

T.C.
NUH NACİ YAZGAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

BROKOLİ (BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA)
EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA APOPTOZA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Gözde ÇOBANOĞLU

Danışman
Doç.Dr. Mustafa NİSARİ

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2022

KAYSERİ

T.C.
NUH NACİ YAZGAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

BROKOLİ (BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA)
EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA APOPTOZA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Gözde ÇOBANOĞLU

Danışman
Doç.Dr. Mustafa NİSARİ

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2022
KAYSERİ

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu Doç.Dr. Mustafa NİSARİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Gözde ÇOBANOĞLU

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Mustafa NİSARİ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Mustafa NİSARİ danışmanlığında **Gözde ÇOBANOĞLU** tarafından hazırlanan “**Brokoli (Brassica oleracea var. italica) Ekstresinin MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoza Etkisinin Araştırılması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2022

JÜRİ

Danışman: Doç.Dr. Mustafa NİSARİ

Üye: Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Eda BAŞMISIRLI

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2022

Prof. Dr. Hülya UÇAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazmamda yardımcı olan, desteğini esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Doç.Dr. Mustafa NİSARİ'ye,

Bilimsel destek sağlayan Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Neriman İNANÇ'a, Prof.Dr. Mualla AYKUT'a ve Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim üyelerimize,

Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Mehtap NİSARİ'ye ve asistanlarından Sayın Arş. Gör. Sümeyye UÇAR'a,

Projeyi destekleyen Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve deneysel çalışmaları yürütmemizde destek sağlayan Erciyes Üniversitesi GENKÖK Araştırma Merkezi hocalarına,

Her zaman desteğini hissettiren AİLEME ve eşim Dr. Hayrettin ÇOBANOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Bu çalışma; Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-001 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Kayseri, Şubat 2022
Gözde ÇOBANOĞLU

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR ve SEMBOLLER	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Kanser	3
2.1.1. Kanser İnsidans ve Mortalite Tahminleri.....	4
2.2. Meme Kanseri	5
2.2.1. Meme Kanseri Oluşumunda Risk Faktörleri	6
2.3. Apoptoz	7
2.4. Kanserın Obezite ve Beslenme ile İlişkisi	7
2.5. Brokoli	8
2.6. Brokolide Bulunan Biyoaktif Bileşenler.....	10
2.6.1. Glukozinolatlar.....	12
2.6.2. Besinlerin Hazırlık Aşamasının Glukosinolat İçeriğine Etkisi	15
2.6.3. Sulforafan.....	15
2.6.4. Sulforafanın Metabolizması ve Biyoyararlılığı	17
2.6.5. Sülforafanın Karsinogenez Üzerindeki Etki Mekanizmaları	17
2.6.6. Sulforafan ve Apoptoz	17
2.6.7. Fenolik Bileşikler	19
2.6.8. Askorbik Asit	20
2.7. Hücre Kültürü.....	21
2.7.1 Hücre Hattı Çeşitleri	22
2.7.2. MDA-MB-231	23

2.8. Hücre Döngüsü.....	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	25
3.1.1. Kullanılan Demirbaş Malzemeler	25
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	25
3.2. Ekstre Elde Edilmesi ve Hazırlanması.....	26
3.2.1. Olgun Brokoliden Ekstre Elde Edilmesi	26
3.3. Besiyerinin Hazırlanması	28
3.4. Hücre Sayımı.....	29
3.5. Hücrelerin Pasajlanması.....	30
3.6. Hücrelerin Dondurulması.....	32
3.7. Hücre Hattı Üzerinde Dozun Belirlenmesi	32
3.8. Deneysel Grupların Oluşturulması.....	32
3.8.1. Annexin V Testi İçin:.....	32
3.8.2. Cell-Cyle Testi İçin:.....	33
3.9. Annexin V Testi	34
3.10. Hücre Döngüsü Testi.....	35
3.11. İstatistiksel Analizler.....	37
4.BULGULAR.....	39
4.1. Annexin V Deneyi ve Sonuçları	39
4.1.1 Canlı Hücre Sayısı	40
4.1.2 Erken Apoptotik Hücre	41
4.1.3. Geç Apoptotik Hücre	41
4.1.4. Toplam Apoptotik Hücre	42
4.2. Cell Cycle Deneyi Sonuçları	43
4.2.1. G ₀ /G ₁ Evresi Sonuçları.....	45
4.2.2. S Evresi Sonuçları.....	45
4.2.3. G ₂ /M Evresi Sonuçları	46
5.TARTIŞMA.....	47
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	52

7.KAYNAKLAR	54
8.EKLER	66
8.1. Orjinallik Raporu	66



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1. Meme kanserinin gruplarına göre sınıflandırılması.....	6
Tablo 2. 2. 100 g çiğ brokoli bitkisinin içerdiği besin değerleri.	10
Tablo 2. 3. Fitokimyasalların kanser önlemedeki potansiyel etki mekanizmaları	11
Tablo 3. 1. Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ve miktarları.....	28
Tablo 3. 2. Annexin V Testi için oluşturulan deney grupları.....	33
Tablo 3. 3. Cell-Cycle Testi için oluşturulan deney grupları.....	33
Tablo 4. 1. Annexin V& Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda canlı hücre yüzdeleri.	40
Tablo 4. 2. Annexin V & Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda erken apoptotik hücre yüzdeleri.....	41
Tablo 4. 3. Annexin V & Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda geç apoptotik hücre yüzdeleri.....	42
Tablo 4. 4. Annexin V & Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda toplam apoptotik hücre yüzdeleri.....	42
Tablo 4.5. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak G ₀ /G ₁ evresindeki değişim oranları	45
Tablo 4. 6. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak S evresindeki değişim oranları	46
Tablo 4. 7. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak G ₂ /M evresindeki değişim oranları	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Brokoli bitkisi.....	9
Şekil 2. 2. Glukosinolatların genel kimyasal yapısı	12
Şekil 2. 3. İnsan beslenmesinde en çok çalışılan GLS’ler ve hidroliz ürünleri.	13
Şekil 2. 4. Glukofaninin mirosinaz enzimi ile hidrolizi	14
Şekil 2. 5. (A) Brokoli tohumları. (B) Beş günlük brokoli filizi.	16
Şekil 2. 6. Sülforafının Etki Mekanizması	18
Şekil 2. 7. Brokolide bulunan başlıca fenolik bileşikler.	19
Şekil 2. 8. Askorbik asidin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 3. 1. Brokoli ekstresinin elde edilmesi	27
Şekil 3. 2. Liyofilizatörde dondurarak kurutma işlemi.....	28
Şekil 3. 3. 2 x 50 ml hazırlanmış besiyerleri	29
Şekil 3. 4. Thoma lamının Trypan Blue ile boyanması	29
Şekil 3. 5. Hücrelerin ekim sırasında 40’lık objektifte mikroskoptaki görüntüsü.....	30
Şekil 3. 6. Yüzeye tutunan hücrelerin 40’lık objektifte mikroskop görüntüsü.....	30
Şekil 3. 7. Besiyerinin ortamdaki çekilmesi	31
Şekil 3. 8. Hücre ve etken maddelerin 24’lü well plate ekilmesi.	34
Şekil 3. 9. (a) Muse Analyzer Cihazı, (b) Annexin V ölü hücre kiti.....	35
Şekil 3. 10. Ependorflara Muse Hücre Döngüsü Kiti eklenmek üzere hazırlanması	36
Şekil 3. 11. Muse Cell Analyzer cihazında sonuçların okunması.....	37
Şekil 4. 1. 24 saatlik apoptoz oranlarının gruplara göre Muse Cell Analyzer cihazında veri grafikleri.	39
Şekil 4. 2. 48 saatlik apoptoz oranlarının gruplara göre Muse Cell Analyzer cihazında veri grafikleri.	40
Şekil 4. 3. 24 saatlik hücre döngüsü evrelerinin gruplara göre yüzde dağılım oranlarının Muse Cell Analyzer cihazında okutulan veri grafikleri.....	43
Şekil 4. 4. 48 saatlik hücre döngüsü evrelerinin gruplara göre yüzde dağılım oranlarının Muse Cell Analyzer cihazında okutulan veri grafikleri.....	44

