilmekte ve “İnsan becerilerinden kaynaklanan gıdaların” bugünün diyeti olduğu düşünülmektedir (Reddy vd. 2003).

Piyasada veya klinik aşamada mevcut olan ilaçların / terapötik maddelerin %60’ından fazlası doğal ürünlere dayanmaktadır (Tewari vd. 2019). Doğal ürünler, ilaç keşfi ve gelişimi için oldukça değerli kaynaklardır. Bitkiler antik çağlardan beri, hastalık önlemede ve tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) araştırmasına göre, günümüzde 20.000’den fazla şifalı otun hala kullanımda olduğu bildirilmektedir. Dahası, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki dünya nüfusunun üçte ikisinden fazlası bitkilerden hazırlanan geleneksel ilaçları kullanmaktadır (Tewari vd. 2019; Park ve Pezzuto 2002; Efferth 2019).

İnsanlar reçetesiz satılan bitkisel ilaçları veya bitkisel takviyeleri kolayca alabilirler, güvenliği ve etkinliği genellikle katı bir bilimsel temele dayanmamış olsa bile, bu ürünleri tüketmekte kendilerini rahat hissetmektedirler. Bitkiler aktif kimyasal bileşenler veya plasebo etkileri nedeniyle, vücutta faydalı etkiler yaratabilir ya da ilaç-ilaç etkileşimleri gibi faktörler nedeniyle sağlık problemi yaratabilir (Tewari vd. 2019; Park ve Pezzuto 2002; Efferth 2019).

Bitki metabolitleri, metabolizmanın son ürünleri ve ara maddeleridir. Birincil metabolitler, canlı organizmalarda normal büyüme, gelişme ve üreme gibi fizyolojik süreçlerden doğrudan sorumludur. İkincil metabolitler ise bitki savunmasında yer alır ve insan sağlığı için ilaç olarak kullanılabilir (Park vd. 2017). Mevcut kanser ilaçlarının çoğu doğal ürünlerden sentezlenir. Paklitaksel ve dosetaksel gibi antikanser ilaçları; porsuk

ağacının taksol özlerinden (*Taxus spp.*), dirençli over, meme ve diğer kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Çeşitli bitkilerin ekstraktları, moleküler seviyede hücreleri etkileyen ilaçlara kimyasal olarak dönüştürülebilir, böylece tümörigenezi tersine çevirebilir veya inhibe edebilir (Reddy vd. 2003). Doğal ajanların ana kaynağı diyetdir. Bu doğal diyet bileşenlerinin önemini doğrulamak için daha fazla klinik çalışma gereklidir. Dünyanın farklı yerlerinden gelen epidemiyolojik veriler, diyet ajanlarının kanser üzerinde etkilerinin gözlenmesinde yarar sağlayacaktır (Pandey vd. 2017).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, istenmeyen, yaşlı ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan, sıkı bir şekilde kontrol edilen bir mekanizmadır. Apoptozun en önemli özellikleri; heterokromatin çekirdek kütlelerinde azalma, hücre zarı büzülmesi ve organellerin sitoplazmadaki pozisyonunu kaybetmesidir. Apoptoz, kaspaz 8 ve 10'u kullanan, ekstrinsik yol olarak adlandırılan ölüm reseptörleri tarafından veya kaspaz 9'u içeren intrinsik yol ile aktive edilir. Apoptoz indüksiyonu, sitotoksik antitümör ajanların etkinliğini değerlendirmede en önemli belirteçlerden biridir. Bitkilerden elde edilen bazı doğal bileşiklerin kanser hücrelerinde bloke olan apoptotik yolları indükleyebildiği bilinmektedir (Safarzadeh vd. 2014).

Anjiyogenez ve anjiyogenik faktörlerin üretimi, tümör büyümesi, invazyonu ve metastazı için gereklidir. Oluşan yeni damarlar, oksijen ve besin taşır ve katabolitleri uzaklaştırarak büyümeyi destekler. Endotel hücreleri, tümör hücreleri için büyüme faktörleri ve tümör istilasını kolaylaştıran çeşitli matriks metalloproteinazları salgılar. Genişleyen endotel yüzeyi de tümör hücrelerinin metastaz için dolaşıma katılmasına fırsat verir (Ribatti vd. 2006).

Brassica sebzelerine farklı lahana türleri (beyaz lahana, kırmızı lahana, Milano lahanası, Çin lahanası), karnabahar, brokoli ve Brüksel lahanası örnek gösterilebilir. Bu sebzeler hem antioksidan hem de antikanserojenik özelliklere sahiptir. Antioksidan vitaminler, karotenoidler ve polifenollere ek olarak, *brassica* sebzeleri, oldukça düşük antioksidan aktiviteye sahip olan büyük bir glukosinolat grubu içermektedir. Bu grubun ancak hidroliz ürünleri kansere karşı koruma sağlayabilir. Glukosinolatlar bitkiye özgü mirosinaz enzimi veya vücutta bağırsak florasının enzimatik etkisiyle izotiyosiyanatlara parçalanıp aktif hale gelmektedir (Podsędek 2007; Çelik ve Köksal 2013).

Bu çalışmada antioksidan özellik gösteren, glukosinolat ve indol içeriği bulunan mor renkli alabaş bitkisi yumrusunun ekstraktının sitotoksik etkisinin karaciğer kanser hücreleri üzerinde sergileyeceği etkinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca alabaş bitkisinde daha önce çalışılmamış olan antianjiyogenik ve antimetastatik etkilerinin incelenmesi de hedeflenmektedir. Alabaşın kanser üzerindeki etkileriyle ilgili çalışmaların sayısının sınırlı olması nedeniyle bu projeden elde edilen bulgular bu konuda uluslararası alanda bilgi birikiminin artırılmasını sağlayacaktır. Proje sonunda ulaşılabilecek sonuçlar, bu alanda yapılacak yeni çalışmalar için kılavuz görevi görecektir.

2. KAYNAK TARAMASI

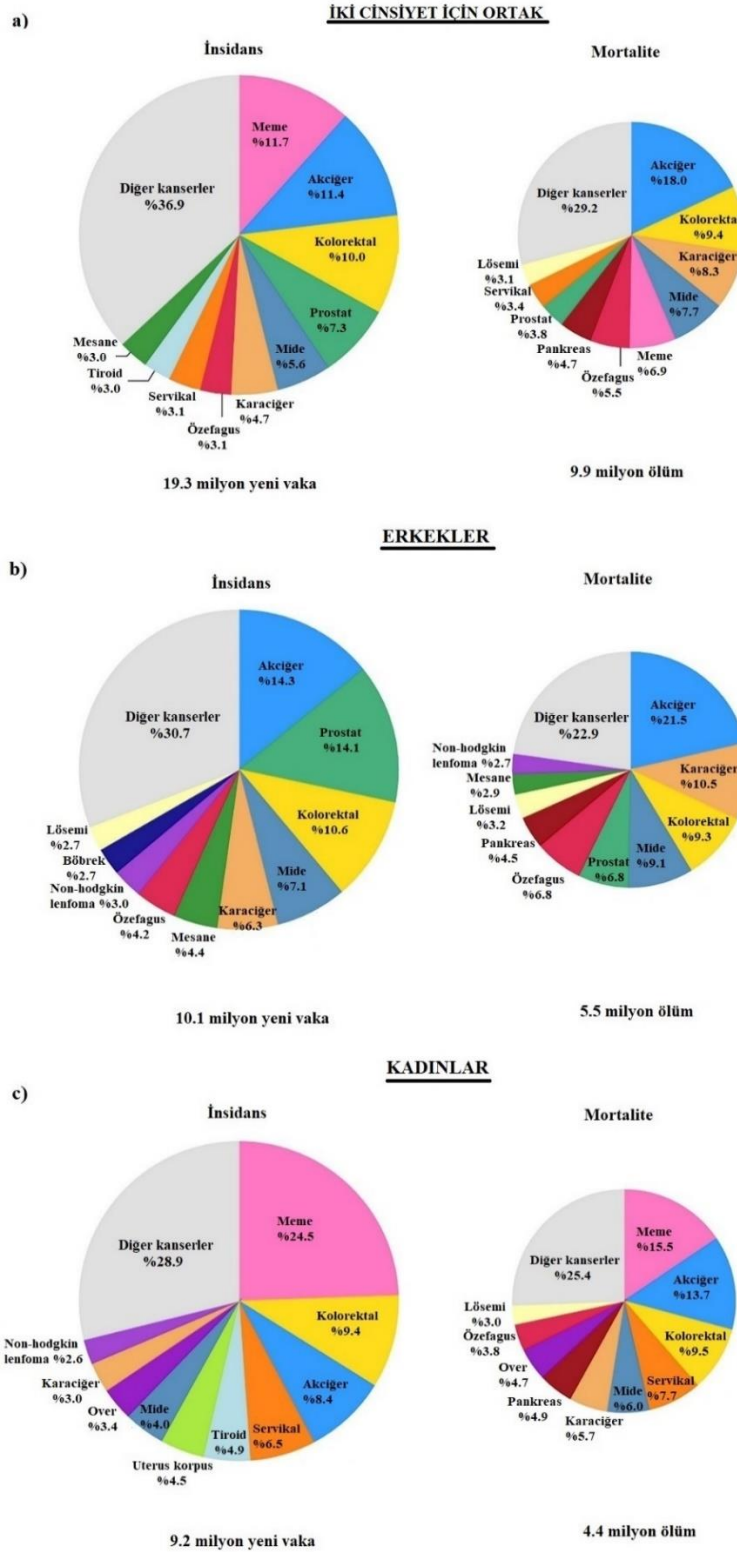
2.1. Kanser

Kanser hücrelerin anormal / kontrolsüz çoğalması ve metastazı ile tanınan hastalıkların genel adıdır. Dünya genelindeki en ölümcül hastalıklardan birisidir (Reddy vd. 2003; Tewari vd. 2019; Ruiz-Torres vd. 2017). Genel olarak, kanser insidansı ve ölüm oranı dünya çapında hızla artmaktadır. 2020’de dünya çapında, tüm kanser vakalarının insidans oranı, erkeklerde kadınlara göre %19 daha yüksektir. Dünya çapında 2020 yılı için cinsiyet bağımlı ve cinsiyet bağımsız kanser vaka ve ölüm oranları Şekil 2.1’de gösterilmektedir (Sung vd. 2021). Günümüzde milyonlarca kanserli insanın yaşam uzunluğu, hastalığın erken teşhis edilmesi ve başarılı bir tedavi uygulanması sayesinde artmaktadır. Tüm dünyada insanlarını etkileyen kanser, insanlık tarihi kadar eski bir hastalıktır. Dahası, paleopatolojik bulgular, tümörlerin insanlar Dünya’da ortaya çıkmadan çok önce tarih öncesi çağlarda hayvanlarda da var olduğunu göstermektedir (Sudhakar 2009; Hajdu 2011).

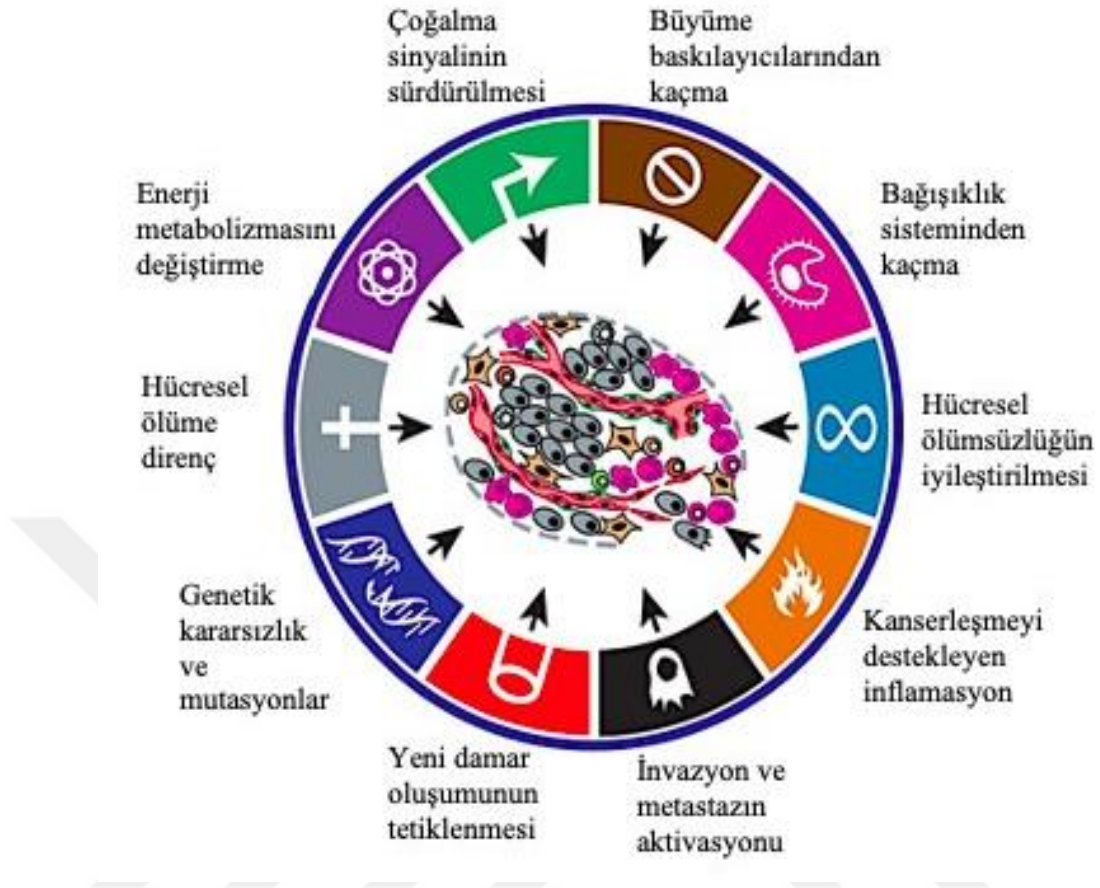
Karsinogenez, çok aşamalı bir süreçtir. Kanser ilk aşaması, geri dönüşü olmayan hücre değişikliklerini içermektedir. İkinci aşama, hücrelerin klonal çoğalmasıdır. İlerleme aşaması, hastalığın agresifliğini ve metastatik evreleri içermektedir. 100’den fazla kanser türü tanımlanmıştır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi, kanser tedavisinin en yaygın yöntemleri olarak kabul edilir, ancak bu tedavi yöntemlerinin tümü her zaman istenilen başarıyı sağlamamaktadır (Safarzadeh vd. 2014).

Kanserin fizyolojik belirteçleri olarak tüm kanserlerde ortak olan on temel özellik bulunmaktadır. Bu özelliklerin her biri kanser tedavisi geliştirilmesinde farklı hedefler olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu özellikler:

- 1) Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
- 2) Büyümeyi durdurucu sinyallere karşı duyarlı olmama,
- 3) Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
- 4) Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız üreme potansiyeline sahip olma,
- 5) Yeni kan damarları oluşturabilme (anjiyogenez),
- 6) Farklı dokulara saldırabilme ve bir bölgeden diğerine taşınabilme (metastaz),
- 7) Genom kararsızlığı ve mutasyon,
- 8) Enerji metabolizmasını değiştirme,
- 9) Bağışıklık sisteminden kaçma,
- 10) Kanserleşmeyi destekleyen inflamasyondur (Şekil 2.2).