KISALTMALAR ve SEMBOLLER

μL	Mikrolitre
μM	Mikrometre
BRCA	Meme kanseri duyarlılık
CO₂	Karbondioksit
Cys	Sistein
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ER	Östrojen hormon reseptörü
ESP	Epithiospecifier Protein
FBS	Fetal Sığır Serum
GENKÖK	Genom ve Kök Hücre Merkezi
GRA	Glukofarin
GLS	Glukozinolat
HAT	Histon asetil transferaz
HDAC	Histon deasetilaz
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ITC	İzotiyosiyanat
NAC	N-asetilsistein
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-Kb	Nükleer faktör kappa B
NQO1	NADH kinon redüktaz
Nrf2	Nükleer faktör eritroid ilişkili faktör-2
O₂	Oksijen molekülü
<i>p</i>	anlamlılık değeri
PBS	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate buffer saline)

pH	potansiyel Hidrojen
PR	Progesteron hormon reseptörü
PS	Fosfatidilserin
RDA	Recommended Dietary Allowances
RE	Retinol eşdeğeri
RNA	Ribonükleik asit
rpm	dakikadaki devir sayısı
SFN	Sülforafan
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanseri Hücresi
NCI	Uluslararası Kanser Enstitüsü
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TrxR	Tiyoredoksin redüktaz
ve ark.	ve arkadaşları
WCRF	Dünya Kanser Araştırma Fonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Çobanoğlu, G., Brokoli (Brassica Oleracea Var. Italica) Ekstresinin MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoza Etkisinin Araştırılması, Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2022.

Günümüzde kanser araştırmalarının hız kazanması ve kanser ilaçlarının geliştirilmesinde hücre kültürleri büyük önem kazanmıştır. Kanser tüm dünyada morbidite ve mortaliteyi etkileyen dinamik ve çok yönlü bir hastalıktır. Besinlerde bulunan biyoaktif bileşenlerin kanserden ve kronik hastalıklardan koruyucu etkileri epidemiyolojik verilerle desteklenmiştir. Brokoli, karnabahar, beyaz ve karalahana, Brüksel lahanası gibi Brassicaceae olarak da bilinen turpgiller grubundaki sebzelerin tüketimi, genel sebze tüketimi ile kıyaslandığında kansere karşı çok daha güçlü bir koruyuculuk sağlamaktadır. Turpgiller grubunda kanser kemoprevensiyonu ile ilgili olarak en çok çalışılan biyoaktif bileşenlerden biri glukosinolatlardır. En yaygın olarak incelenen izosiyonat (ITC), karsinogenez sürecini inhibe etme, tersine çevirme ve kanser hücrelerini apoptoz yoluyla yok etme potansiyelini gösteren sülforafandır (SFN). Çalışmalar, SFN'nin tümör gelişimine karşı olarak hücre döngüsünü inhibe ettiğini veya apoptozu uyardığını göstermiştir. Brokolinin yapısında en fazla bulunan glukozinolat (GLS) olan glukofarin (GRA), mirosinaz enzim aktivitesiyle SFN'ye parçalanmaktadır. GRA özellikle brokoli filizlerinin yapısındaki toplam GLS'lerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bu çalışmada brokoli ekstresinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında iki farklı dozun (125 µL/ml ve 250 µL/ml) iki farklı zaman süresinde (24 ve 48 saat) apoptotik etkisi araştırıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Muse Cell Analyzer cihazı ile gruplara Annexin V ve hücre döngüsü analizleri yapıldı. Brokoli ekstresi içeren gruplarda kontrole kıyasla her iki doz için canlı hücre yüzdesinde azalma, erken ve toplam apoptoz yüzdesinde anlamlı bir şekilde artış görüldü (p<0,05). Geç apoptoz yüzdesi için anlamlı sonuç bulunmadı. S evresinde hücre sayısı tüm gruplarda artmıştı (p<0,05). Brokoli ekstresi içeren grupların S kontrol noktasına geçişte hücre döngüsünü yavaşlattığı görüldü (p<0,05). Bu sonuçların apoptozla ilgili yapılan çalışmaların sonuçlarına benzerlik gösterdiği bulundu. Yapılan tez çalışmasının brokolinin düzenli ve doğru tüketiminin yaygınlaşmasının kanser oluşumunu yavaşlatmada etkili olacağı ve bu çalışmanın kanser araştırmalarına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Brokoli, MDA-MB-231, Apoptoz, SFN

ABSTRACT

Çobanoğlu, G., Investigation of the Effect of Broccoli (*Brassica Oleracea* Var. *Italica*) Extract on Apoptosis in MDA-MB-231 Cell Line, Nuh Naci Yazgan University Institute of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Master's Thesis, Kayseri, 2022.

Today, cell cultures have gained great importance in the acceleration of cancer research and the development of cancer drugs. Cancer is a dynamic and multifaceted disease that affects morbidity and mortality all over the world. The protective effects of bioactive components in foods from cancer and chronic diseases have been supported by epidemiological data. Consumption of cruciferous vegetables, also known as Brassicaceae, such as broccoli, cauliflower, white and black cabbage, Brussels sprouts, provides a much stronger protection against cancer when compared to general vegetable consumption. One of the most studied bioactive compounds regarding cancer chemoprevention in the cruciferous group is glucosinolates. The most widely studied isocyanate is sulforaphane (SFN), which has demonstrated its potential to inhibit and reverse the process of carcinogenesis and destroy cancer cells via apoptosis. Studies have shown that SFN inhibits cell cycle or induces apoptosis against tumor growth. Glucofarin (GRA), which is the most abundant glucosinolate (GLS) in the structure of broccoli, is broken down into SFN by myrosinase enzyme activity. GRA constitutes approximately 50% of the total GLS, especially in the structure of broccoli sprouts. In this study, the apoptotic effect of broccoli extract on MDA-MB-231 breast cancer cell line at two different doses (125 µL/ml and 250 µL/ml) in two different time periods (24 and 48 h) was investigated. Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂. Annexin V and cell cycle analyzes were performed with the Muse Cell Analyzer device. In the groups containing broccoli extract, a decrease in the percentage of viable cells and a significant increase in the percentage of early and total apoptosis were observed for both doses compared to the control ($p < 0.05$). No significant results were found for the percentage of late apoptosis. In the S stage, the number of cells increased in all groups ($p < 0.05$). It was observed that the groups containing broccoli extract slowed down the cell cycle in the transition to the S checkpoint ($p < 0.05$). These results were found to be similar to the results of studies on apoptosis. It is thought that the widespread use of broccoli regularly and correctly in this thesis study will be effective in slowing down the formation of cancer and this study will contribute to cancer research.

Keywords: Broccoli, MDA-MB-231, apoptosis, SFN

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser hücrelerin kontrolsüz çoğalarak ve invaziv nitelik kazanarak metastaz yapmasıyla karakterize ölüm oranı yüksek hastalıklardan biridir. Dünya genelinde nüfusun hızla artması ve yaş ortalamasının yükselmesi ile birlikte birçok ülkede en önemli ölüm nedeni ve halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmaktadır. Kanser, genlerdeki mutasyonlar ve patolojik hücre içi sinyal iletimi sonucu farklı organlarda kontrolsüz çoğalan hücrelerin oluşmasıyla karakterize bir hastalıktır (Bray, Laversanne, Weiderpass ve Soerjomataram, 2021). Türkiye'de ve dünyada kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü meme kanseridir (V. Özmen, T. Özmen & Doğu, 2019). Meme kanserinin görülme sıklığı ve buna bağlı ölüm oranları gelişmekte olan ülkelerde giderek artmaktadır (Azamjah, Soltan-Zadeh, ve Zayeri, 2019)

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan tedavi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Antikanser ilaçların çoğu kemoterapide kullanılmakta ve sitotoksik özellikleriyle kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlemektedir. Aynı zamanda bu ilaçlar zararlı özelliklerinden dolayı sağlıklı hücreye ve dokuya da zarar vermektedir. İlaçların yan etkilerini azaltmak ve etkinliğini artırmak için daha özellikli inhibitör bileşikler geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Jiang ve ark., 2018).

Kanser kemoprevensiyonu, hastalığın klinik olarak oluşmasından önce diyet veya farmakolojik ajanların kullanılması ve bu sayede tümör gelişimini engellemek, bloke etmek ve tersine çevrilmesi olarak ifade edilmektedir. Epidemiyolojik ve patolojik çalışmalardan elde edilen bulgular kanserlerin önlenebileceğini veya ilerlemesinin durdurulabileceğini göstermektedir (Jiang ve ark., 2018). Tarih boyunca kanser tedavisinde diyetle alınan bitkisel gıdalar kullanılmış, aynı zamanda kanserin önlenmesinde de faydalı olabileceği düşünülmüştür. Bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif fitokimyasal bileşenlerin varlığı, bitkisel tedavilerin farmakolojik ve fizyolojik etkilerini desteklemektedir. Çok sayıda epidemiyolojik araştırma, in vivo ve in vitro çalışmalar, aktif fitokimyasalların kanseri önleyici ya da riskini azaltıcı potansiyeli olduğunu belirlemiştir (Gullett ve ark., 2010). Özellikle diyetle alınan sebze ve meyveler, düşük toksisiteye sahip oldukları için oldukça ilgi görmekle birlikte kemopreventif bileşiklerin zengin kaynakları olarak kabul edilmiştir. Meyve ve sebzelerden zengin bir

diyetin akciğer, yemek borusu, gırtlak, pankreas, kolorektal, mide ve prostat kanserlerinin yanı sıra meme kanseri geliştirme riskini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Cheung ve Kong, 2010).

Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*, Brassicaceae) iyi bir izosiyanat kaynağıdır. Aynı zamanda vitaminler (C, K, β -karoten) diyet lifi, polifenoller ve yağ asitleri bakımından da zengindir. Sağlık açısından önemli etkileri vardır. Brokoli pazarlanabilir filizleri, çiçekleri, unları, lifleri, pulları, tozu, cipsleri vb. hipertansiyon, ateroskleroz veya kanser (akciğer, meme, prostat, pankreas) gibi bulaşıcı olmayan hastalıklardaki önleyici rolleri nedeniyle günümüzde büyük ilgi görmektedir (Akhlaghi, Bandy, 2010; Moon, Kim, Ahn, Shibamoto, 2010). *Brassica* sebzelerin tüketimi ayrıca mide, kardiyak ve özofagus adenokarsinomları, kolon ve kolorektal kanser risklerini azaltabilir (Steevens, Schouten, Goldbohm ve Brandt, 2011).

Brassicaceae familyası, filiz ve mikro yeşillik üretimi için büyük ilgi görmüştür (Baenas, Gómez-Jodar, Moreno, García-Viguera ve Periago, 2017). Brokoli fideleri olgun brokoli çiçeklerine göre çok daha yüksek konsantrasyonda nitrojen-kükürt türevleri (glukozinolatlar ve izotiyosiyanatlar), polifenoller (klorojenik ve sinapik asit türevleri ve flavonoidler), mineraller (selenyum, potasyum ve manganez) ve vitaminler (A, C, K ve B6) dahil olmak üzere sağlığı geliştirici fitokimyasalların mükemmel bir kaynağıdır (Le, Chiu ve Hsieh, 2020). Çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmalar, brokoli filizlerinin ve mikro yeşilliklerin kimyasal bileşimini ve antioksidan, antikanserojenik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antidiyabetik aktiviteler içeren çoklu biyolojik kapasitelerini göstermiştir (Bahadoran, 2012; Subedi, Cho, Park, Choi ve Kim, 2019).

Canlıların, bilimsel çalışmalarda kullanımının mümkün olduğu kadar azaltılması, deneysel çalışmaların birçok alanında hücre kültürlerinin geliştirilmesini ve kullanılmasını sağlamıştır. Günümüzde özellikle kanser araştırmalarının hız kazanması, antikanser ilaçlarının geliştirilmesi ve etkilerinin saptanmasında hücre kültürü çalışmaları önem kazanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar, brokolinin, kanserli hücrelerde apoptozisin uyarılması ya da hücre döngüsünün durdurulması sonucunda kanserin ilerlemesini baskıladığına dair olumlu sonuçlar göstermiştir. Çalışmanın amacı brokolinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında apoptotik etkisini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalarak, invaziv nitelik kazanmasıyla ve metastaz yapmasıyla karakterize olan ölüm oranı yüksek hastalıklardan biridir. Kanser, çevresel olarak karşılaşılan kimyasal, fiziksel veya biyolojik etkenlere maruz kalınması nedeniyle ya da hücrede kendiliğinden ortaya çıkmaktadır (Van Zanden ve ark., 2005). Tüm kanser hücrelerinde anormal büyüme ve kontrolsüz bölünme özelliğinin yanında, çoğalan kanser hücrelerinin kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla, primer lokasyonlarından vücudun diğer bölümlerine yayılma ve metastaz özelliği de bulunmaktadır (Topal, Öter ve Korkmaz, 2009). Normal hücreler; hormonlar, enzimler ve diğer uyaranlar etkisinde, zamanında ve uygun bir şekilde ifade edilen genler tarafından denetlenerek büyür ve bölünür. Fakat kanser hücrelerinde bu genler ya uygun olmayan şekillerde ifade edilir ya da mutasyona uğrar (Kutluk, 2013). Vücudun farklı bölgelerine metastaz yapan bu hücreler hızla yayılarak sağlıklı organlara da zarar verebilirler. Metastaz yapan bu hücreler çoğalarak karsinom tümör oluşturur ve bu şekilde büyümeye devam eder (Croce, 2008). Malign tümörler doğrudan yayılma, kan dolaşım sistemi ve lenfatik sistem yoluyla metastaz yetenekleri nedeniyle kötü bir prognoza sahiptir (Topuz, Aydiner ve Karadag, 2000; Croce, 2008). Kendi kendine uyarılma ve büyüme hormonunu sentezleme yoluyla tüm hücrelerde çoğalabilmektedir. Kontak inhibasyon belirli bir seviyeye ulaşan normal hücrelerin çoğalmasını azaltan bir mekanizmadır ve bu mekanizma kanserli hücrelerde bozulduğu için hücreler yan yana ve çok katmanlı çoğalabilir (Topuz ve ark., 2000).

Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri de kemoterapidir. Kullanılan antikanser ilaçlar genelde sitotoksik özellikleri nedeniyle kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlemektedir. Ancak kullanılan ilaçlar yüksek toksik özelliklerinden dolayı sağlıklı olan dokuya ya da hücreye hasar verdiği için araştırmacılar bu yan etkilerin azalması ve hedef hücredeki etkinliğin artması için spesifik inhibitör bileşikler geliştirmeye yönelik çalışmalar yürütmektedir.