Şekil 0.1. 2020 yılında en sık görülen 10 kanser için; **a)** her iki cinsiyet için ortak vaka ve ölüm oranı dağılımı; **(b)** Erkeklerde gözlenen vaka ve ölüm oranı dağılımı; **(c)** Kadınlarda gözlenen vaka ve ölüm oranı dağılımı

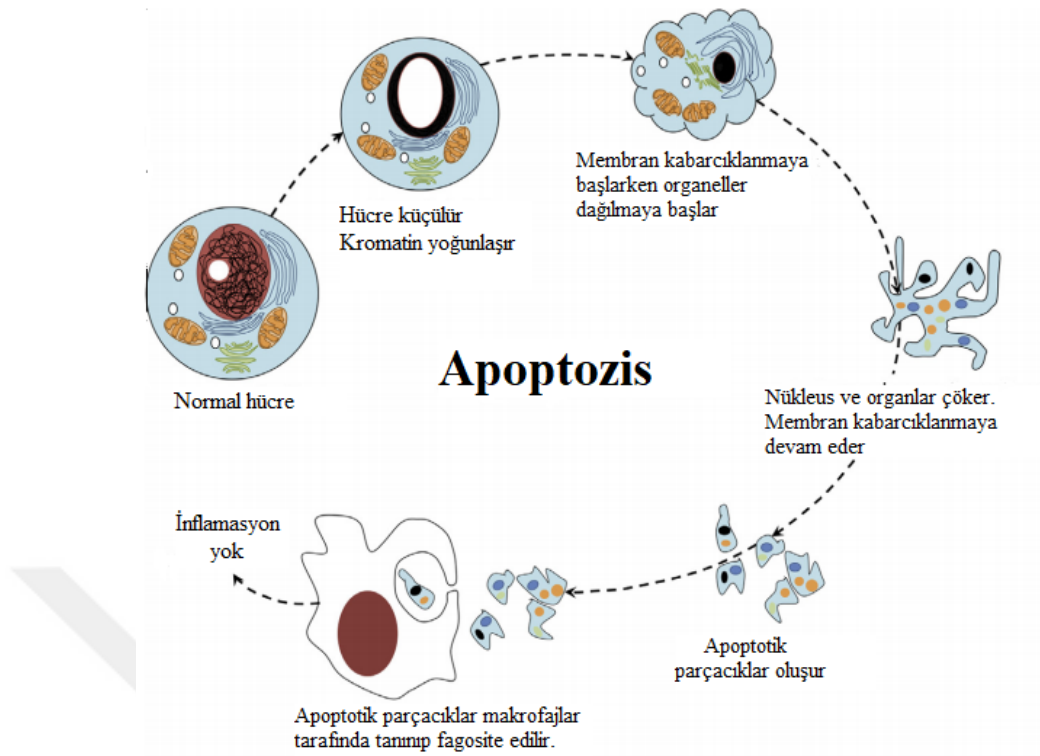


Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Kanser, hücrenin genetik materyali (DNA) tarafından kontrol edilen normal hücre bölünmesi süreçlerinde bozukluğun meydana geldiği bir hastalıktır (Reddy vd. 2003). Tüm kanser vakalarının yalnızca %5-10'unda genetik faktörler, geri kalan %90-95'inde ise çevresel faktörler ve yaşam tarzı etkilidir. Yaşam tarzı faktörlerine sigara tüketimi, sağlıksız diyet (kızarmış yiyecekler, kırmızı et), alkol, güneşe maruz kalma, çevresel kirlenmeler, enfeksiyonlar, stres, obezite ve fiziksel hareketsizlik örnek gösterilebilir (Anand vd. 2008).

2.1.1. Apoptoz

Büyüme düzenleyici mekanizmalar, normal şartlar altında homeostazı sürdürmeye çalışır. Bir hücre içindeki homeostaz; proliferasyon, büyümenin durması ve apoptoz arasındaki denge ile düzenlenmektedir. Hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dengenin bozulması hiperplazi veya neoplazi ile sonuçlanır. DNA hasarı çevresel faktörlerden kaynaklanabilir ve hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulmasına yol açabilir. DNA hasarının ardından apoptozun olması mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasının önlenmesinde önemlidir (Foster 2008).



Şekil 2.3. Apoptotik hücre ölümünün farklı aşamaları (Abou-Ghali ve Stiban 2015'ten uyarlanmıştır.)

Hücreler için kritik sayılan onkogenler veya tümör baskılayıcı genlerde çoklu DNA mutasyonlarının birikmesi, hücrel senesens veya apoptoz ile uygun şekilde kontrol edilmezse, kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve normal hücrelerin kötü huylu tümör hücrelerine aşamalı dönüşümüne yol açabilmektedir (Longo ve Fontana 2010).

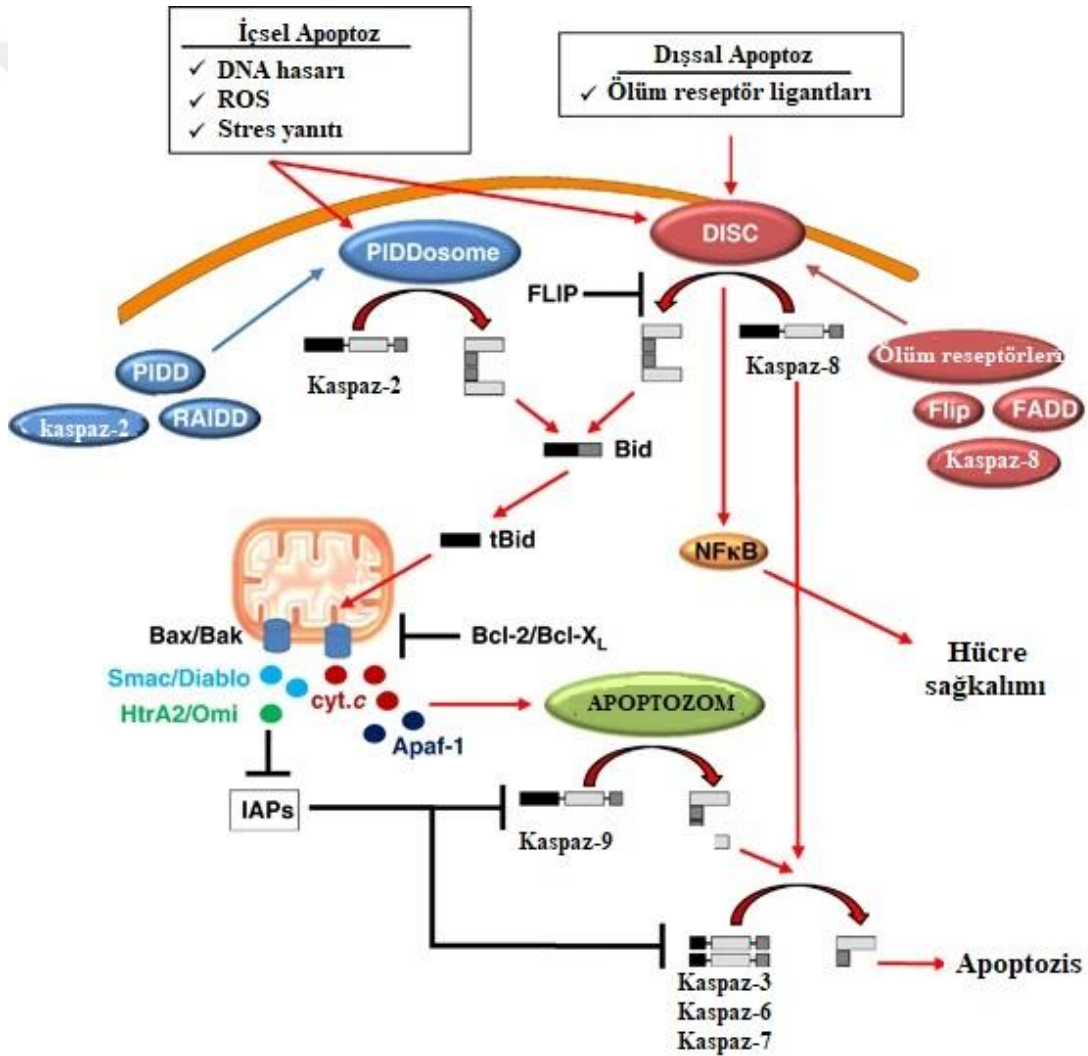
Programlanmış hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da bilinen apoptoz fizyolojik bir olaydır (Güleş ve Ülker 2008). Nekrozun aksine, bir hücrenin belirli uyarıları aldıktan sonra aktif olarak ölüme doğru izlediği yolu tanımlamak için kullanılır. Apoptoz tanımı 1970'lerde Kerr ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. O yıllardan bu yana, biyolojik araştırmalarda oldukça fazla araştırılan süreçlerden biri olmuştur (Wong 2011). Apoptoz, bir hücrenin tüm içeriğini paketlenip komşu hücreler tarafından yutulmak üzere gönderdiği için iltihaplanmaya neden olmadan yaşamını sonlandırdığı süreçtir (Abou-Ghali ve Stiban 2015).

Kaspazlar, apoptotik sinyal ağında merkezi rol alan, apoptotik hücre ölümünün gerçekleşebilmesi için her durumda aktifleşmesi gereken sistein proteazlardır. Efektör kaspazlar kendinden bir önceki kaspaz / kaspazlar tarafından aktive edilerek çalışırlar. Günümüzde çoğu geleneksel kanser terapisi, kaspazların dolaylı olarak devreye sokulmasıyla kanser hücresi için apoptozu indüklemektedir (Boice ve Bouchier-Hayes 2020). İnsan kaspazları işlevlerine göre 2 gruba ayrılmaktadır. Kaspaz-1, kaspaz-4 ve kaspaz-5, sitokin olgunlaşmasında rol oynayan grup I (inflamatuvar) kaspazlara aittir. Bu proteazlar öncelikle patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık ile ilişkilidir. Apoptozun düzenlenmesi ise grup II kaspazları tarafından kontrol edilmektedir. Grup II kaspazları iki kategoride incelenir:

1-) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10)

2-) Efektör kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) (Olsson ve Zhivotovsky 2011).

Apoptoz iki farklı yol izleyebilmektedir. Bu durum hücre içi ve hücre dışı sinyaller ile birbirinden ayrılır. Hücre içi sinyaller, içsel apoptoz yolunu indüklerken, hücre dışı sinyaller dışsal yol ile apoptozu indüklemektedir. Apoptozun uygulama aşaması, bir dizi kaspazın aktivasyonunu içerir. İçsel yolda kaspaz-9 aktifleşirken dışsal yolda kaspaz-8 aktifleşmektedir. İçsel ve dışsal yollar, kaspaz 3'e birleşir. Prokaspaz-3 aktif kaspaz-3'e dönüşür. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Wong 2011; Coşkun ve Özgür 2011) (Şekil 2.4).

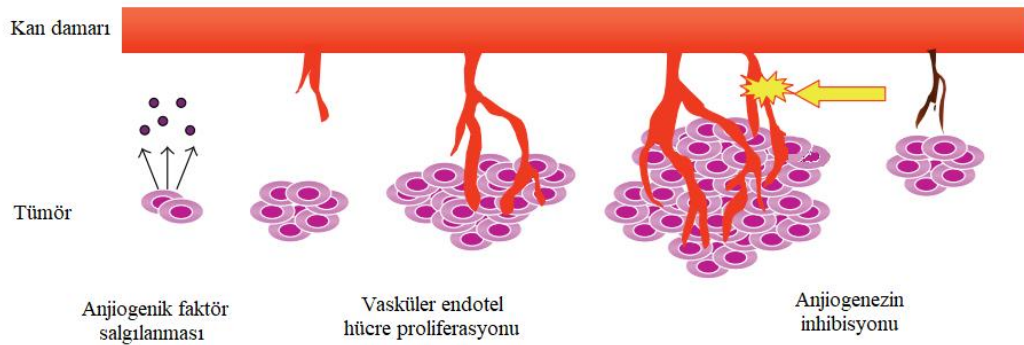


Şekil 2.4. İçsel ve dışsal yolaktan kaspaz kaskatı ve inhibitörleri (Olsson ve Zhivotovsky 2011)

2.1.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez, önceden var olanlar damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır (Hillen ve Griffioen 2007; Folkman 1984; Imir vd. 2018). Anjiyogenez, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve üreme gibi fizyolojik olaylarda gerçekleşmektedir. Ayrıca romatoid artrit, iskemik komplikasyonlar, diyabet ve kanser gibi birçok hastalıkta önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Hillen ve Griffioen 2007).

Tümörler, oksijen ve besinlerin içte kalan hücrelere difüzyon limiti nedeniyle metabolik talepleri kısıtlanmadan önce yaklaşık 1–2 mm³ boyutuna büyüebilmektedir. Tümörün boyutu arttıkça hipoksik hale gelir ve anjiyogenez yokluğunda boyutları sınırlanır. Tümörün boyutunu arttırabilmesi için, çevredeki kan damarlarını kendisine çekmesi gerekmektedir. Böylece genişleyen doku ve organlara oksijen ve besin sağlanırken metabolik atıklar da uzaklaştırılır (Şekil 2.5). Bu süreç, çeşitli proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler ile düzenlenir ve tümörün daha fazla büyümesi için ön koşuldur (Hillen ve Griffioen 2007; Roskoski 2007).



Şekil 2.5. Tümör anjiyogenezin betimlemesi (Yoshimoto vd. 2015'ten uyarlanmıştır.)

Tümör kaynaklı anjiyogenez, tüm tümör yok edilene veya konakçı ölene kadar süresiz olarak devam eder (Folkman 1984). Kanserde, anjiyogenez sadece primer tümörlerde önemli değildir, aynı zamanda metastaz oluşumunda da rol oynamaktadır (Hillen ve Griffioen 2007). Yeni damarlar büyümeyi desteklerken endotel hücreleri, tümör hücreleri için büyüme faktörleri ve tümör istilasını kolaylaştıran çeşitli matriks parçalayıcı proteinazlar salgılar. Genişleyen bir endotel yüzeyi, tümör hücrelerine dolaşıma girme ve metastaz yapma konusunda daha fazla fırsat verir (Ribatti vd. 2006).

Anjiyogenez ve vaskülogenez birbirleriyle karıştırılmamalıdır. Neovaskülarizasyon terimi yeni kan damarı oluşumu anlamına gelir ve ikiye ayrılır:

- 1) Vaskülogenez; kan hücrelerine ve olgun endotel hücrelerine farklılaşan hemanjiyoblastlardan yeni kan damarı oluşumudur.
- 2) Anjiyogenez; anjiyogenez, kılcak damarlanma ile önceden var olan damarlardan yeni kan damarı oluşumudur.