Kanserin gelişimini engellemek, geriye çevirmek veya önlemek için doğal veya sentetik bileşiklerin kullanılması kemoprevensiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu kimyasallar doğal yollardan diyet ile alınabileceği gibi sentetik olarak elde edilip ilaç olarak da alınmaktadır (Yalçın, Yılmaz, Altundağ ve Koçtürk, 2017). İlk olarak Lee Wattenberg tarafından önerilen klasik sınıflandırmaya göre, kemopreventif ajanlar; bloke edici ve baskılayıcı ajanlar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Surh, 2003). Bloke edici ajanlar, karsinogenlerin hedef bölgelere ulaşmasını ve metabolik aktivasyondan geçmesini önlemektedir. Daha sonra deoksiribo nükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein gibi kritik moleküllerle etkileşmesini önlemektedir. Baskılayıcı ajanlar, hücrelerin başlangıç aşamasından, gelişme ve ilerleme aşamalarına malign transformasyonunu inhibe etmektedir (Chen ve Kong, 2005; Surh, 2013). Birçok kemopreventif ajan, başlangıç aşamasını engelleyen bloke edici ajanlar olarak ya da kanser proliferasyonunu, yaşlanmasını veya apoptozunu kontrol eden önemli faktörleri etkileyerek, kanserin ilerlemesini durduran baskılayıcı ajanlar olarak sınıflandırılabilir (Chen ve ark., 2005).

2.1.1. Kanser İnsidans ve Mortalite Tahminleri

Kanser, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Artan yaşam beklentisinin önünde önemli bir engel olarak yer almaktadır (Bray ve ark.,2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2019 verilerine göre kanser, 183 ülkenin 112'sinde <70 yaş ölümlerin birinci veya ikinci önde gelen sebeplerindendir. Diğer kalan 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sıradadır. Birçok ülkede kansere kıyasla felç ve koroner kalp hastalığına bağlı ölüm oranlarındaki önemli düşüşler kanserin önde gelen ölüm nedeni olarak artan önemini yansıtmaktadır (WHO, 2020).

2020'de dünya genelinde tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10.0 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir. Kadın meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Tahmini olarak 2,3 milyon yeni vakanın başında %11,7 ile meme kanseri bulunmaktadır. Sırasıyla %11,4'le akciğer, %10 ile kolorektal, %7,3'le prostat ve %5,6 ile mide %5,6 kanserleri izlemektedir. Akciğer kanseri, tahmini 1,8 milyon ölümle (%18) kanser ölümlerinde en başta gelen neden olmaya devam etmektedir. Bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemektedir. Genel insidans, gelişmekte olan ülkelere kıyasla gelişmiş ülkelerde her iki cinsiyet için 2 kattan daha yüksek iken, ölüm oranı

erkekler için 2 kattan daha düşük ve kadınlar için çok az değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte, kadın meme ve rahim ağzı kanserleri için ölüm oranları, gelişmekte olan ülkelere kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir (sırasıyla 100.000'de 15.0'a karşı 12,8 ve 100.000'de 12,4'e karşı 5,2). Küresel kanser insidansının 2040'ta 28,4 milyon vaka olması, 2020'ye göre %47'lik bir artış olması beklenmektedir. Demografik değişiklikler nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde (%32 ila %56) gelişmiş ülkelere kıyasla (%32'den %56'ya) daha büyük bir artış olması beklenmektedir. Bunun küreselleşme ve büyüyen bir ekonomi ile ilişkili risk faktörlerinin artmasıyla daha da kötüleşmesi beklenmektedir (Sung ve ark., 2021).

2.2. Meme Kanseri

Türkiye'de kadınlarda en yaygın görülen kanser türü (toplam vakaların %11,7'si) ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin önde gelen ikinci nedeni olan meme kanseridir (Özmen ve ark., 2019). Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI)' nün verilerine göre meme kanseri tanısını her sekiz kadından birinin alabileceği ve meme kanseri sebebiyle her 30 kadından birinin öleceği varsayılmaktadır (Curado ve ark., 2007).

Meme kanserine yönelik uygulanacak tedaviler değerlendirilirken çeşitli sınıflandırmalar yapılmaktadır çünkü meme kanseri karmaşık ve heterojen yapıya sahip bir hastalıktır. Beş ana gruba ayrılır bunlar; östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (HER2). Bu gruplar, luminal A, luminal B, bazal benzeri, düşük klaudinli ve HER2 pozitif olarak adlandırılmaktadır (Tablo 2.1.) (Holliday ve Speirs, 2011). ER, PR ve HER2 ekspresyonları açısından eksik olan bazal benzeri ve düşük klaudinli meme kanseri grupları, negatif meme kanseri (TNBC) olarak da adlandırılmaktadır. TNBC hızlı çoğalma ve metastaz yapabilme özellikleri nedeniyle hızlı yayılabilen, sağkalımı düşük ve tedaviye karşı dirençlidir (Dawood, 2010).

Meme kanseri tedavisinde etkili sonuç alabilmek için her gruba ayrı tedaviler uygulanmaktadır. ER ve/veya PR pozitif olan alt gruplar için tedavide kemoterapi ve tamoksifen benzeri ajanlar ile hormon uygulanırken, HER2 pozitif olan alt gruplarda HER2'ye bağlanarak engelleyen trastuzumab benzeri ilaçlar kullanılmaktadır. TNBC alt grubu tedavisinde ise kemoterapi dışında seçenek görülmemektedir çünkü üçlü negatif meme kanseri alt grubunda reseptör duyarlılığı söz konusu değildir (Partridge ve ark., 2016).

Tablo 2. 1. Meme kanserinin gruplarına göre sınıflandırılması (Holliday ve ark., 2011).

Meme Kanseri Grupları	Östrojen Reseptörü	Progestron Reseptörü	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+
Bazal Benzeri	-	-	-
Düşük Klaudinli	-	-	-
HER2	-	-	+

2.2.1. Meme Kanseri Oluşumunda Risk Faktörleri

Meme kanseri için çevresel, hormonal, genetik, biyolojik ve psikolojik faktörler risk olabilir. Aşağıda listelenmiştir.

Demografik özellikler: Artan yaşla birlikte meme kanseri görülme riski artmaktadır. Cinsiyete bağlı olarak kadınların erkeklere kıyasla meme kanserine yakalanma riski 100 kat daha fazladır (Koçak ve ark., 2010).

Reproduktif öykü: İlk âdetini 12 yaşından önce gören kadınlarda ve 55 yaşından sonra menapoza giren kadınlarda yakalanma riski yüksektir (Koçak ve ark., 2010).

Ailesel ve genetik faktörler: Ailede meme kanseri öyküsünün olması meme kanserine yakalanma riskini %15-30 oranında artırır. Meme kanseri geçmişi olan kadınlarda memenin farklı bölgelerinde tekrar kanser gelişme riski olduğu bilinmektedir. BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyondan kaynaklı tanı alan bireylerin %50-60 oranında olduğu bilinmektedir (Koçak ve ark., 2010).

Çevresel faktörler: Alkol kullanımı, sigara kullanımı ve fazla radyasyona maruz kalma meme kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. Ayrıca obezitede adipoz dokuda üretilen sitokinler insülin direncine sebep olmakta ve endojen cinsiyet hormonlarının düzeyinde artışa neden olarak kanser gelişiminde rol alabilmektedir (Koçak ve ark., 2010).

Meme kanserinde tanı alma ortalama yaşı 53'tür. Buna bağlı olarak erken yaşlarda saptanması meme kanserine bağlı ölümlerin önlenmesi sağlanabilir. Gelişmiş ülkelerde erken teşhis ve tedavi sayesinde meme kanseri hastalarında 5 yıl kadar sağ kalım tahmini

%91'dir (Watkins ve ark., 2019). Meme, kolorektal ve serviks kanserlerinde erken tanı ve doğru protokoller ile tedavi çözüm olabilir (Gültekin ve ark., 2017).

2.3. Apoptoz

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, fizyolojik büyüme kontrolünün ve doku homeostazının en önemli düzenleyicisidir. Son yıllarda kanser araştırmalarındaki en önemli ilerlemelerden biri, çoğunlukla apoptoz yoluyla hücre ölümünün, tümör oluşumunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Apoptoz, hücre küçülmesi, nükleer DNA parçalanması ve hücre yüzeyinde çıkıntı (membrane blebbing) dahil olmak üzere tipik morfolojik ve biyokimyasal işaretlerle karakterize edilir (Fulda ve Debatin, 2006).