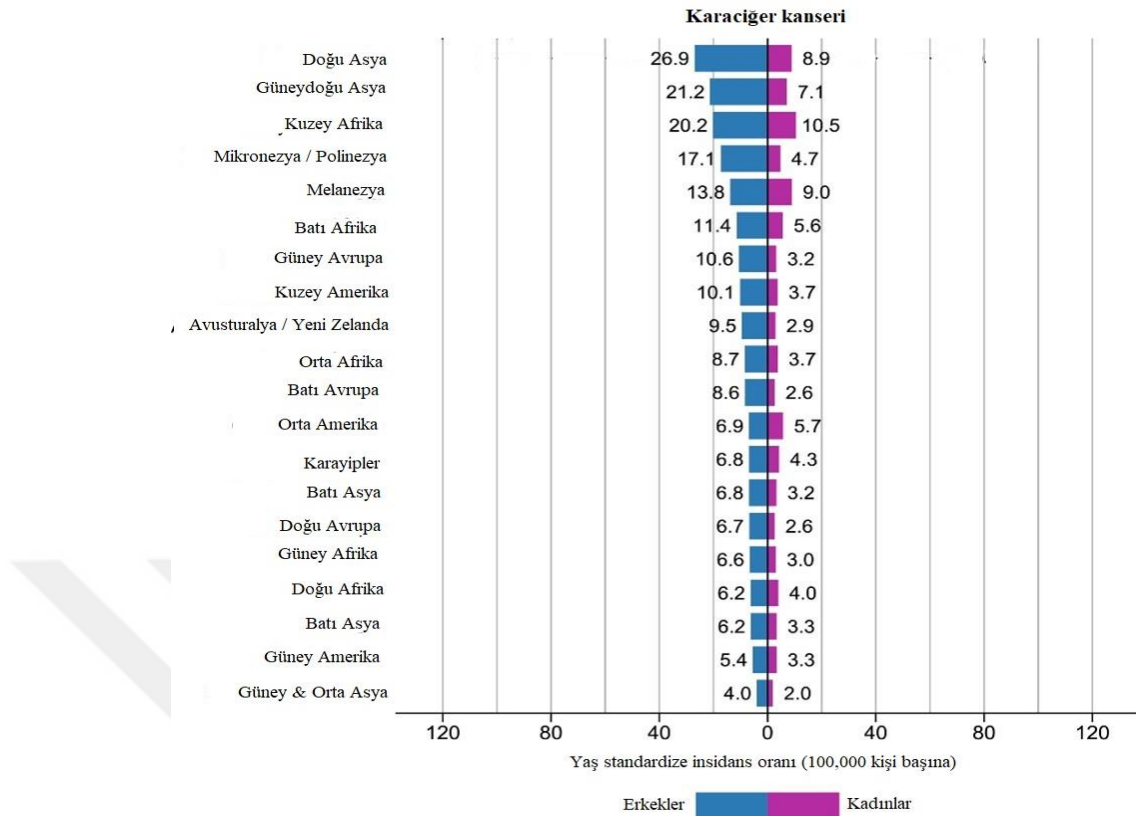
Vaskülogenezin ve anjiyogenezin tam olarak gerçekleşmesi için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyali gereklidir (Roskoski 2007). VEGF, endotel hücre proliferasyonu ve hareketliliğinin genel bir aktivatörüdür. Mevcut damarların genişlemesini indükleyen ve damar duvarının geçirgenliğini artıran bir faktördür. Ayrıca hücre dışı matriksin degradasyonu için matriks metaloproteinazların ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonunu ve ardından endotelial hücre göçünü artırır (Hillen ve Griffioen 2007). İnsan VEGF ailesi; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D'den ve plasental büyüme faktörü (PlGF)'den oluşmaktadır. VEGF reseptör ailesi, üç protein-tirozin kinaz ve iki protein olmayan kinaz reseptöründen (nöropilin-1 ve -2) oluşur. Tümör ilerlemesinde anjiyogenezin önemi nedeniyle, VEGF sinyalleşmesinin inhibisyonu kanser tedavisi açısından oldukça önemlidir (Roskoski 2007).

Antianjiyogenez tedavisinin klinik başarısı mevcuttur, ancak yine de sınırlıdır (Jain 2005). Hastaların az bir kısmında (yaklaşık %30'unda), klasik kemoterapiye antianjiyogenik bileşenin eklenmesi, birkaç haftadan birkaç aya kadar ortalama yaşam süresini uzatabildiği gözlenmiştir (Cao 2010). Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel stratejilerle kombinasyon halinde bir tedavi kanser büyümesini sınırlamada monoterapiden daha başarılı olabileceği düşünülmektedir (Bergers ve Benjamin 2003; Jain 2005). Bevacizumab, klinik onkoloji kullanımı için ilk spesifik anjiyogenez inhibitörü olarak kabul edilir ve başarısı, sonraki yeni antianjiyogenik ilaçların geliştirilmesi ve onaylanması için önemli olmuştur (Cao 2010).

2.2. Karaciğer Kanseri

Primer karaciğer kanseri, yaklaşık 906.000 yeni vaka ve 830.000 ölümle 2020 yılında dünya çapında en sık teşhis edilen altıncı kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen üçüncü nedenidir (Parikh ve Hyman 2007; Asghar ve Meyer 2012; Sung vd. 2021). Primer karaciğer kanseri, vakaların %75 ile %85'ini oluşturan hepatosellüler karsinomu (HCC), %10 ila %15'ini oluşturan intrahepatik kolanjiyokarsinomu ve diğer nadir türleri içerir (Sung vd. 2021).

Hepatosellüler kanser oldukça önemli bir sağlık sorunudur; Dünya çapında her yıl yarım milyondan fazla vaka rapor edilmektedir. Hepatosellüler kanser, erkekleri kadınlara oranla daha çok etkilemektedir (Parikh ve Hyman 2007). Hem insidans hem de mortalite oranları, dünya üzerinde çoğu bölgede erkekler arasında kadınlara göre 2-3 kat daha yüksektir (Şekil 2.6). Karaciğer kanseri, küresel insidans açısından beşinci ve erkekler için mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır (Sung vd. 2021). Hepatosellüler kanser gelişimi için en önemli klinik risk faktörü, karaciğer sirozudur. Siroz gelişimi için Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV) ile kronik enfeksiyonlar, kronik ağır alkol kullanımı, aflatoksin bulaşmış gıdalar, aşırı vücut ağırlığı, tip 2 diyabet ve sigara en önemli risk faktörleridir (Parikh ve Hyman 2007; Sung vd. 2021). Ayrıca, HBV veya HCV enfeksiyonunda kronik alkol kullanımı, tek başına enfeksiyona göre hepatosellüler kanser riskini iki katına çıkarmaktadır. 10 yıldan uzun süre günde 80 g'dan fazla kronik alkol kullanımı, hepatosellüler kanser riskini 5 kat artırmaktadır. İnsülin direnci sendromunun 2 ana belirtisi olan diyabet ve obezite hepatosellüler kanser riskini iki katına çıkarmaktadır (Parikh ve Hyman 2007).



Şekil 2.6. 2020'de karaciğer kanseri için bölge spesifik ve cinsiyete göre yaş standartlaştırılmış insidans oranları (Sung vd. 2021'den uyarlanmıştır.)

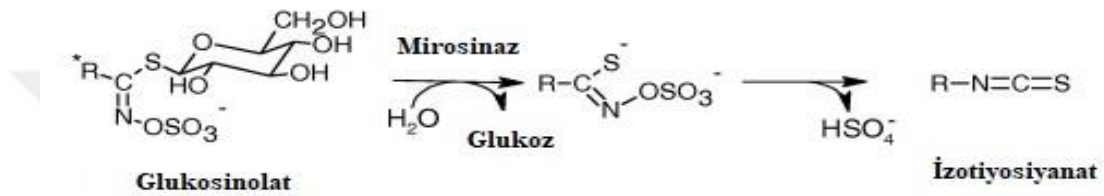
HCC tedavisindeki gelişmelere rağmen, HCC'li hastaların çoğu metastaz nedeniyle tanıdan sonraki 1 yıl içinde ölmektedir. HCC, tipik bir hipervasküler tümördür. Anjiyogenez, HCC'nin hem büyümesi hem de metastazı için gereklidir (Tian vd. 2010). Yetişkin karaciğeri oldukça damarlıdır. Deneysel ve klinik veriler, insan hepatosellüler karsinomda tümör gelişiminin anjiyogenez ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ribatti vd. 2006). VEGF artışı sıklıkla HCC hastalarının karaciğerinde ve serumunda gözlenir ve VEGF seviyelerini saptamak hastanın sağ kalımını tahmin etmede ve prognozu tanımlamada faydalıdır. Bu durum VEGF'in HCC'de önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Tian vd. 2010). HCC hastalarında serum VEGF seviyeleri ilerleyen HCC evresi ile artar ve metastazlı hastalarda en yüksektir. Bu artış, kötü prognozla ilişkilendirilir. İnsan HCC hücreleri, yüksek seviyelerde matriks metaloproteinazlar (MMP) ifade eder. MMP'ler, hücre dışı matrise veya hücre yüzeyine bağlı sitokinlerin VEGF salgılamasını teşvik eder. Ayrıca hepatokarsinogeneze proanjiyogenik faktörleri upregüle eder (Ribatti vd. 2006; Mise vd. 1996).

2.3. *Brassicaceae* Bitkileri

Aroma ve tatlarıyla zevkle tüketilen ve sofralarımızda bolca bulunan sebzeler, beslenmemizde oldukça önemlidir. Gerektiği kadar sebze tüketimiyle, günlük vitamin ve mineral madde ihtiyacının çoğunun karşılandığı bilinmektedir. *Brassicaceae*; brokoli, karnabahar, lahanası, Brüksel lahanası, turp ve çeşitli hardallar gibi sebzeleri içeren bitki

ailesidir. Birçok türü ülkemizde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Park ve Pezzuto 2002; Kurtar vd. 2010). *Brassicaceae* sebzelerindeki en önemli antioksidanlar, toplam antioksidan kapasitesinin %80'ini kapsayan fenolik bileşikler ve C vitamindir (Akagün 2009). *Brassicaceae* ailesinde bulunan karbonhidratlar, amino asitler, organik asitler, vitaminler, mineraller, fenolik bileşikler, flavonoidler, antosiyaninler, karotenoidler ve glukosinolatlar gibi çeşitli metabolitlerin antidiyabetik, antikanser, antienflamatuar ve antioksidan özellikleri ile ilişkili olarak diyabet, kanser ve kalp hastalığı üzerinde yararlı etkiler gözlenmiştir (Park vd. 2017).

Brassica sebzeleri, vücutta bitkiye özgü mirosinaz veya bağırsak florasının enzimatik etkisiyle izotiyosiyanatlara parçalanan zengin glukosinolat kaynaklarıdır (Keum vd. 2004).



Şekil 2.7. Glukosinolatın mirosinaz enzimi tarafından izotiyosiyanat oluşturması

Brassica sebzelerinin kanser önleyici etki mekanizmaları arasında hücrelerdeki DNA'nın zarar görmesini engelleme ve kanserojenleri etkisiz hale getirme sayılabilir. Bu sebzelerin antiviral, antibakteriyel ve antienflamatuar etkiler sergiledikleri, apoptoz aracılığıyla hücre ölümünü indükledikleri, tümörün anjiyogenez ve metastazını inhibe ettikleri de belirtilmektedir (Pasko vd. 2014). Birleşik Devletlerde yeni tanı konulmuş prostrat kanseri olan 65 yaşın altındaki 628 erkeği içeren bir çalışmada 5 yıl boyunca meyve ve sebzeler ile araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmaya göre; meyvelerin kansere karşı koruyucu olmadığı, sebzelerin, özellikle *brassica* sebzelerinin (lahana, brokoli, Brüksel lahanası ve karnabahar) kanser riskini azalttığı tespit edilmiştir (Reddy vd. 2003).

2.3.1. Alabaş bitkisi

Ülkemiz bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde dünyada önemli bir yere sahiptir. Ülkemizin yüksek yetiştiricilik potansiyeli, bitkisel varlığımızda yabancı olarak bulunan ve sonradan kültüre alınan sebzeler yanında, yurt dışından gelen birçok yeni sebze türünün de kolaylıkla yetiştirilmesine imkan sağlamaktadır. Türkiye'de son yıllarda uygulanan tarımsal politikalar ve yasal düzenlemeler sonucunda üreticiler, gelen taleplere de bağımlı olarak geleneksel ürünlerin yerine yeni bitki türlerini de yetiştirme arayışı içerisine girmişlerdir. Bunun sonucu olarak da son yıllarda özellikle *brassicaceae* familyasına ait olan brokoli, Çin lahanası, Brüksel lahanası ve alabaş gibi sebze türleri yetiştirilmeye başlanmıştır (Kurtar vd. 2010).

Brassicaceae ailesinin bir üyesi olan alabaş turpu, yurt dışında kohlrabi, Alman şalgamı veya şalgam lahanası olarak bilinir. Ülkemizde ise alabaş turpu, turp lahanası, yer lahanası, cehennem topuzu veya taş kelem gibi farklı isimlerle tanınmaktadır (Akagün 2009; Anonim 1; Anonim 2). Alabaş (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.), toprak

üzerinde oluşan, besin maddesi depo ederek etlenmiş, şişkin gövdesi ile sebze olarak tüketilmektedir (Akagün 2009; Arın 2005). *Brassica* grubu sebzelerden olan alabaş bitkisini, bu grupta bulunan diğer sebzelerden ayıran özelliği ise sebze olarak değerlendirilen gövde kısmının depo halinde gelişmesidir. Yumru kısmının üstünden yaprak kısmı çıkar. Diğer grup üyelerinden yaprak sapları uzun olsa da gruptaki sebzelere göre küçük yaprak ayasına sahiptir (Akagün 2009). Şekil 2.8 ve Şekil 2.9’da gösterildiği gibi renk olarak alabaşlar dışta beyaz, yeşil veya mor olabilir, ancak iç kısım daima soluk beyazdır (Arın 2005).



Şekil 2.8. a) Mor renk alabaş bitkisi; b) yeşil renk alabaş bitkisi



Şekil 2.9. Soluk beyaz renkte olan alabaş bitkisinin iç kısmı (Park vd. 2012)

Alabaş her toprakta yetişebilmektedir. Sıcaklık optimumu 22° C olması gerekir (Akagün 2009). 1554 yılında alabaşın ilk tanımlanması Avrupalı botanikçiler tarafından yapılmıştır. Alabaşın anavatanının Batı Avrupa ülkelerinden köken aldığı düşünülmektedir (Akagün 2009; Arın 2005). Ülkemize alabaşın ne zaman geldiği bilinmemektedir (Yıldırım vd. 2017). Doğu Anadolu Bölgesi'nde 'Taş Kelem' olarak bilinmekte olan alabaşın yetiştiriciliğinde az da olsa yapılmaktadır. Ülkemizde tüketimi çok olmasa da İngiltere, Almanya, Belçika ve Hollanda'da oldukça fazla bir şekilde tüketilmektedir (Akagün 2009).

Alabaş, tat özelliği bakımından şalgama benzer (Kurtar vd. 2010). Alabaş yumrusu, salataya çiğ olarak veya bazı yemeklerin yanında haşlanarak tüketilebilir. Yumruların kabuğu soyulduktan sonra ince dilimler halinde veya küp şeklinde kesilerek kullanılır. Yaprakları mineral madde bakımından zengindir ve salatada, çorbada veya ıspanak niyetine kullanılır. İri olan yapraklardan sarma yapılabilir. Alabaşın konservesi de yapılabilir ve bu amaçla kullanılan alabaşlar, açık renkli ve yumuşak olan yumrular tercih edilmektedir. Alabaş, pazarlarda kilo hesabı tartılarak veya adet hesabı ile satılır. Hasat sonrası gözlenen kalite kaybı olmadan buzdolabında bir hafta kadar tazeliğini koruyarak depolanabilir (Arın 2005).

Alabaşın besin değerinin karnabaharla benzerlik gösterdiği ve iyi bir C vitamini, potasyum kaynağı olduğu bilinmektedir (Kurtar vd. 2010; Yıldırım vd. 2017; Warne 1942). Az kalori içermesi ve bol lifli yapısı ile diyetle oldukça önemli olduğu düşünülür (Akagün 2009). Alabaş birçok hastalığı önleyici etkisinin yanında içeriğinde bulunan beta karoten, folik asit, C ve A vitamini gibi maddeler sayesinde kanser, katarakt, yüksek tansiyon, böbrek taşı, sinir sistemi hastalıkları ve felç gibi hastalıklarda iyileştiren özelliklere de sahiptir (Yıldırım vd. 2017).

Besin maddesi içeriği alabaşın yapraklarında protein ve fosfor başta olmak üzere yumru kısmına göre daha fazla zengindir. Fenolik madde içeriği de yapraklarda gövdeninkinden 3 kat fazladır. Bu yüzden genç yaprakların tüketilmesi tavsiye edilmektedir (Akagün 2009; Arın 2005). Yaprak kısmı gövdesinden daha yüksek antioksidan etkiye sahiptir. *Brassicaceae* ailesi içinde alabaş bitkisinin gövde ve yapraklarının antioksidan aktivitesi karnabahardan yüksekken süs lahanasından düşük bir aktivite göstermiştir. Alabaş son zamanlarda yeni yeni beslenmemizde yer almaktadır. Bu durum bitkinin özellikle yapraklarının tüketiminin vücudun antioksidan savunma sisteminin serbest radikallerle mücadelesine yardımcı olacağını göstermektedir (Akagün 2009).