Kanser hücrelerinde çoğunlukla iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) kaynaklı aktifleşen iki apoptotik sinyal yolağı baskılanmış durumdadır. İç ve dış kaynaklı sinyal yolaklarının aktivasyonu ardından hücredeki ilgili kaspazlar etkin olur. İntrinsik apoptoz yolağının aktif olmasıyla, hücre içi stres nedeniyle mitokondrinin membran geçirgenliği artar. Artan membran geçirgenliği sitoplazmaya sitokrom c molekülünün salınmasını başlatır. Böylece apoptoz ve kaspaz 9 aktivasyonu başlar. Aktif hale gelen kaspaz 9 ise kaspaz 3'ün aktifleşmesini sağlayarak apoptozu uyarır.

Görevi biten hücrelerin veya kanser hücrelerinin kontrollü bir şekilde öldürülmesi ise ekstrinsik apoptoz yolağının aktive olmasını sağlar. Bunun için ölüm reseptörü ligandının bağlanması ile ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. DISC, kaspaz 8'i aktif hale getirir. Kaspaz 8'in, kaspaz 3'ün aktifleştirmesiyle apoptozu durdurur (Özcan, 2021).

2.4. Kanser Obezite ve Beslenme ile İlişkisi

Yaygın hastalıkların oluşum risklerinin belirlenmesinde genler kadar çevresel faktörlerin de etkisi büyüktür. Epidemiyolojide diyet ve hastalıklar arasındaki ilişkinin oldukça uzun bir geçmişi vardır. Diyetin hastalık risklerini artırabileceği veya azaltabileceği konusunda mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmaların bazıları kesin olarak kanıtlanamamıştır. Yapılan çalışmalar ile diyetin epigenetik değişikliklere yol açarak gen düzenlenmesinde değişiklikler meydana getirebileceği ve hastalık riskleriyle ilişkili olabileceği fark edilmiştir (Sapienza ve Issa, 2016).

Diyet, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği, kansere bağlı ölümlerin %30-35'i ile ilişkilendirilmiştir. Diyet ve obezite kansere sebep olmasının dışında kanser tedavisine karşı verilen cevabın azalmasına da neden olabilmektedir. Özellikle sindirim sistemi kanserleri kişinin diyeti ile ilişkilendirilmiştir. Bu yüzden beslenme alışkanlıklarının gözden geçirilmesi durumunda kanser vakalarında düşüş gözleneceği düşünülmektedir. Düşük yağlı ve yüksek lifli gıdaların temelinde oluşturulacak diyet doğrultusunda kolon, endometriyum, postmenopozal meme kanseri, pankreas, böbrek, safra kesesi, özefagus, karaciğer ve hematolojik kanser olgularının azalacağı düşünülmektedir (Kushi ve ark., 2012).

Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) diyet ile kanser riski ilişkisine dair çeşitli kanıtlar sunmuştur. Bunlara örnek olarak karaciğer kanseri ile aflatoksinler, kırmızı et veya işlenmiş et ile kolorektal kanser, alkol ve sigara için gastrointestinal sistem, β -karoten ile akciğer kanseri ilişkilendirilmiştir (Mayne, Playdon ve Rock, 2016). Epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebzeler açısından zengin olan sağlıklı beslenmenin, beslenmenin dışında kanser ve kardiyovasküler hastalıklara, diyabet, diğer kronik hastalıklara da karşı koruduğunu öngörmektedir. Bu koruma mekanizması bitkilerde bulunan lezzet, tat ve renkten sorumlu olan sekonder metabolitler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu doğal bileşiklerin çok büyük bir sınıfı olan fitokimyasalların sağlığa faydası kanıtlanmış olup oldukça çeşitlidir (Braicu ve ark., 2017).

2.5. Brokoli

Brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), lahanagiller olarak adlandırılan Krusifer familyasındandır. Krusifer familyası ortalama olarak 350-380 cins ve 30.000 türü kapsamaktadır. Brassicaceae şeklinde de adlandırılmaktadır. Brokoli *Brassica* cinsinin *oleracea* türüne bağlıdır. *Oleracea* türü bunun dışında Brüksel lahanası, karnabahar, yer elması, kıvırcık, mor ve karalahanayı da kapsamaktadır. *Oleracea* türü farklı gruplara ayrılmaktadır. *B. oleracea* botrytis ve *B. oleracea italica* brokolinin başlıca iki grubudur (Heywood, 1978). Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Brokoli bitkisi

Brokoli, besin değerinin yüksek olduğu için özellikle son yıllarda popüler olmuştur. 100 gram brokoli 4,30 g karbonhidrat, 3,03 g protein, 0,35 g yağ ve 3,42 g toplam diyet lifi içermektedir. 100 g çiğ brokoli bitkisinin besin değerleri Tablo 2.2.'de gösterilmiştir (Anonymous, 2018a). 2004 yılında, Türkiye'de brokoli üretimi İzmir'in Torbalı Özbey köyünde başlamıştır (Anonymous, 2018b). Brokoli dünya çapında yaygın olarak tüketilen bir sebzedir. Biyoaktif bileşenler yönünden zengin bir kaynaktır. Brokolinin vitamin, fenolik bileşik, glukozinolat ve sulforafan içeriği diğer yeşil renkli sebzelerden daha yüksektir (Martínez-Villaluenga, Frías, Gulewicz, Gulewicz ve Vidal-Valverde, 2008).

Bir çalışmada, kemopreventif etkisi olan sebzeler az, orta, yüksek ve çok yüksek aktiviteli olarak gruplandırılmıştır. Yüksek antioksidan aktivite dört veya daha fazla hücre kültüründe %50'lik inhibitör etki olarak tanımlanmıştır ve brokoli de bu sınıfa eklenmiştir. Sebzelerin antiproliferatif özellikleri arasında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Turpgillerin, koyu yeşil sebzelerin ve Allium grubu sebzelerinin yüksek oranda antikanserojen özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Boivin ve ark., 2009).

Tablo 2. 2. 100 g çiğ brokoli bitkisinin içerdiği besin değerleri (Anonymous, 2018a).

Besin Ögesi	Birim	Ortalama	Minimum	Maksimum
Enerji	Kcal	39	38	41
Su	ml	87,98	87,34	88,78
Protein	G	3,03	1,27	4,19
Azot	G	0,49	0,2	0,67
Yağ	G	0,35	0,33	0,37
Karbonhidrat	G	4,3	3,22	6,29
Lif	G	3,42	2,71	4,09
Lif, çözünür	G	0,22	0,12	0,28
Lif, çözünmez	G	3,21	2,58	3,82
Sakaroz	G	0,07	0	0,18
Glukoz	G	0,88	0,12	1,31
Fruktoz	G	0,71	0,07	1,06
Demir	Mg	1,22	0,73	1,66
Fosfor	Mg	99	87	110
Kalsiyum	Mg	49	30	57
Magnezyum	Mg	27	22	33
Potasyum	Mg	349	335	373
Sodyum	Mg	10	8	12
Çinko	Mg	0,63	0,52	0,73
C vitamini	Mg	107,6	90,8	122,6
L-askorbik asit	Mg	104,8	83,1	122
Tiamin	Mg	0,069	0,038	0,127
Riboflavin	Mg	0,141	0,088	0,189
Niasin	Mg	0,795	0,691	0,832
B-6 vitamini	Mg	0,227	0,1	0,367
Folat	µg	155	132	198
A vitamini	RE	83	58	115
Beta-karoten	µg	997	698	1377
Lutein	µg	552	283	1070
K-1 vitamini	µg	110,8	104,3	117,5

2.6. Brokolide Bulunan Biyoaktif Bileşenler

Meyve ve sebzeler, kronik hastalıkların gelişme riskini azaltmanın yanında temel beslenmeyle beraber sağlık için yararlı etkileri olan biyoaktif fitokimyasalları

yüksek oranda içerir. Son çalışmalar biyoaktif bileşenlerin yararlarının bilinenden daha fazla olabileceğini düşündürmektedir. Bunun nedeni yapılan birçok çalışmada özellikle in vitro ve hayvan çalışmaları bu bileşenlerin antioksidan aktiviteye ek olarak birden fazla etki mekanizmasına sahip olmasından kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (Liu, 2004). Beslenmeyle beraber alınan fitokimyasalların başlıcaları fenolik bileşikler, alkaloidler, azot içeren bileşikler, organosülfür bileşikleri, fitosteroller ve karotenoidler şeklinde sıralanabilir. Fitokimyasalların kanser önlemedeki olası etki mekanizmaları çok fazladır. Bu özellikler tablo 2.3.'de verilmiştir (Liu, 2013).