Alabaş melatonin içerir. Melatonin ve metabolitleri ayrıca hücre zarlarını ve kan-beyin bariyerini geçebilen güçlü antioksidanlardır. Melatoninin serbest radikal hasarına karşı koruyucu mekanizması dolaylı olarak süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin sentezlenmesinde etkisi ile ilişkilidir. Bunun yanı sıra, melatonin ayrıca bağışıklık sistemi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir, sitokin üretimini artırabilir ve sadece viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda değil aynı zamanda kanser tedavisinde de faydalı olabilmektedir (Pasko vd. 2014).

Alabaş bitkisi, esas olarak glukosinolatlar ve indollerden oluşur (Zarzour 2012). Bir çalışmada mor alabaşın güçlü antidiyabetik, antioksidan ve antienflamatuar aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Antosiyaninler, izotiyosiyanatlar ve glukosinolatların varlığına ek

olarak, bu çalışma iltihabı ve diyabeti önleme potansiyeli olan antioksidan aktivitesinden sorumlu fenolik bileşiklerin varlığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, alabaşın ve özellikle mor alabaşın çok faktörlü aktivitesi, diyabetin yanı sıra komplikasyonlarının tedavisi için de yeni bir alternatif terapötik ajan olarak ümit verici bulunmaktadır (Jung vd. 2014).

Alabaş yumrusunun etanol ekstraktının sitotoksik etkileri HT29 ve Caco-2 kolon kanser hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Elde edilen bulgular bitki ekstraktının kolon kanser hücrelerinde istatistiksel açıdan önemli sitotoksik etkiler sergilediğini işaret etmektedir (Zarzour 2012).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılan insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) Dr. Öğr. Üyesi Çağrı ÖNER'den (Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı) temin edildi. İnsan embriyonik böbrek epitel hücre hattı (293T) önceki yıllarda ATCC' den (American Type Culture Collection) alınmış olup laboratuvarımızda dondurulmuş bir şekilde stoklanmıştır. Deney için stoktan açılıp çoğaltılmıştır.

Deneyde kullanılan her iki hücre tipi %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 MEM-NEAA (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acid Solution-100x), %0,5 Sodyum piruvat ve %0,2 antibiyotik-antimikotik (10,000 U/mL penisilin, 10,000 µg/mL streptomisin ve 25 µg/mL Amphotericin B) ilaveli DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlandı. Stoklanacak hücreler %5 DMSO (Dimetil sülfoksit) %10 FBS ilaveli serumsuz besi yeri ile hazırlanan dondurma solüsyonu içerisinde -20 °C'de 1 saat bekledikten sonra -80 °C' ye alınıp saklanmaktadır.

3.2. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada mor alabaş (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L.) bitkisine ait örneklerin yumru kısımları kullanıldı. Deneylerde kullanılan alabaş, Erüst Tarım (Antmek Tarım Ürünleri Gıda San. Tic. Ltd. Şti.) tarafından yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1. Erüst Tarımdan gelen alabaş örnekleri

3.3. Alabaş Bitkisi Yumrusunun Etanol Ekstraktının Hazırlanması

Alabaşın yaprak ve yumru kısımları birbirinden ayrıldı. Bitki yumruları önce çeşme suyu ve ardından distile su ile yıkandı. Bir kapta distile su içerisinde 10 dakika bekletildi. Sonrasında %80'lik etanol-distile su karışımında biraz bekletilerek yıkandı. Temizlenen gövdeler taze haliyle kullanıldı. Taze yumru örneği ilk önce küçük parçalara

ayrılıp sonrasında parçalayıcı yardımı ile parçalandı. Elde edilen bitki püresi ağırlıkları bilinen kavanozlara koyulup tekrar tartıldı. Tartım sonuçları bir kenara yazıldıktan sonra kavanoz içerisine %90'lık etanol-distile su (200ml) eklendi. Kavanozların ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp bir hafta 37 °C çalkalayıcılı su banyosunda inkübe edildi. 1 hafta sonra su banyosundan alınan örnekler süzgeç yardımıyla sıvı ve katı kısım birbirinden ayrıştırıldı. Katı kısım kurutma kağıdında kurumaya bırakıldı. Kalan pellet tartılarak % verim aşağıda verilen formülle hesaplandı. Sıvı kısım santrifüj tüplerine alındı. Özüt kullanılabilecek kadar -20 °C derin dondurucuda saklandı.

$$\% \text{ Verim} = (\text{Kuru ekstre ağırlığı} / \text{Kuru bitki ağırlığı}) \times 100$$



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.2. a) Bitki kısımlarının ayrıştırılması; **b)** Bitki örneklerinin temizlenme aşaması; **c)** Hesaplamalar için gerekli tartımların alınması; **d)** %90 etanol eklenmiş su banyosuna alınmaya hazır olan örnekler

3.4. Alabaş Bitkisi Etanol Ekstraktı Dozlarının Hazırlanması

Ekstraksiyonda mor renkli alabaşlar kullanıldı. Alabaş yumrusu etanol ekstraktı HepG2 ve 293T hücrelerine 200, 150, 100, 80, 60, 30, 15, 7.5, 3.75 ve 1.9 µg/mL'lik dozlarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri içerisinde test edilmiştir. Her inkübasyon süresi için ekstraktın hücrelerde sergilediği IC₅₀ değerleri ayrı ayrı belirlenmiştir.

-20 °C'lik derin dondurucuda saklanan ekstrakt dondurucudan çıkartılarak 0,22 µm şırınga filtreden geçirilerek steril edildi. Ana ve ara stoklara bölündü. %1 FBS'li besi yeriyle seyreltilerek 200, 150, 100, 80, 60, 30, 15, 7.5, 3.75 ve 1.9 µg/mL'lik dozlar hazırlandı.

3.5. WST-8 Hücre Proliferasyon Kiti

WST-8 hücre proliferasyon kiti kullanılarak ekstraktın sitotoksik etkileri araştırıldı. Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarında çoğaltıldı. Petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril platelere ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırıldı ve %1'lik FBS içeren besi yerinde hazırlanan ekstrakt dozları sırasıyla (200, 150, 100, 80, 60, 30, 15, 7.5, 3.75 ve 1.9 µg/mL) kuyucukların her birine 100 µl olacak şekilde eklendi. Ekstrakt uygulamasının hemen ardından ilk sıra, 8 kuyucukta, hücre canlılığı saptandı ve bu değerler başlangıç zamanı (T0) olarak kaydedildi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından kuyucuklardaki besi yeri üzerine 10 µl WST-8 solüsyonu eklendi ve plateler 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda platelerin absorbans değerleri Elisa kit okuyucu multiskan spektrofotometrede, 450 nm dalga boyunda ölçülüp kaydedildi. % Canlılık aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{OD Örnek} / \text{OD Kontrol}) \times 100$$

3.6. Tripan mavisi testi

WST-8 sitotoksosite testi sonuçlarının doğruluğunun desteklenmesi amacıyla tripan mavisi testi yapıldı. Tripan mavisi (Sigma, T8154), hücre canlılığının doğrudan mikroskopik olarak belirlenmesini sağlayan bir testtir.

Hücreler 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara bölündü. Yirmi dört saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak; %1 serumlu besi yeriyle hazırlanan ½ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ özellik gösteren dozlardaki (11.695 µg/mL, 23.39 µg/mL ve 46.78 µg/mL) ekstraktlar 48 saatlik inkübasyon süreleri içerisinde iki tekrarlı olacak şekilde uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılan kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. İnkübasyon süreleri sonunda, besi yerleri toplanarak 1000 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Kuyucukların üzerine 500 µl, Tripsin-EDTA eklenerek hücreler plaklardan kaldırılıp ve tüpteki çökeltinin üzerine eklendi. Karışım, 1500 rpm'de 2 dakika daha döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırılıp ve üzerlerine 500 µl Tripan mavisi eklenerek pelletler çözündürüldü. Örnekler buz içerisinde

alınıp ve hücre konsantrasyonuna bağlı olarak PBS (fosfat tamponlu salin) ile sulandırılarak, canlı ve ölü hücre sayıları ışık mikroskobu altında hemositometre kullanılarak belirlendi. Hücrelerin canlılığı, hücre içine tripan mavisinin alınıp alınmadığına bağlı olarak mikroskopta gözlenen renk ile değerlendirildi. Membran hasarı olan hücreler boyandıkları için mavi renkte gözlenirken canlı hücreler içerisine boyanın girmesi söz konusu olmadığından şeffaf renkte gözlemlendi. Canlı hücrelerin miktarı aşağıda verilen formüller ile hesaplandı.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı / mL} = (\text{Toplam Hücre Sayısı} / n) \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10$$

(n: Hemositometredeki karelerden kaç tanesinin sayıldığını göstermektedir.)

$$\% \text{ Canlı Hücre} = (\text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100$$

3.7. Kaspaz-3 Enzim Miktarının Araştırılması

HepG2 hücreleri küçük petri kaplarına 1×10^6 /mL olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda, yapışan hücrelerin besi yerleri çekildi. Hücrelere belirlenen $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ özellik gösteren dozlarda (11.695 µg/mL, 23.39 µg/mL ve 46.78 µg/mL) %1 serum içeren besi yeri ile hazırlanan ilaçlar uygulandı. Hücreler tekrar inkübasyona kaldırıldı (48 saat). Inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki besi yerleri çekildi. Petride kalan hücrelere, fosfat tamponu eklenerek petri içerisinde hücre kazıyıcısı yardımı ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler süpernatantların üzerine eklendi ve 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak çökelti üzerine 1 mL kaspaz hücre parçalama tamponu (1X) eklendi. Hücreler dondurup-çözme yöntemi kullanılarak parçalandı. Bu yöntemde hücreler beş kez art arda, -80 °C derin dondurucuda dondurulup ardından oda sıcaklığında çözündürüldü. Hücre ekstraktı, ikinci kez 2000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Sonrasında örneklerin süpernatantları buz içerisine yerleştirilmiş ependorf tüplere aktarıldı. Örneklerde bulunan kaspaz-3 miktarı, kaspaz-3 kolorimetrik elisa kitinin (BT Lab, Kat no: E4804Hu) protokolü izlenerek belirlendi.

3.8. VEGF Miktarının Araştırılması

HepG2 hücreleri küçük petri kaplarına 1×10^6 /mL olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda, yapışan hücrelerin besi yerleri çekildi. Hücrelere belirlenen $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ özellik gösteren dozlarda (11.695 µg/mL, 23.39 µg/mL ve 46.78 µg/mL) %1 serum içeren besi yeri ile hazırlanan ilaçlar uygulandı. Hücreler tekrar inkübasyona kaldırıldı (48 saat). Inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki besi yerleri çekildi. 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım buz içerisindeki ependorflara aktarıldı. Bu örnekler hücreden salınan VEGF miktarının araştırılmasında kullanıldı.

Petride kalan hücrelerin üzerine 2 mL fosfat tamponu eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı yardımı ile kaldırıldı. Hücreler dondurup-çözme yöntemi kullanılarak parçalandı.

Bu yöntemde hücreler beş kez art arda, -80 °C derin dondurucuda dondurulup ardından oda sıcaklığında çözündürüldü. Hücre ekstraktı, ikinci kez 2000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Sonrasında örneklerin süpernatantları buz içerisine yerleştirilmiş ependorf tüplere aktarıldı. Hazırlanan bu örnekler, hücre içerisindeki VEGF miktarını saptamak için kullanıldı. Örneklerde bulunan VEGF miktarı, VEGF kolorimetrik elisa kit (BT Lab, Kat no: E0080Hu) protokolü izlenerek belirlendi.

3.9. MMP-9 Miktarının Araştırılması

HepG2 hücreleri küçük petri kaplarına 1×10^6 /mL olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yapışması için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda, yapışan hücrelerin besiyerleri çekildi. Hücrelere belirlenen $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ özellik gösteren dozlarda (11.695 µg/mL, 23.39 µg/mL ve 46.78 µg/mL) %1 serum içeren besiyeri ile hazırlanan ilaçlar uygulandı. Hücreler tekrar inkübasyona kaldırıldı (48 saat). Inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki besiyerleri çekildi. 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım buz içerisindeki ependorflara aktarıldı. Bu örnekler hücreden salınan MMP-9 miktarının araştırılmasında kullanıldı.

Petride kalan hücrelerin üzerine 2 mL fosfat tamponu eklendi ve hücreler hücre kazıyıcı yardımı ile kaldırıldı. Hücreler dondurup-çözme yöntemi kullanılarak parçalandı. Bu yöntemde hücreler beş kez art arda, -80 °C derin dondurucuda dondurulup ardından oda sıcaklığında çözündürüldü. Hücre ekstraktı, ikinci kez 2000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Sonrasında örneklerin süpernatantları buz içerisine yerleştirilmiş ependorf tüplere aktarıldı. Hazırlanan bu örnekler, hücre içerisindeki MMP-9 miktarını saptamak için kullanıldı. Örneklerde bulunan MMP-9 miktarı, MMP-9 kolorimetrik elisa kit (BT Lab, Kat no: E0936Hu) protokolü izlenerek belirlendi.

3.10. İstatistiksel Analiz

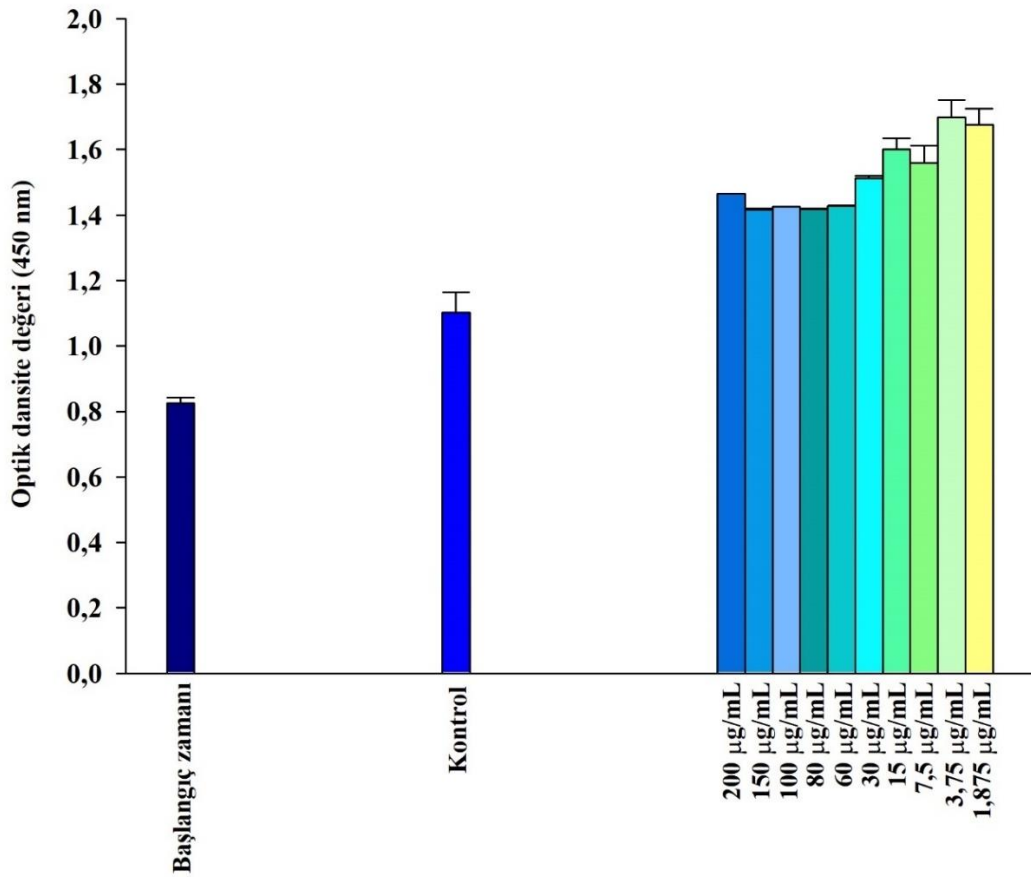
Sitotoksikite testlerinden elde edilen deney sonuçlarında kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. Enzim miktarı ile ilgili deneylerden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve Mann-Whitney Testi kullanılarak değerlendirildi. Ekstraktın IC₅₀ değerleri Sigma Plot 10.0 istatistik programı kullanılarak belirlendi. Tüm veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

4. BULGULAR

4.1. Alabaş Bitkisi Ekstraktının 293T ve HepG2 Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

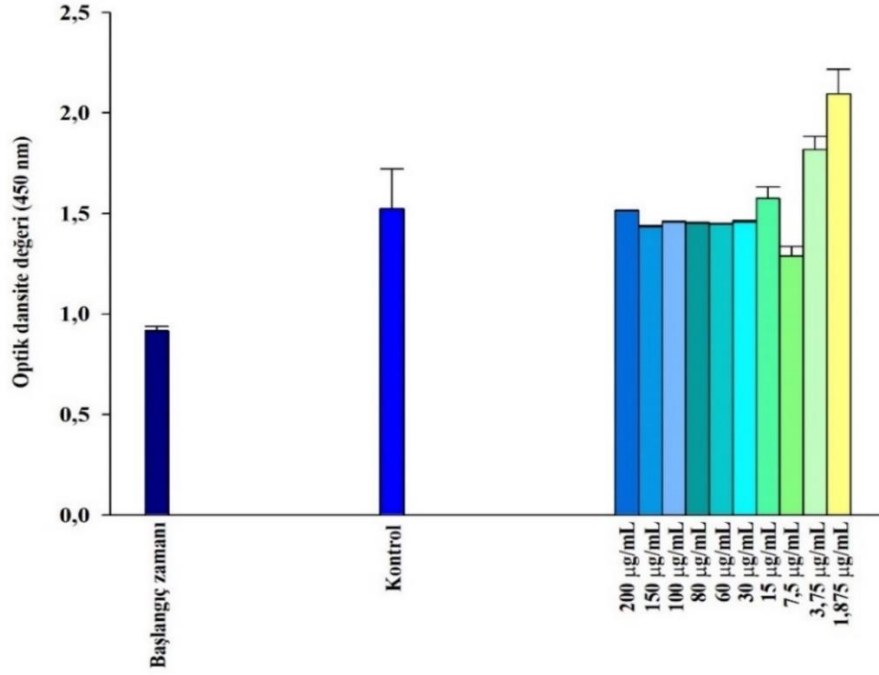
4.1.1. 293T hücre hattı

24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, alabaş ekstraktının 200 µg/mL-1.875 µg/mL aralığında denenen dozların hiçbirinde 293T hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmedi. Ancak, 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, 200, 150, 100, 80, 60 ve 30 µg/mL olan dozların 293T hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (*, $p < 0.05$ ve **, $p < 0.01$). Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresindeki 293T hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek Şekil 4.1,'de gösterilmiştir.

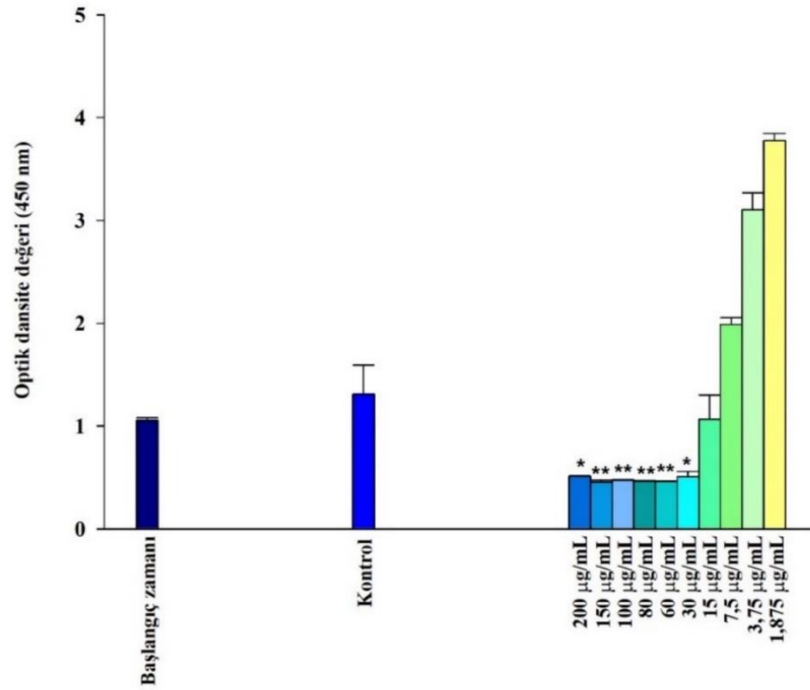


Şekil 4.1. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi

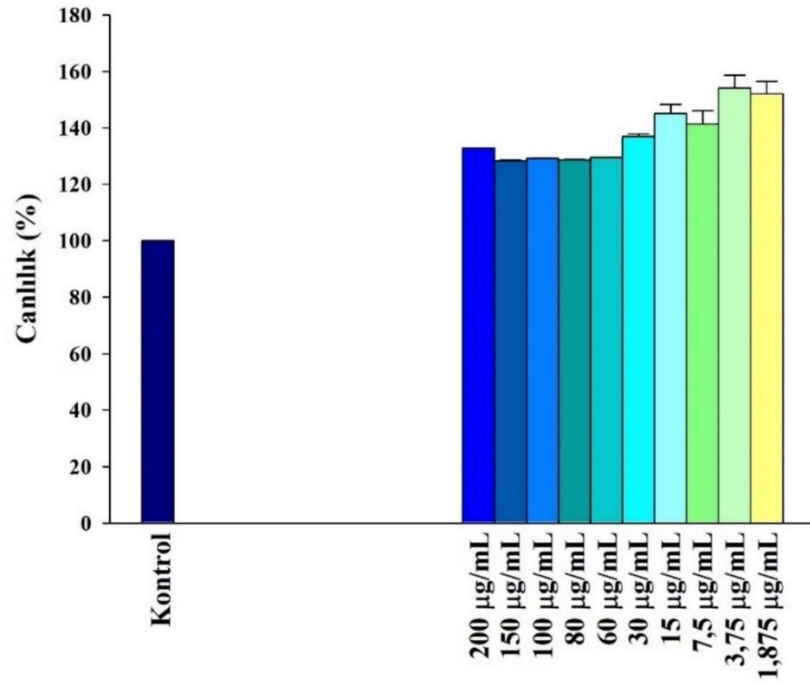
Alabaş ekstraktının 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 293T hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. 293T hücreleri için elde edilen absorbans değerleri kullanılarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığı yüzdeleri hesaplandı ve sırasıyla Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sunuldu.



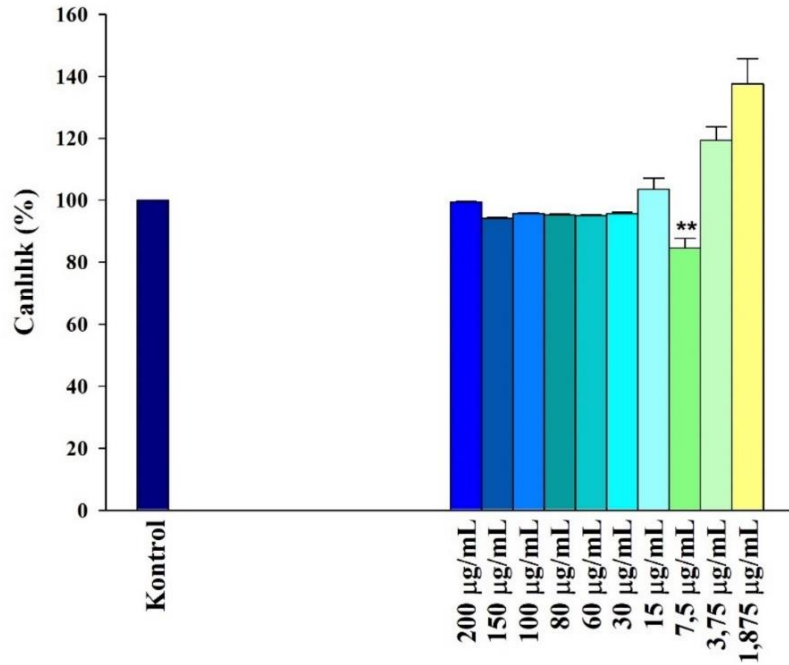
Şekil 4.2. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi



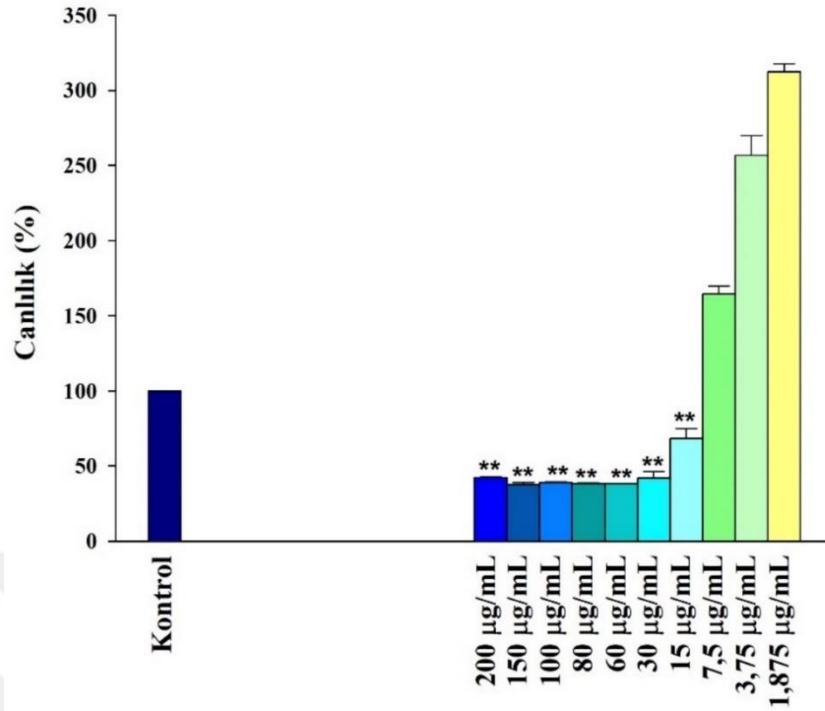
Şekil 4.3. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293T hücre hattı üzerine etkisi



Şekil 4.4. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenilen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)



Şekil 4.5. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenilen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)



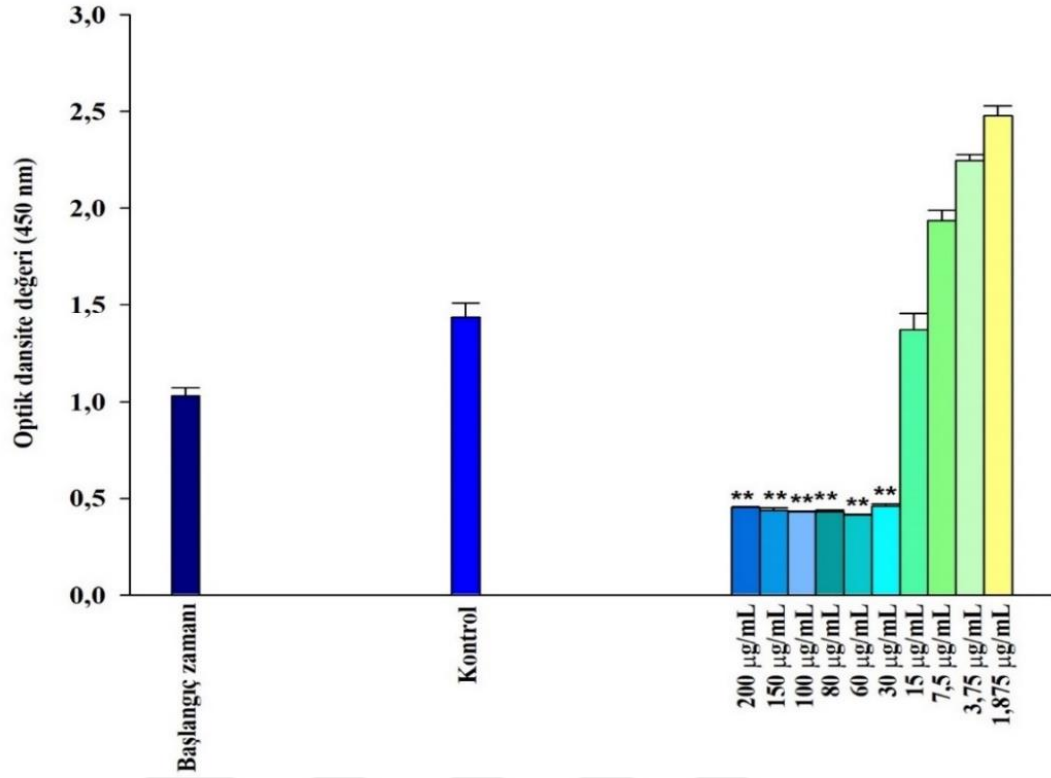
Şekil 4.6. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

Elde edilen sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda alabaş ekstraktının 200 µg/mL-1.875 µg/mL aralığında denenen dozların hiçbirinde 293T hücrelerinin canlılık yüzdeleri üzerine bir etkisi gözlenmedi. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda alabaş ekstraktının sadece 7.5 µg/mL dozunda 293T hücrelerinin canlılık yüzdesi kontrole göre anlamlı bir azalma göstermiştir (**, $p < 0.01$). 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, 200, 150, 100, 80, 60, 30 ve 15 µg/mL olan dozların 293T hücrelerinin canlılık yüzdesini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (**, $p < 0.01$).

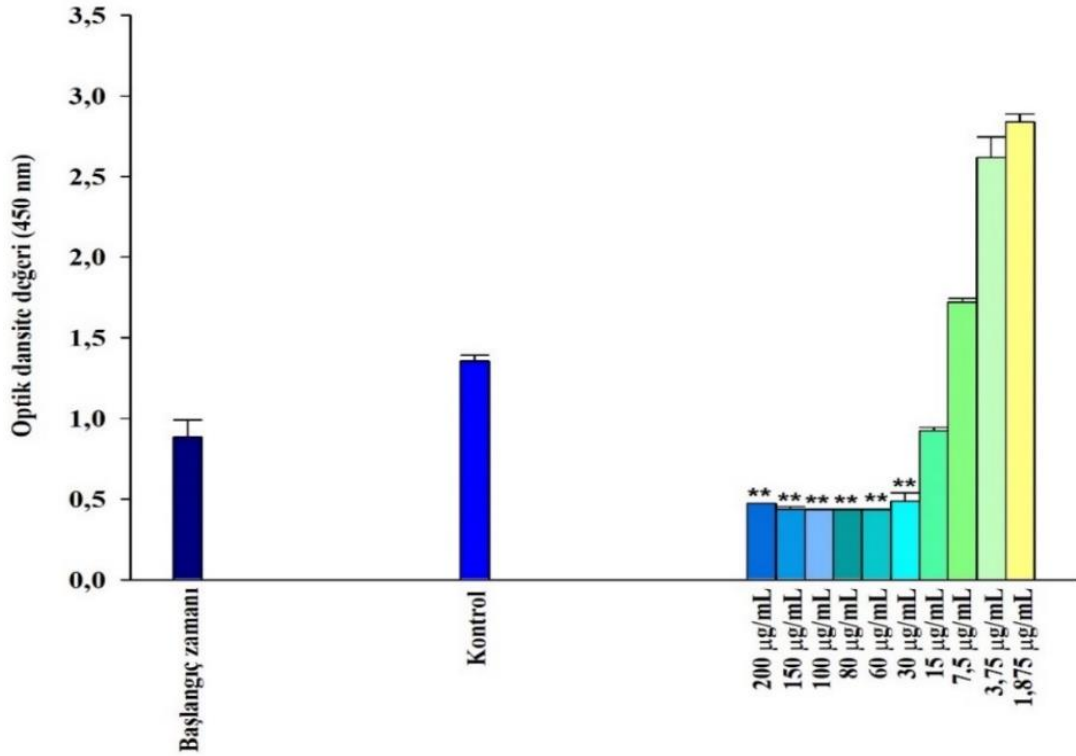
4.1.2. HepG2 hücre hattı

Alabaş ekstraktının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda denenen tüm dozlarda HepG2 hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisi sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Alabaş ekstraktının 200, 150, 100, 80, 60, ve 30 µg/mL dozlarında HepG2 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (*, $p < 0.05$ ve **, $p < 0.01$). 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığı yüzdeleri hesaplandı ve sırasıyla Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de sunuldu.