Tablo 2. 3. Fitokimyasalların kanser önlemedeki potansiyel etki mekanizmaları (Liu, 2013).

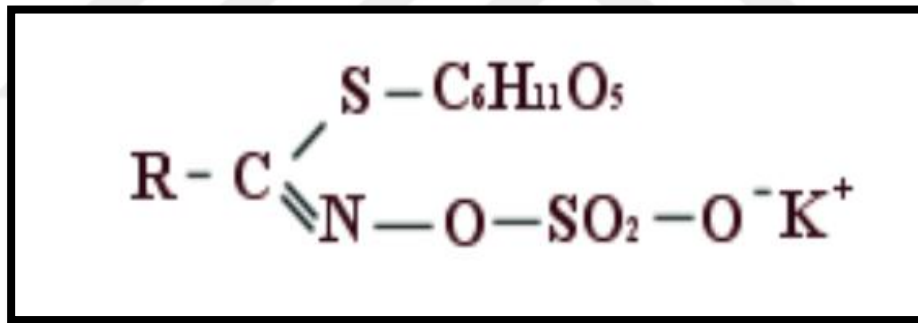
Fitokimyasalların Etki Mekanizması
Yüksek antioksidan aktivite
Serbest radikalleri ve oksidanları stabilize etme
Oksidatif stresi azaltma
Nitrozasyonu ve hücre çoğalmasını engelleme
DNA hasarını önleme ve onarma
Hücre farklılaşmasının uyarılması
Hücre döngüsü tutuklanmasının ve apoptozun indüksiyonu
Sinyal transdüksiyon yollarının düzenlenmesi
Enzim indüksiyonu ve arttırıcı detoksifikasyon
Faz II enzimin uyarılması
Faz I enzim inhibisyonu
Steroid hormon metabolizmasının düzenlenmesi
Antibakteriyel ve antiviral etki

Brokoli de brassica ailesinin diğer türleri gibi fitokimyasallardan oldukça zengin bir sebzedir. Yapılan bir çalışmada domates, brokoli, havuç, patlıcan ve üzüm arasında en yüksek fitokimyasal oran 4513 mg/kg ile brokolide bulunmuştur (Alarcón-Flores, Romero-González, Vidal ve Frenich, 2013). Vaka kontrollü çalışmaların %56'sında brokolinin kanserden koruyucu olduğu bulunmuştur. Brokolideki C ve E vitamini, flavonoller (kuersetin ve kamferol), glukozinolatlar ve sulforafan ile ilişkili bulunmuştur (Koh, Wimalasiri, Chassy ve Mitchell, 2009).

2.6.1. Glukozinolatlar

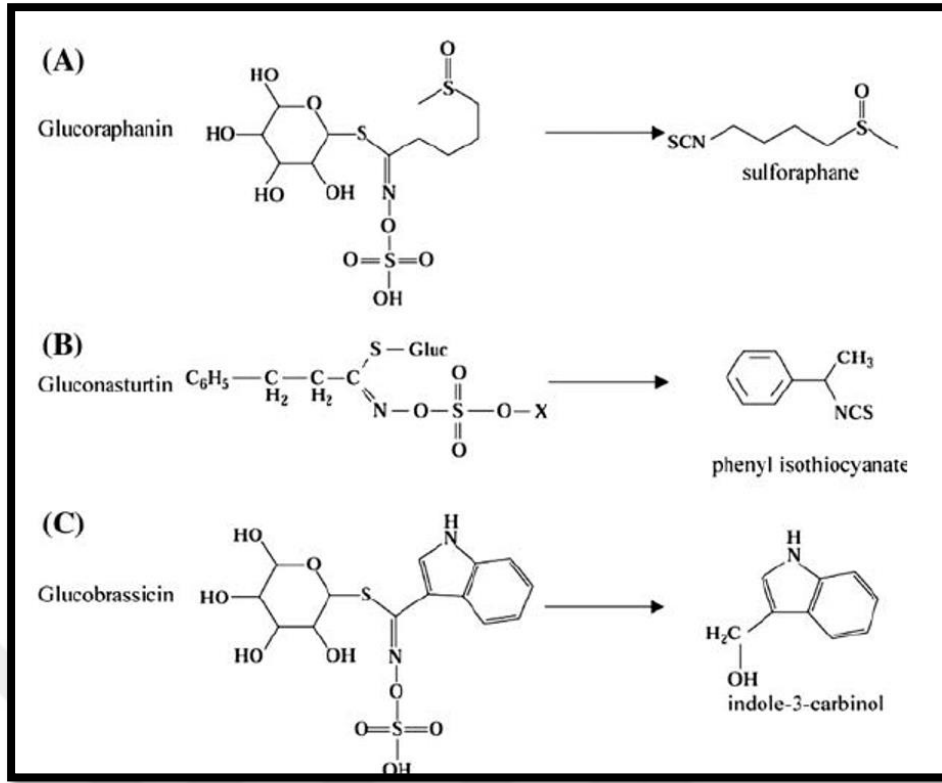
Beslenmenin, kanserin etiyolojisindeki etkisi uzun süredir bilinmektedir. Literatüre göre, beslenmenin kansere neden olabilen maddeleri içerebildiği gibi, çok fazla antikansorejen ajanları içerdiği de gösterilmiştir (Antoni, Burckel, Josset ve Noel, 2015). Bu yüzden beslenme tarzında yapılacak olan değişiklikler, birçok kanserin önlenmesine yardımcı olabilmektedir. Temel beslenmeyle beraber alınan sebze ve meyveler, kemopreventif bileşiklerin zengin kaynaklarıdır (Keum, Jeong ve Kong, 2005).

Krusifer grubu sebzelerin diyetle alınması, genel sebze tüketimine göre, kansere karşı çok daha etkili koruyucudur. Krusifer grubu sebzelerin içerdiği glukozinolatların, kanserden koruyucu olduğu bilinmektedir. Bu yüzden üzerinde en çok çalışılan biyoaktif bileşiklerdir (Çelik ve Köksal, 2013). Yan zincirlerinde 120'den fazla aminoasit bulundurmaktadır. Genel kimyasal yapısında β -D-tiyoglukoz, sülfonlanmış oksim ($-C=NOH$) grubu bulundurur. Glukosinolatların genel kimyasal yapısı Şekil 2.2.'de gösterilmiştir (Yılmaz ve Demirel, 2012).



Şekil 2. 2. Glukosinolatların genel kimyasal yapısı (Yılmaz ve ark., 2012).

Metionin, triptofan, fenilalanin veya dallı zincirli aminoasit içeren bir yan zincirden oluşmaktadır (Yılmaz ve ark., 2012). Yan zinciri oluşturan aminoasitlerde veya bu aminoasitlerin dizilmesinde olacak bir değişiklik, farklı glukosinolat bileşiklerinin oluşmasını sağlamaktadır. Glukosinolatlar suda çözünen, anyonik, uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıklı bileşiklerdir (Yemiş ve Artık, 2007). Şekil 2.3.'de gösterilmiştir (Cartea ve Velasco, 2008).