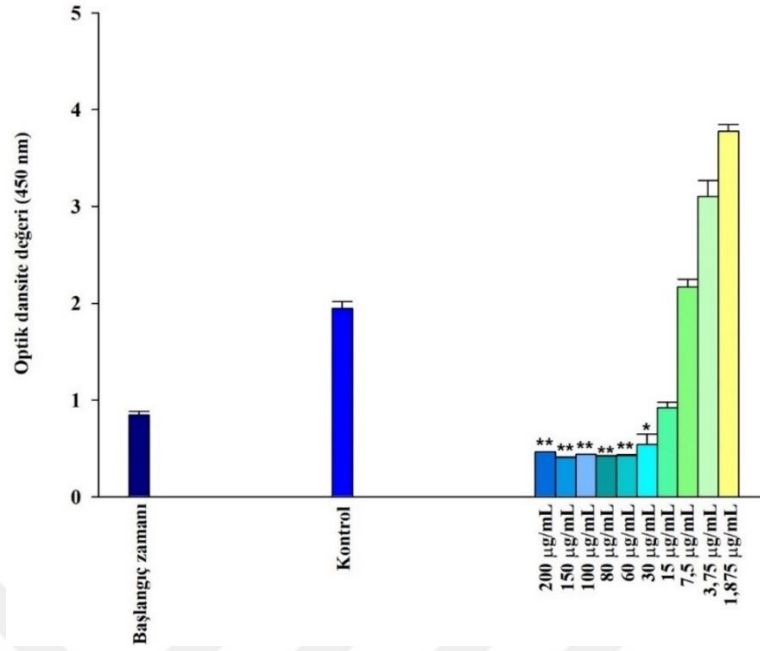
Elde edilen sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda alabaş ekstraktının 200, 150, 100, 80, 60, ve 30 µg/mL aralığında denenen dozların hepsinde HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdelerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (**, $p < 0.01$). 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda alabaş ekstraktının 200, 150, 100, 80, 60, 30 ve 15 µg/mL’lik dozlarda HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdesini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı saptandı (**, $p < 0.01$).



Şekil 4.7. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi

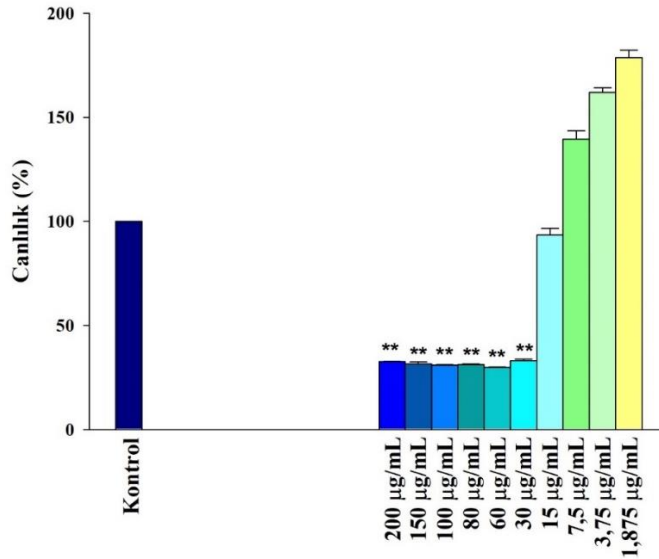


Şekil 4.8. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi

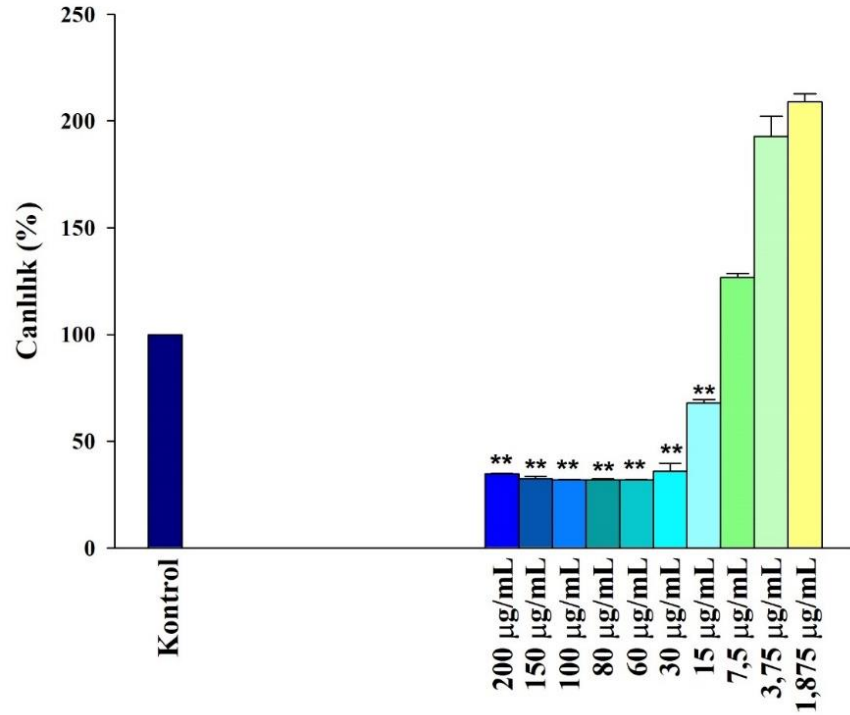


Şekil 4.9. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücre hattı üzerine etkisi

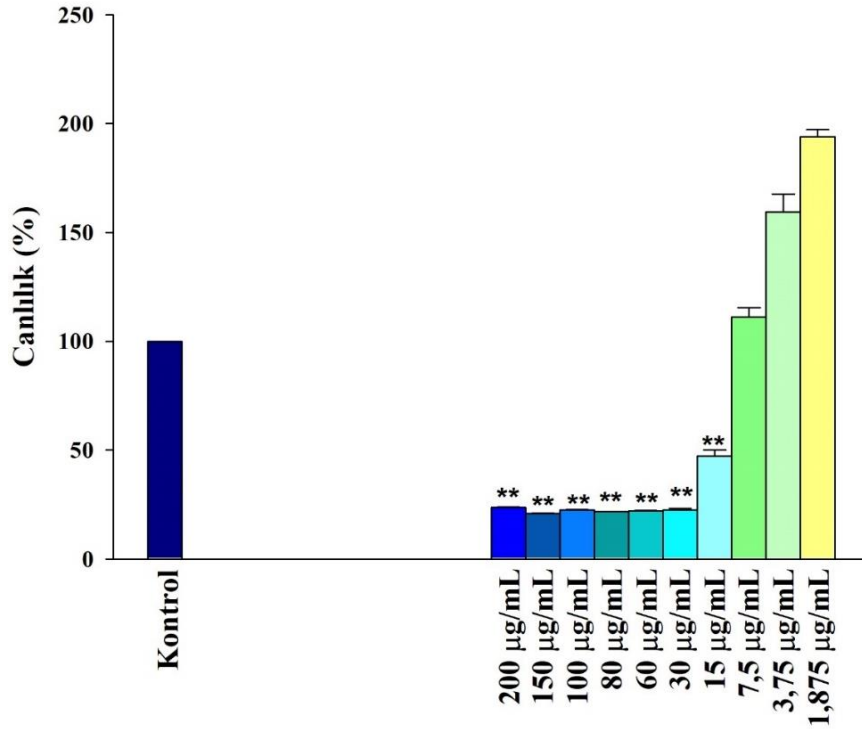
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 293T hücreleri için 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ekstraktın IC_{50} değeri saptanamamış ancak 72 saat sonunda IC_{50} değeri $25.73 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. HepG2 hücreleri için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda saptanan IC_{50} değerleri sırasıyla 25.97, 23.39 ve $14.52 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. HepG2 için en düşük IC_{50} değeri 72 saat olsa da seçici sitotoksikite arandığı için 293T de sitotoksik etki göstermeyen 48 saat IC_{50} değerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.10. Alabaş ekstraktının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 $\mu\text{g/mL}$ arasında denenilen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)



Şekil 4.11. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)



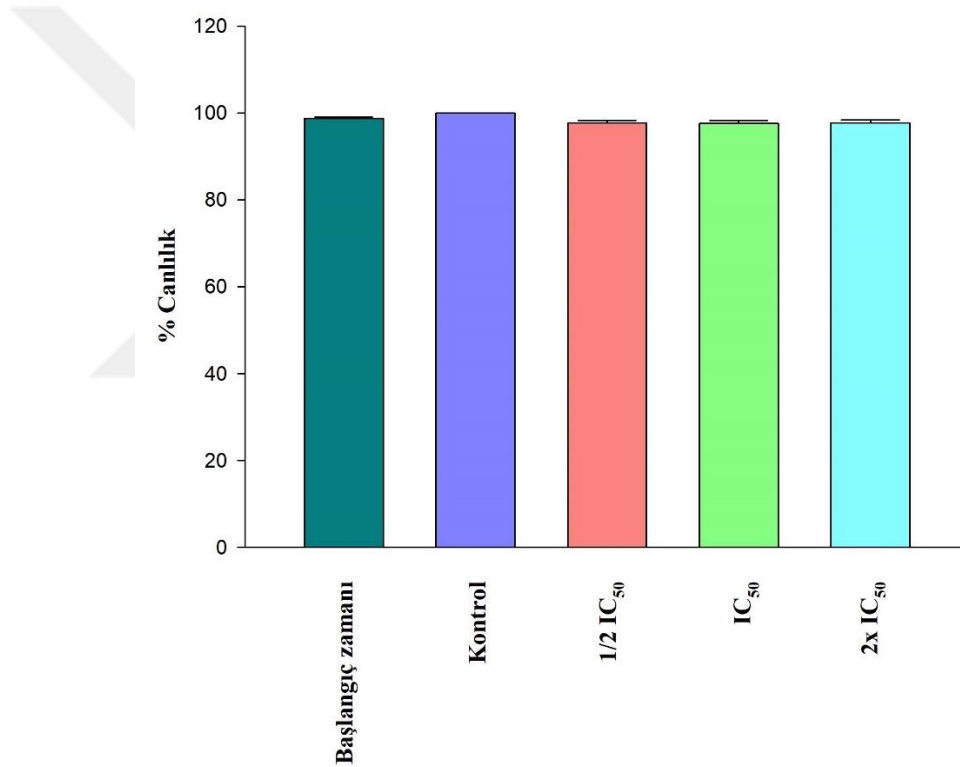
Şekil 4.12. Alabaş ekstraktının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 200-15 µg/mL arasında denenen dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.2. Alabaş Bitkisi Ekstraktının 293T ve HepG2 Hücre Hatları Tripan Mavisi Testi Sonuçları

WST-8 deneylerini desteklemek için yapılan bu testte 48 saat inkübe edilen hücreler için alabaş ekstraktının $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ (11,695 µg/mL, 23,39 µg/mL ve 46,78 µg/mL) değerleri kullanılmıştır.

4.2.1. 293T hücre hattı

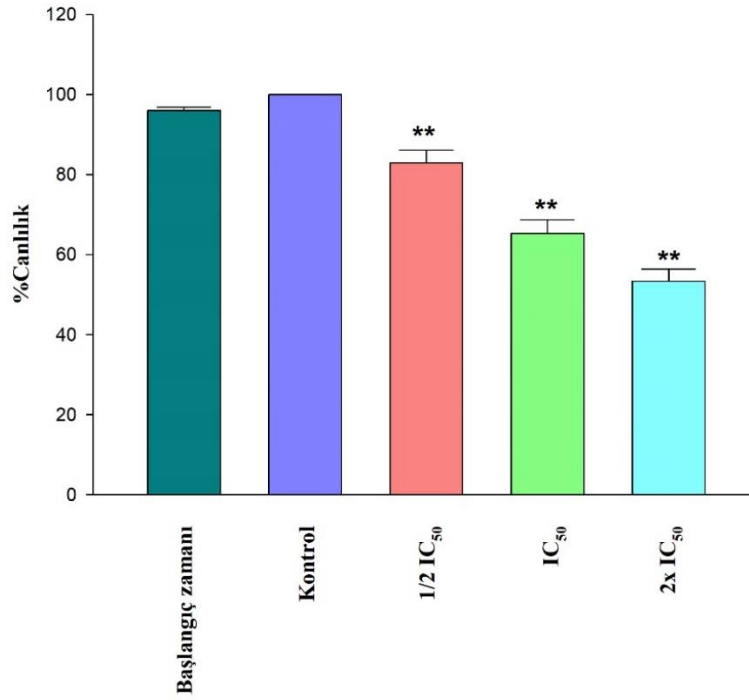
Tripan mavisi testi, alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 11,695 µg/mL, 23,39 µg/mL ve 46,78 µg/mL dozlarının, 293T hücre hattında % canlılık üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. 293T hücresinin tripan mavisi testi sonucunun grafiği Şekil 4.13'te gösterilmektedir.



Şekil 4.13. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ dozlarının, 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.2.2. HepG2 hücre hattı

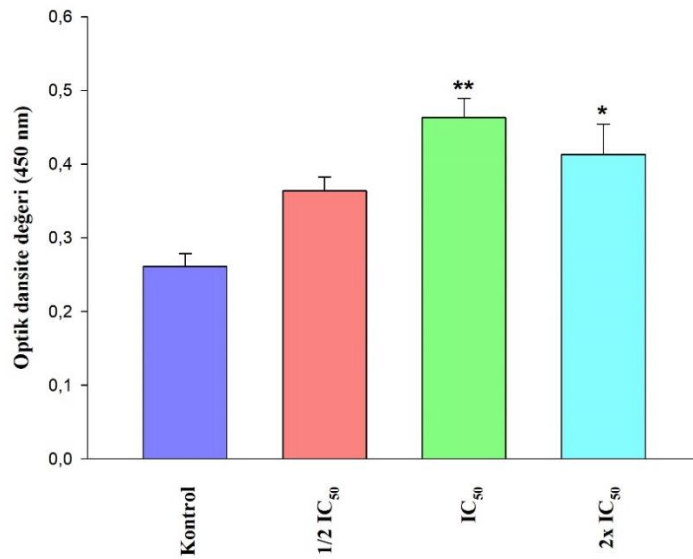
Tripan mavisi testi sonuçlarına göre, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, alabaş ekstraktı, $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ değerlerinde HepG2 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak önemli ölçüde azaltmıştır (**, p<0.01) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ dozlarının, HepG2 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.3. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde Kaspaz-3 Miktarı Üzerindeki Etkisi

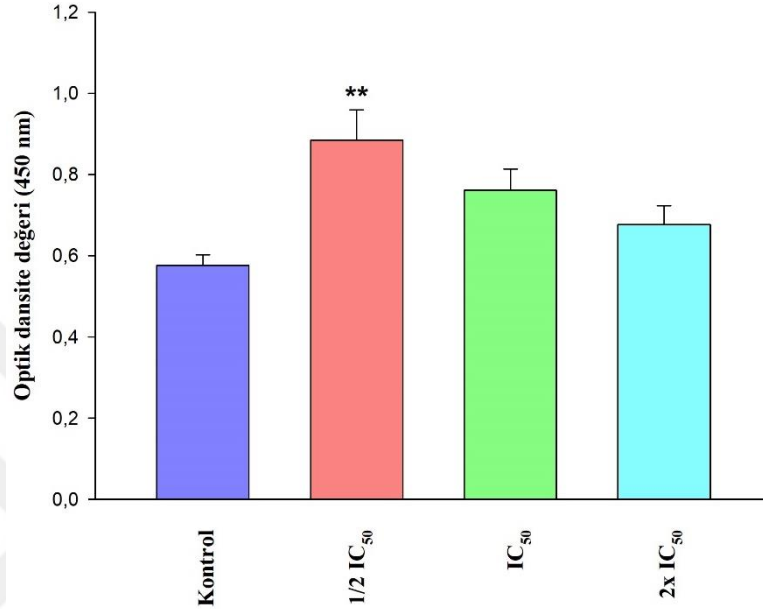
HepG2 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası IC₅₀ ve 2x IC₅₀ dozlarında kaspaz-3 miktarı istatistiksel olarak önemli bir artış göstermiştir (*, p<0.05 ve **, p<0.01) (Şekil 4.15).



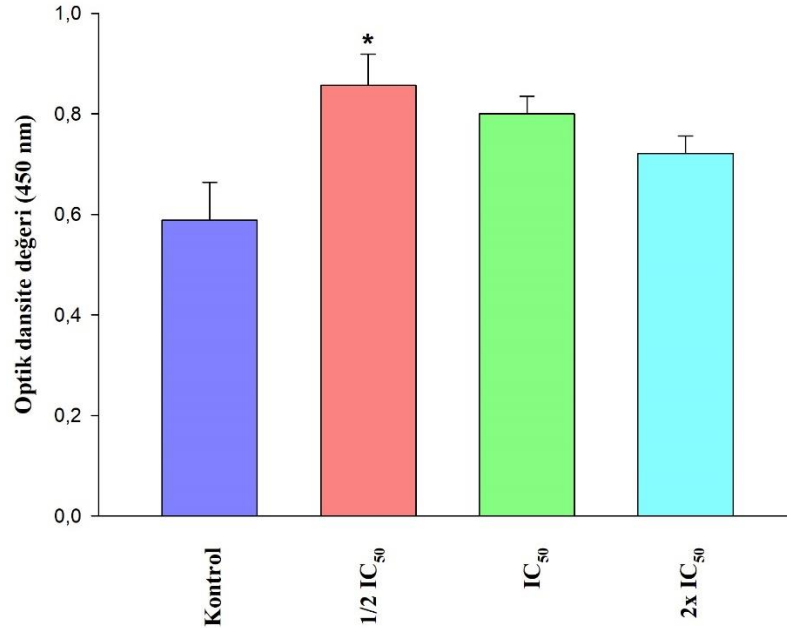
Şekil 4.15. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarı üzerine etkisi

4.4. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde MMP-9 Miktarı Üzerindeki Etkisi

HepG2 hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon sonrası $\frac{1}{2}$ IC₅₀ değeri dışındaki dozlarda istatistiksel önemi olan bir değişim gözlenmemiştir. Hücre içi MMP-9 enzimi miktarı üzerindeki etkisi Şekil 4.16’te, hücre dışına salınan MMP-9 miktarı üzerine etkisi ise Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



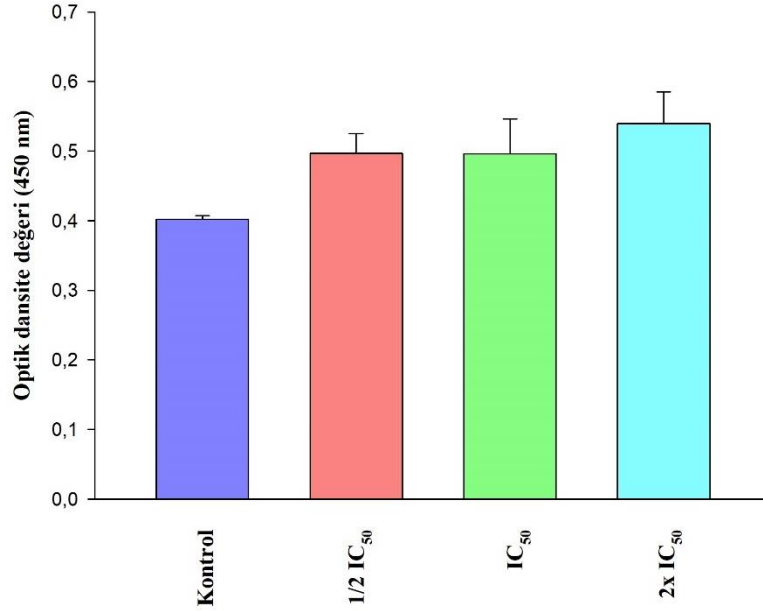
Şekil 4.16. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki hücre içi MMP-9 miktarı üzerine etkisi



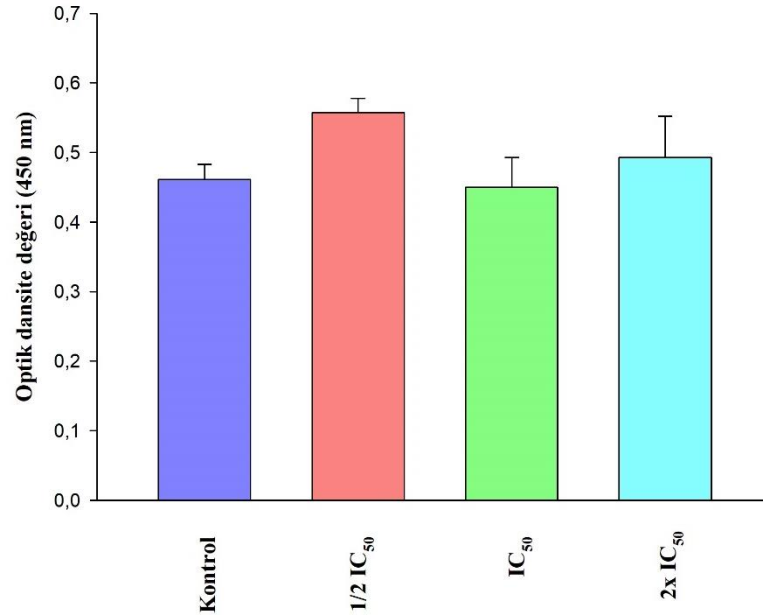
Şekil 4.17. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerinden salınan MMP-9 miktarı üzerine etkisi

4.5. Alabaş Ekstraktının HepG2 Hücrelerinde VEGF Miktarı Üzerindeki Etkisi

HepG2 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası denenen hiçbir dozda istatistiksel önemi olan bir değişim gözlenmemiştir. Ekstraktın hücre içi VEGF miktarı üzerindeki etkisi Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Ekstraktın hücre dışına salınan VEGF miktarı üzerine etkisi ise Şekil 4.19’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerindeki hücre içi VEGF miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.19. 48 saat inkübasyon sonunda $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ alabaş ekstraktı dozlarının HepG2 hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesiyle sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir. Hepatosellüler karsinoma (HCC), dünya çapındaki primer karaciğer kanserlerinin %80'inden sorumludur. HCC, ağır bir hastalık yükü oluşturur ve dünyanın birçok yerinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Karaciğer kanseri, her iki cinsiyette de yüksek ölüm oranı ile dünya çapında nispeten yüksek bir insidansa sahiptir (Ravikumar 2015; Yang vd. 2019; Lampe ve Peterson 2002; Abu-Qatouseh 2020).

Sık sebze tüketiminin sağlığa yararlı etkileri herkes tarafından kabul edilmektedir. Bu yararların pek çoğu fitokimyasallar olarak da adlandırılan ikincil bileşiklerle ilgilidir. Brüksel lahanası, lahana, karnabahar, brokoli ve alabaş gibi birçok önemli sebzeyi içeren *brassicaceae* familyasının üyeleri, güçlü fitokimyasallar, glukosinolatlar ve bunların parçalanma ürünlerini içerir (Gerendás vd. 2008).

Brassicaceae sebzelerinin neoplastik hastalıklara karşı korumadaki benzersiz etkinliği, insan diyetindeki en zengin glukosinolat kaynakları olmalarına bağlanmaktadır. Glukosinolatlar, bir tiyoglukoz birimi, bir sülfonlanmış oksim birimi ve bir değişken yan zincirden oluşan tek tip bir yapıya sahiptir. *Brassicaceae*'de yan zincir, sırasıyla alifatik, aromatik ve indol glukosinolatlar durumunda metionin, fenilalanin, tirozin veya triptofandan türetilir (Gerendás vd. 2008).

Brassicaceae sebzelerin ana aktif bileşenleri olan izotiyosiyanatlar, reaktif oksijen türleri oluşturarak veya apoptoza yol açan döngü durmasını indükleyerek tümör büyümesini baskılar (Ravikumar 2015; Yang vd. 2019; Lampe ve Peterson 2002; Abu-Qatouseh 2020). Glukosinolatların mirosinaz tarafından hidrolizi ile izotiyosiyanatlar oluşmaktadır. Mirosinaz ve substratları sağlam bir bitkide farklı bölümlerde bulunur. Bitki dokusunun sitoplazmasında glukosinolatlar bulunmaktadır. Hücre duvarının dış yüzeyinde bulunan mirosinaz enziminin glukosinolatlar ile etkileşime geçebilmesi için ancak bitki dokusunun dilimleme, kesme ve çiğneme yoluyla yırtılması veya bağırsak florasının enzimatik etkisiyle parçalanması gerekmektedir. Bu parçalanma ürünleri keskin tat ve güçlü bir koku sağladığından (yapılarında bulunan azot ve kükürt sebebiyle), glukosinolatların bitkiler için biyolojik önemi sadece dış etkilere karşı koruyucu ve hastalık savunmasıyla ilişkili olarak tartışılmıştır. Son araştırmalar, bu yıkım ürünlerinin, antikanserojenik etkisi ve birçok faydalı sağlık etkisinden sorumlu olduğunu göstermektedir. *Brassica* sebzelerinin insan diyetindeki yerinin bu nedenle artırılması tavsiye edilmektedir (Gerendás vd. 2008; Yılmaz ve Demirel 2012).

Alabaşların glukosinolat profilinde en çok glukorafanın, glukoeserin, glukoisiberin ve glukobrasisin bulunur. Alabaşta bulunan izotiyosiyanatlar sırasıyla glukoeserin, glukorafanın, glukonasturtiin ve sinigrin'in hidrolizinden kaynaklanan metiltiyobuti izotiyosiyanat, ardından sülforafan, feniletil izosiyanat ve alil izosiyanat'tır. Glukoeserin yeşil alabaşta bulunmazken mor alabaşta bulunur. Bu izotiyosiyanatlardan sülforafan en güçlü 40 antikanserojenden biri olarak kabul edilmektedir (Park vd. 2012; Gerendás vd. 2008).

Sülforafan (SFN), *brassicaceae* sebzelerinde, özellikle brokolide, bulunan bir izotiyosiyanattır. SFN'nin etki mekanizmaları arasında faz 1 enzimlerinin inhibisyonu, kanserojenleri detoksifiye etmek için faz 2 enzimlerinin indüksiyonu, hücre döngüsünü

baskılama, apoptoz indüksiyonu, histon deasetilaz inhibisyonu, MAPK yolunun modülasyonu, NF- κ B inhibisyonu ve ROS'un üretimi yer almaktadır (Anand vd. 2008). Sülforafanın HepG2 hücrelerinde, kaspaz-8 / TRAF2 aracılı sinyalleşmeyi modüle ederek kanser istilası ve metastazının baskılayıcısı olarak işlev gören DR5 ekspresyonunu ve DNA fragmentasyonunu arttırdığı, kaspaz-3'ü aktive ettiği, PARP'ı inhibe ettiği ve apoptozda yer alan bax, bcl-2 ve bcl-XL gibi önemli proteinlerin ifadelerini modüle ettiği bildirilmiştir (Fimognari ve Hrelia 2007; Oh vd. 2015). Ayrıca, sülforafanın doza-bağımlı olarak kolon ve prostat kanseri hücrelerinin ikisinde de apoptozun kilit proteinleri olan kaspazları aktive ettiği de bilinmektedir (Çelik ve Köksal 2013). Bir çalışmada sadece 24 saat süreyle sülforafanın ile tedavinin HepG2 kanser hücrelerinde LPS ile indüklenen IL-6 ve hepsidin'i baskılayabildiğini gösterilmiştir. Bu konsantrasyon, bu hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki ile ilişkili değildir. 24 saat sonra 60 μ M'da sülforafanın HepG2 hücrelerinin canlılığını yaklaşık %40'a düşürdüğünü ve IC₅₀'nin yaklaşık 32 μ M olduğunu bildirildi. Yüksek IL-6 seviyelerinin kanser ilerlemesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, sülforafanın HepG2 kanser hücrelerinde IL-6 üretimini azaltma üzerindeki etkisi, sülforafanın hepatosellüler karsinom riskini ve gelişimini azaltmadaki umut verici etkisini göstermektedir. Gelecekteki kanser tedavisi için zorluğun, hücrelerin proinflatuar sitokinler gibi yüksek düzeyde kanseri teşvik edici özelliklerinin azaltılmasını içeren genel normal konak yanıtını elde etmek için inflammatuar ağı normalleştirmek olduğu belirtilmiştir (Abu-Qatouseh 2020).

Jamuna (2017)'nın çalışmasında, alabaş bitkisinin etanol ekstraktında polifenoller, flavonoidler, terpenoidler, steroidler, glikozitler ve alkaloidler gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın devamında, lahana, karnabahar, alabaş ve turpun MCF-7, DL ve NIH-3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda, daha yüksek miktarda glukosinolat içeren *brassica* sebzelerinin daha fazla antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu yani glukosinolat miktarı ve antiproliferatif aktivite arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmada alabaş ekstraktının 48 saat IC₅₀ değerleri, MCF-7 hücre hattı için 389.5 μ g/mL, DL hücre hattı için 189.7 μ g/mL ve NIH-3T3 hücre hattı için 619.7 μ g/mL olarak belirtilmiştir (Jamuna vd. 2017). Çalışmamızda HepG2 hücrelerinde, alabaş ekstraktının 48 saatlik inkübasyon sonrasında saptanan IC₅₀ değeri 23.39 μ g/mL'dir. Bu sonuçlara göre alabaş bitkisi ekstraktının, HepG2 hücre hattı için yukarıda tartışılan diğer 3 hücre hattına oranla daha sitotoksik olduğu söylenebilir.

Apoptoz, çevreleyen dokunun genel yapısını korurken bir organizma içindeki hücreleri tek tek ortadan kaldıran programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Karsinogeneze apoptozun baskılanmasının kanser gelişimi ve ilerlemesinde oldukça önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli moleküler mekanizmalar aracılığıyla tümör hücreleri apoptozu baskılamaktadır. Tümör hücreleri, Bel-2 gibi antiapoptotik proteinlerin ekspresyonu artırırken veya Bax gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonlarını baskılayarak direnç geliştirebilmektedir (Elmore 2007).

Lahana ve alabaş bitkilerinin etanol ekstraktlarının HT-29 ve Caco-2 kolorektal kanser hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak proliferasyon ve apoptozis üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her iki bitkinin de hücreleri apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir (Zarzour 2012).