Şekil 2. 3. İnsan beslenmesinde en çok çalışılan GLS'ler ve hidroliz ürünleri.

(A) alifatik, (B) aromatik, (C) indol (Cartea ve ark., 2008).

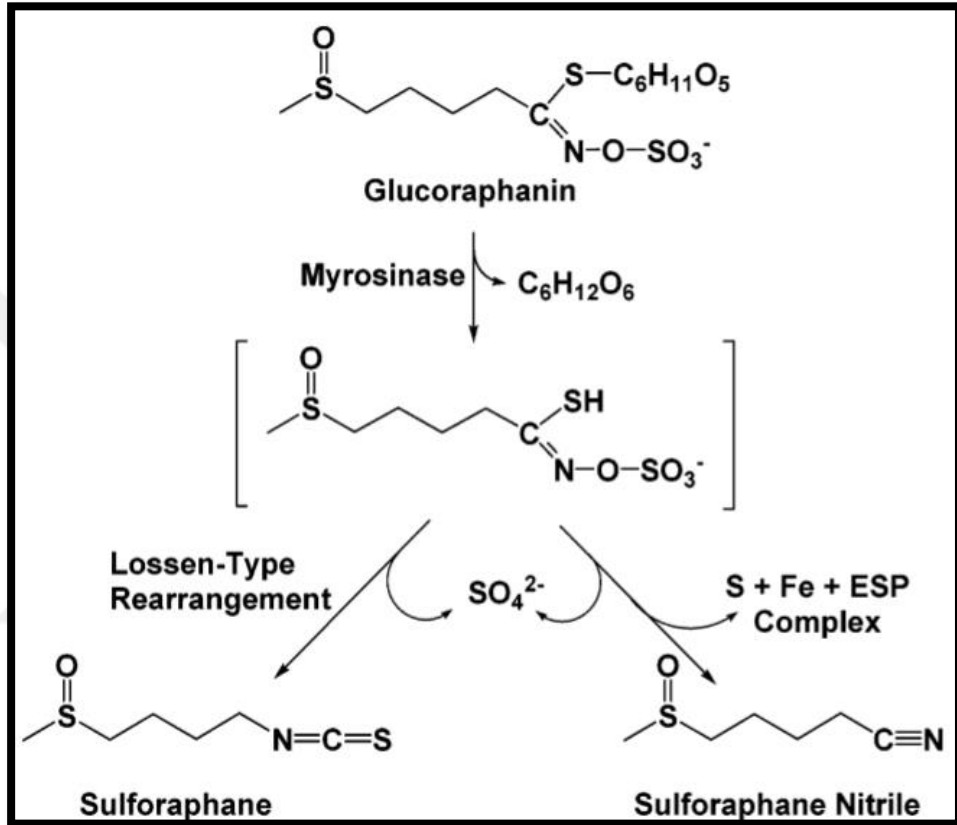
Bitkilerin glukosinolat içeriği ve yapısı, bitkinin incelenen kısmına ve olgunluğuna göre farklılık göstermektedir. Aynı sebzenin köklerinde, yapraklarında, saplarında ve tohumlarında glukosinolat seviyeleri değişmektedir. Glukosinolat içeriği sırasıyla en yüksek tohum, kök, yaprak ve sap bölümlerindedir (Yılmaz ve ark., 2012).

İnsan ve hayvanlarda biyoaktivite göstermeyen GLS'ler, bitki yapısında meydana gelen zarar sonucunda (kesme, doğrama, pişirme, dondurma, çiğneme gibi) mirosinaz enzimi ile ITC, nitril, tiyosinat, indol-3 karbinollere hidrolize olarak aktif olurlar. Brokolinin yapısında yüksek miktarda bulunan SFN, en fazla çalışılan ITC bileşiğidir (Koçyiğit ve Köksal, 2019).

Brokolide başlıca bulunan glukozinolat, metioninden türetilmiş alifatik bir GLS olan glukorafanin'dir. Brokoli filizinde bulunan toplam glukozinolatın %81'ini glukorafanin oluşturmaktadır (Pérez, Barrientos, Román ve Mahn, 2014). Brokoli filizlerindeki glukorafanin miktarı olgun brokoliye göre 20 kat daha yüksektir (Fahey, Zhang ve Talalay, 1997). Brokoli bitkisinin yapısı zarar gördüğü zaman glukorafanin,

mirosinaz enziminin aktif olmasıyla sulforafan (1-izotiyosiyanato-4- metilsülfinilbütan) ve sulforafan nitrile hidrolize olmaktadır (Şekil 2.4) (Jeffery ve Araya, 2009).

Aglikon (tiyohidroksim-0-sülfonat) olarak adlandırılan kararsız ara ürün, glukorafanın hidrolize olmasıyla oluşur. Glikoz ve sülfat açığa çıkar. Enzimatik olmayan molekül içinin düzenlenmesiyle de sulforafan oluşturur (Matusheski ve ark., 2006).



Şekil 2. 4. Glukofaninin mirosinaz enzimi ile hidrolizi (Jeffery ve ark., 2009).

Sulforafan oluşumunda sadece glukorafanın içeriği etkili değildir. Ayrıca mirosinaz ve epitiospecifier protein (ESP) aktivitesine bağlıdır. ESP, ısıya karşı daha hassas olduğu için, az bir ısı işlem uygulaması ile ESP aktivitesi azalabilir. Bu yüzden ESP inaktive edilerek mirosinaz enziminin korunması sağlanabilir. Bu şekilde brokoli ve brokoli filizlerinde sulforafan oluşumu artmaktadır (Guo, Yang, Zhou, ve Gu, 2016). Askorbik asit ve çinko (Zn^{2+}) da mirosinaz aktivitesini uyurmaktadır. Bu da glukozinolatların hidrolizini arttırmaktadır. Ek olarak mirosinaz aktivitesinin 40 °C ve nötr bir pH seviyesinde daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Liang, Yuan, ve Xiao, 2006). Düşük pH seviyelerinde ana ürün olarak nitril oluşumu etkinken, nötral pH seviyelerinde izotiyosiyanat oluşumu daha yüksektir (Frandsen ve ark., 2014).

GLS'in hidrolize olmasını sağlayan glukozidazlar kolonda bulunan bakteriler sayesinde üretilmektedir. Ancak, kolondaki enzim aktivitesi ile gerçekleşen hidroliz bitki mirosinaz enzimi ile gerçekleşen hidrolize göre daha azdır. Bu yüzden, gıdaların işlenmesi sırasında mirosinaz enziminin etkin kalabilmesi, elde edilen ürünün daha sağlıklı olması için önemlidir. Gıdaların yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması mirosinaz inaktivasyonuna neden olmaktadır (Van Eylen, Oey, Hendrickx ve Van Loey, 2007; Van Eylen vd., 2009; Oliviero, Verkerk, Van Boekel ve Dekker, 2014).

2.6.2. Besinlerin Hazırlık Aşamasının Glukosinolat İçeriğine Etkisi

Depolamanın Brasika sebzelerinin glukosinolat içeriğine olan etkileri incelendiğinde, sebzelerin 4-8°C'de 3 gün süresince depolanmasının glukosinolat içeriğinde anlamlı değişikliğe neden olmadığı ancak 7 günlük depolama sonucunda glukosinolat miktarında %9-26 oranında azalma olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple, uzun süreli depolamanın glukosinolatların yararlarını azaltabileceği düşünülmektedir (Song ve Thornalley, 2007).

Glukosinolat içeren sebzelere hazırlık aşamasında uygulanan kesme, doğrama, dilimleme gibi işlemler glukosinolat ve hidroliz ürünlerinin miktarlarını değiştirmektedir. Bu işlemlerin başlıca izotiyosiyanatların miktarında artışa neden olduğu bilinmektedir (Higdon, Delage, Williams ve Dashwood, 2007).