Kaspaz-3 enzimi, hücrenin ölüm emrini veren efektör kaspazlardandır. Kaspaz-3 enzimindeki artış hücrede apoptozu tetiklediği için, farklı ajanların hücrelerdeki apoptotik aktiviteyi tetikleyip tetiklemediğini araştırarak deneylerde önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Parrish vd. 2013; Heemst vd. 2007). Çalışmamızda, alabaş ekstraktı 48 saatlik inkübasyon sonrasında HepG2 hücrelerinde $\frac{1}{2}$ IC₅₀ dışında denenilen diğer dozlarda kaspaz-3 miktarında istatistiksel anlamda bir artışa neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu durum mor alabaş bitkisi ekstraktının hücreleri apoptoza yönlendirdiğini işaret etmektedir.

Jung vd. (2014)'nin çalışmasında hem mor hem de yeşil alabaş çeşitlerinin, antioksidan etkili olan fenolik içerikleri sebebiyle (özellikle mor alabaş), doza bağlı antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Fenolikler ve flavonoidler mükemmel antiinflamatuvar ajanlar olarak işlev görmektedir. Bu nedenle, güçlü antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler, diyabeti ve komplikasyonlarını önleme potansiyeli ile antiinflamatuvar aktivite sergileyebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, mor alabaş ekstraktı, RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde iNOS ve COX-2 proteininin üretimini inhibe etmiştir ve bu durumda ekstraktı bir antiinflamatuvar ajan adayı olarak desteklemektedir. iNOS ve COX-2 proteinlerinin artışı, inflamatuvar yanıtla ilişkilidir (Jung vd. 2014). iNOS, karsinomda anjiyogenez, malign transformasyon ve metastaz gibi birçok etki göstermektedir. COX-2 ise indüklenebilir bir enzimdir. COX-2 proteininin anjiyogenezi, tümörlerin doku istilasını ve apoptoza direnci desteklediği düşünülmektedir. İnflamatuvar hastalıklar karsinogenez ile ilişkilidir (Liu vd. 2019; Liu vd. 2015). Çalışmamızda ekstraktın, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HepG2 hücrelerinde ne VEGF miktarını ne de MMP-9 miktarını istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştirmediği saptanmıştır.

6. SONUÇLAR

Tüm bu verilerle birlikte değerlendirildiğinde çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, mor alabaş yumrusu etanol ekstraktının 200 µg/mL-1.875 µg/mL aralığında denenilen dozların hiçbirinde 293T hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmedi. Ancak, 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, 200, 150, 100, 80, 60 ve 30 µg/mL olan dozların 293T hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (*, $p<0.05$ ve **, $p<0.01$). Buna göre 24 ve 48 saat sonunda sitotoksik etki gözlenmeyip 72 saatte gözlenmesi hücrelerin alabaş ekstraktını metabolize etmesi sonucu ortaya çıkan metabolitlerin bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

2. 24 ,48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, mor alabaş yumrusu etanol ekstraktının 200, 150, 100, 80, 60, ve 30 µg/mL dozlarının HepG2 hücrelerinin canlılığını istatistiksel anlamda önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir (*, $p<0.05$ ve **, $p<0.01$).

3. Çalışmada kontrol hücre grubu olarak kullanılan 293T için 24 ve 48 saat IC_{50} değerleri saptanmamıştır. Fakat 72 saat IC_{50} değeri 25.73 µg/mL olarak saptanmıştır. HepG2 için 24 saat IC_{50} değeri 25.97 µg/mL ,48 saat IC_{50} değeri 23.39 µg/mL ve 72 saat IC_{50} değeri 14.52 µg/mL olarak saptanmıştır.

4. HepG2 için elde edilen en düşük IC_{50} değeri (14.52 µg/mL) 72 saat olsa da seçici sitotoksite arandığı için 293T de sitotoksik etki göstermeyen 48 saat IC_{50} (23.39 µg/mL) değerinin üzerinden deneylerin yapılmasına karar verilmiştir.

5. $\frac{1}{2} IC_{50}$, IC_{50} ve $2x IC_{50}$ (11,695 µg/mL, 23,39 µg/mL ve 46,78 µg/mL) dozlarında yapılan Tripan mavisi testi sonuçları WST-8 sonuçlarını desteklemektedir. 293T hücrelerinde canlılık üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etki gözlenmezken HepG2 hücrelerinde üç dozda da canlılıkta istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiştir.

6. Alabaş ekstraktının apoptotik bir etkisinin olup olmadığı kaspaz-3 enziminin miktarına bakılarak tayin edilmiştir. Deney sonuçlarına göre HepG2 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarı $\frac{1}{2} IC_{50}$ dozunda istatistiksel anlamda önemli bir değişim göstermemiştir. Fakat HepG2 hücrelerindeki kaspaz-3 miktarları IC_{50} ve $2x IC_{50}$ dozlarında istatistiksel anlamda önemli bir artış göstermiştir. Buna göre mor alabaş yumrusu etanol ekstraktının IC_{50} ve $2x IC_{50}$ dozları HepG2 hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterebileceği düşünülmektedir.

8. Alabaş ekstraktının antimetastatik özelliği olup olmadığı hücre içi ve hücre dışı MMP-9 miktarlarına bakılarak tayin edilmiştir. Deney sonuçlarına göre HepG2 hücrelerindeki hem hücre içi hem de hücreden salınan MMP-9 miktarı IC_{50} ve $2x IC_{50}$ dozlarında hücreler üzerinde istatistiksel anlamda önemli bir değişim göstermemiştir. Buna göre mor alabaş yumrusu etanol ekstraktının IC_{50} ve $2x IC_{50}$ dozlarının HepG2 hücreleri üzerinde antimetastatik etkisi bulunmamaktadır.

9. Alabaş ekstraktının antianjiyogenik özelliği olup olmadığı hücre içi ve hücre dışı VEGF miktarlarına bakılarak tayin edilmiştir. Deney sonuçlarına göre VEGF miktarı her iki ölçümde de $\frac{1}{2}$ IC₅₀, IC₅₀ ve 2x IC₅₀ dozlarda istatistiksel anlamda önemli bir değişim göstermemiştir.



7. KAYNAKLAR

- Abou-Ghali, M., and Stiban, J. 2015. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi journal of biological sciences*, 22(6), 760-772.
- Abu-Qatouseh, L. 2020. Sulforaphane from broccoli attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion in human HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 75, 104210.
- Akagün, G. 2009. Alabaş (Brassica oleracea var. Gongylodes) bitkisinin antioksidan aktivitesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 79 s.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung B., and Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116.
- Anonim 1: <https://en.wikipedia.org/wiki/Kohlrabi> [Son erişim tarihi: 02.06.2021].
- Anonim 2: <https://www.bilgiustam.com/cehennem-topuzu-kohlrabinedir/> [Son erişim tarihi: 02.06.2021].
- Arın, L. 2005. Alabaş (Brassica oleraceae var. gongylodes L.) Yetiştiriciliği. *Alatarım*, 4(2), 13-17.
- Asghar, U., and Meyer, T. 2012. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer?. *Journal of hepatology*, 56(3), 686-695.
- Barrios, J., Cordero, C. P., Aristizabal, F., Heredia, F. J., Morales, A. L., and Osorio, C. 2010. Chemical analysis and screening as anticancer agent of anthocyanin-rich extract from uva caimaron (Pourouma cecropiifolia Mart.) fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4), 2100-2110.
- Bergers, G., and Benjamin, L. E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401-410.
- Boice, A., and Bouchier-Hayes, L. 2020. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(6), 118688.
- Cao, Y. 2010. Angiogenesis: What can it offer for future medicine?. *Experimental cell research*, 316(8), 1304-1308.
- Clarke, J. D., Dashwood, R. H., and Ho, E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer letters*, 269(2), 291-304.
- Coşkun, G., ve Özgür, H. 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Çelik, F., ve Köksal, G. 2013. Kanser ve Sülforafan. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 41(3), 266-273.
- David, A. R., and Zimmerman, M. R. 2010. Cancer: an old disease, a new disease or something in between?. *Nature Reviews Cancer*, 10(10), 728-733.
- Efferth T. 2019. Editorial: Chemoprevention of cancer by natural products. *Cancer Letters*. Volume 459, Pages 13-14.

- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Fimognari, C., and Hrelia, P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 635(2-3), 90-104.
- Folkman, J. 1984. Angiogenesis. *Biology of endothelial cells*, 412-428.
- Foster, I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.
- Gerendás, J., Breuning, S., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., and Mühling, K. H. 2008. Isothiocyanate concentration in kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) plants as influenced by sulfur and nitrogen supply. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8334-8342.
- Güleş, Ö., ve Ülker, E. 2008. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.
- Hajdu, S. I. 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer*, 117(5), 1097-1102.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hillen, F., and Griffioen, A. W. 2007. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3), 489-502.
- Imir, N. G., Aydemir, E., and Şimşek, E. 2018. Mechanism of the anti-angiogenic effect of Avemar on tumor cells. *Oncology letters*, 15(2), 2673-2678.
- Jain, R. K. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58-62.
- Jamuna, K. S., Suma, M. S., Ramesh, C. K., Mahmood, R., and Nanjundaswamy, L. 2017. Studies on in vitro antiproliferative activities in cruciferous vegetables. *Journal of Applied Horticulture*, 19(3).
- Jung, H. A., Karki, S., Ehom, N. Y., Yoon, M. H., Kim, E. J., and Choi, J. S. 2014. Anti-diabetic and anti-inflammatory effects of green and red kohlrabi cultivars (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Preventive nutrition and food science*, 19(4), 281.
- Keum, Y. S., Jeong, W. S., and Kong, A. T. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1-2), 191-202.
- Kurtar, E. S., Özbakır, M., ve Balkaya, A. 2010. Samsun ekolojik koşullarında ilkbahar dönemi alabaş (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) yetiştiriciliğinde farklı uygulamaların etkileri. *Bahçe*, 39(1), 9-20.
- Kwak, Y., Lee, J., and Ju, J. 2016. Anti-cancer activities of *Brassica juncea* leaves in vitro. *EXCLI journal*, 15, 699.
- Lampe, J. W., and Peterson, S. 2002. Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *The Journal of nutrition*, 132(10), 2991-2994.

- Liu, B., Qu, L., and Yan, S. 2015. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer cell international*, 15(1), 1-6.
- Liu, S., Jiang, J., Huang, L., Jiang, Y., Yu, N., Liu, X., Lv Y., Li H., Zou L., Peng C., Yu X., and Jiang, B. 2019. iNOS is associated with tumorigenicity as an independent prognosticator in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer management and research*, 11, 8005.
- Longo, V. D., and Fontana, L. 2010. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*, 31(2), 89-98.
- Majolo, F., Delwing, L. K. D. O. B., Marmitt, D. J., Bustamante-Filho, I. C., and Goetter, M. I. 2019. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters*, 31, 196-207.
- Mise, M., Arai, S., and Higashitani, H. 1996. Clinical significance of vascular endothelial growth factor in normal liver and hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology*, 23, 455-464.
- Oh, Y. T., Yue, P., Wang, D., Tong, J. S., Chen, Z. G., Khuri, F. R., and Sun, S. Y. 2015. Suppression of death receptor 5 enhances cancer cell invasion and metastasis through activation of caspase-8/TRAF2-mediated signaling. *Oncotarget*, 6(38), 41324.
- Olsson, M., and Zhivotovsky, B. 2011. Caspases and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 18(9), 1441-1449.
- Pandey, M. K., Gupta, S. C., Nabavizadeh, A., and Aggarwal, B. B. 2017, October. Regulation of cell signaling pathways by dietary agents for cancer prevention and treatment. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 46, pp. 158-181). Academic Press.
- Pandey, S., N Shaw, P., and K Hewavitharana, A. 2015. Review of procedures used for the extraction of anti-cancer compounds from tropical plants. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 15(3), 314-326.
- Parikh, S., and Hyman, D. 2007. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *The American journal of medicine*, 120(3), 194-202.
- Park, C. H., Yeo, H. J., Kim, N. S., Eun, P. Y., Kim, S. J., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Park, S. Y., Kim, J. K., and Park, S. U. 2017. Metabolic profiling of pale green and purple kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Applied Biological Chemistry*, 60(3), 249-257.
- Park, E. J., and Pezzuto, J. M. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21(3-4), 231-255.
- Park, W. T., Kim, J. K., Park, S., Lee, S. W., Li, X., Kim, Y. B., Uddin M. R., Park, N. L., Kim, S. J., and Park, S. U. 2012. Metabolic profiling of glucosinolates, anthocyanins, carotenoids, and other secondary metabolites in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(33), 8111-8116.
- Parrish, A. B., Freel, C. D., and Kornbluth, S. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6),

a008672.

- Pasko, P., Sulkowska-Ziaja, K., Muszynska, B., and Zagrodzki, P. 2014. Serotonin, melatonin, and certain indole derivatives profiles in rutabaga and kohlrabi seeds, sprouts, bulbs, and roots. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 740-745
- Podsędek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
- Ravikumar, C. 2015. Therapeutic potential of Brassica oleracea (broccoli)—a review. *Int J Drug Dev & Res*, 7(2), 009-010.
- Reddy, L., Odhav, B., and Bhoola, K. D. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & therapeutics*, 99(1), 1-13.
- Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Sansonno, D., and Dammacco, F. 2006. Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer treatment reviews*, 32(6), 437-444.
- Roskoski Jr, R. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical reviews in oncology/hematology*, 62(3), 179-213.
- Ruiz-Torres, V., Encinar, J., Herranz-López, M., Pérez-Sánchez, A., Galiano, V., Barrajón-Catalán, E., and Micol, V. 2017. An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. *Molecules*, 22(7), 1037.
- Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S., and Baradaran, B. 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 1), 421.
- Sudhakar, A. 2009. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tewari, D., Rawat, P., and Singh, P. K. 2019. Adverse drug reactions of anticancer drugs derived from natural sources. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 522-535.
- Tian, T., Nan, K. J., Wang, S. H., Liang, X., Lu, C. X., Guo, H., Wang, W. J., and Ruan, Z. P. 2010. PTEN regulates angiogenesis and VEGF expression through phosphatase-dependent and-independent mechanisms in HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 31(7), 1211-1219.
- Van Heemst, D., Den Reijer, P. M., and Westendorp, R. G. J. 2007. Ageing or cancer: A review: On the role of caretakers and gatekeepers. *European Journal of Cancer*, 43(15), 2144-2152.
- Warne, L. G. G. 1942. Kohlrabi as a source of vitamin C. *British medical journal*, 1(4237), 387.
- Wong, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 1-14.

- Xu, J., and Mao, W. 2016. Overview of research and development for anticancer drugs. *Journal of Cancer Therapy*, 7(10), 762-772.
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A., and Roberts, L. R. 2019. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 589-604.
- Yıldırım, E., Karaçam, V., Ekinci, M., ve Dursun, A. 2017. Erzurum ekolojik koşullarında alabaş (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) yetiştiriciliğinde uygun çeşit ve dikim zamanlarının belirlenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6, 9-16.
- Yılmaz, D., ve Demirel, Z. B. 2012. Glukosinolatlar ve Sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(2), 170-177.
- Yoshimoto, M., Kurihara, H., and Fujii, H. 2015. Theragnostic imaging using radiolabeled antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Zarzour, V. M. 2012. A comparative study of the antiproliferative effect of kohlrabi and green cabbage on colorectal cancer cell lines. Doctoral dissertation, Lebanese American University, Beirut, 78s.

ÖZGEÇMİŞ

Hamide İlay USMAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2018	Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Usman H. İ., ve Aydemir E. (2020). Sülfurafan ve kanser ilişkisi. International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem 2020), ss. 259, 16-18 Aralık 2020, Ankara. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)