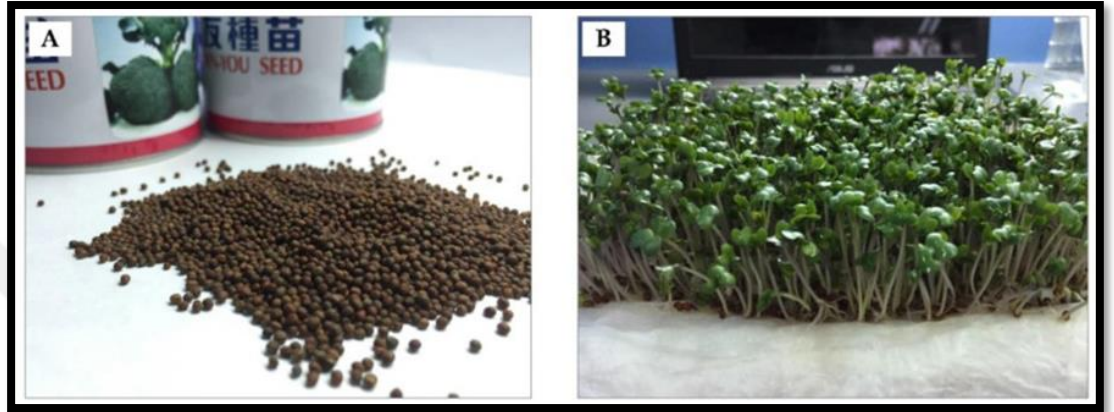
Sebzelerin glukosinolat içeriklerinin uygulanan pişirme şekli ve süresine göre de değiştiği bilinmektedir. Glukosinolatların suda çözünür olmasıyla ilişkili olarak haşlama işlemi aktif bileşiklerin azalmasına neden olmaktadır. Brassica sebzelerinin taze olarak, kısa sürede ve buharda pişirme gibi suya maruz bırakılmadan aktif bileşiklerin kaybının azalması açısından önemlidir (Yemiş ve ark., 2007).

2.6.3. Sulforafan

SFN [1-izotiyosiyanato-4-(metilsülfünil), bütan (C₆H₁₁NOS₂)], brokoli ve diğer turpgillerden elde edilen bir izotiyosiyanattır (ITC) ve bir glukosinolat çeşidi olan glukorafaninin endojen mirosinaz enzimi ile hidrolizi sonucu oluşmaktadır (Juengel ve ark., 2018).

Kuru ağırlık miktarı olarak daha yüksek seviyedeki glukosinolatlar fidelerden birkaç gün sonra oluşan brokoli filizleri içerisinde bulunmaktadır (Juge, Mithen ve Traka, 2007). Klinik olarak yapılan araştırmaların çoğu, brokolinin filizlerine ilişkindir, bu

alandaki çalışmaların ilki 1990'ların başında Johns Hopkins Üniversitesi'nde Fahey ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve 3 günlük brokoli filizlerinin, olgun bitkilerden 10–100 kat daha yüksek glukosinolat konsantrasyonu içerdiğini göstermiştir. Şekil 2.5.'de brokoli filizleri gösterilmiştir. Brokolinin çiçek denilen kısımdaki sulforafan sap kısmından kıyasla iki kat, yaprak kısmına kıyasla yaklaşık 10 kat daha fazladır (Houghton, Fassett ve Coombes, 2016).



Şekil 2. 5. (A) Brokoli tohumları. (B) Beş günlük brokoli filizi.

Daha yüksek miktarda glukosinolat içeren brokoli filizleri özel olarak yetiştirilmektedir (Juge ve ark., 2007). Oral olarak alınan brokoli filizleri veya tohum ekstraktları, hidrolizi gerçekleştirmek için mirosinaz enzimi barındırmazlar. Sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasında yer alan mirosinaz enzimi üreten bakteriler tarafından metabolize edilmektedir. Bireyler arasında bağırsaktaki mikrobiyal flora ve dolayısıyla mirosinaz enzimi açısından farklılık göstermektedir. Araştırmalar sonucu yaklaşık SFN'nin %74'ünün jejunumdan emildiği ve merkaptirik asit metabolizma yolağını kullanmakta olduğu ifade edilmiştir (Altern Med Rev., 2010: 15).

Brokoli, C ve E vitaminleri, kuersetin, kaempferol glikozitler ve Brassicaceae'nin diğer üyeleri gibi, glukobrasisin (3-indolilmetil glukosinolat) ve glukorafanin (4-metilsülfinilbütıl glukosinolat) dahil olmak üzere birçok biyoaktif bileşen içerir. Bu aktivitenin çoğundan sorumlu olan önemli bir biyoaktif bileşen, glukorafaninin bir hidroliz ürünü olan sülföröfan (1-izotiyosiyanato-4-metilsülfinilbutan) olabilir (Jeffery ve ark., 2009).

2.6.4. Sulforafanın Metabolizması ve Biyoyararlılığı

Brokolinin yapısında en fazla bulunan GLS olan GRA, mirosinaz enzim aktivitesiyle SFN'ye parçalanmaktadır (Jeffery ve ark., 2009). SFN'nin metabolizmasında ilk basamak glukorafaninin enzimatik hidrolizidir. Bu reaksiyon mirosinaz enzimi yardımıyla katalizlenir. Bu enzim, glukozinolattaki glikonu ayırarak glukoz, hidrojen sülfat ve farklı aglikon çeşitlerinin (tiyosiyanat, ITC ya da nitril vb) oluşmasını sağlar. Nötral pH'da başlıca hidroliz ürünü dayanıklı olan izotiyosiyanatlardır. Emilimin ardından SFN etkin olarak merkaptürik asit ile metabolize olur. SFN metabolizmasındaki son adım ise idrarda SFN-sistein (Cys) ve SFN-N-asetil sistein (NAC) oluşumudur (Clarke, Dashwood ve Ho, 2008).

2.6.5. Sulforafanın Karsinojenez Üzerindeki Etki Mekanizmaları

SFN, 1992 yılında potansiyel kemopreventif bir ajan olarak faz 2 enzimlerini uyararak ve karsinojen aktivasyonunda yer alan enzimleri baskılayarak kanseri önlemedeki etkileri üzerine çalışılmıştır. Daha sonra, SFN'nin kanser başladıktan sonraki süreçte tümör gelişimine karşı koruyucu ve baskılayıcı mekanizmaları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Böylece SFN, kanserin başlangıç evresinde faz 1 enzimlerini baskılayarak ve faz 2 enzimlerini uyararak karsinojenezi durdurmaktadır. Başlangıç evresinin ardından hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, apoptozisi ve hücre döngüsünü kapsayan çeşitli yollarla kanserin ilerlemesini baskılayabildiği bulunmuştur (Zhang, Talalay, Cho ve Posner, 1992; Clarke ve ark., 2008).

2.6.6. Sulforafan ve Apoptoz

Apoptoz, doku homeostazının devamı için gerekli olan sessiz bir hücre yok etme mekanizmasıdır ancak düzensizliği nörodejeneratif hastalıklardan, organ yetmezliğine, otoimmün hastalıklardan kanser oluşumlarına kadar birçok rahatsızlığa neden olabilir. Çevresel stres ve toksik bileşikler de kapsayan birçok faktör apoptozda etkili olabilir (Jiang ve ark., 2018). Pre-neoplastik veya neoplastik hücreler, kontrolsüz hücre bölünmesi ve ölüm mekanizmalarına sahip oldukları için, kemopreventif bileşiklerin genetik olarak hasarlı bu hücrelerde apoptoz indüksiyonu oldukça önemsenmiştir. Etki mekanizması Şekil 2.6.'da özetlenmiştir (Koçyiğit ve ark., 2019).

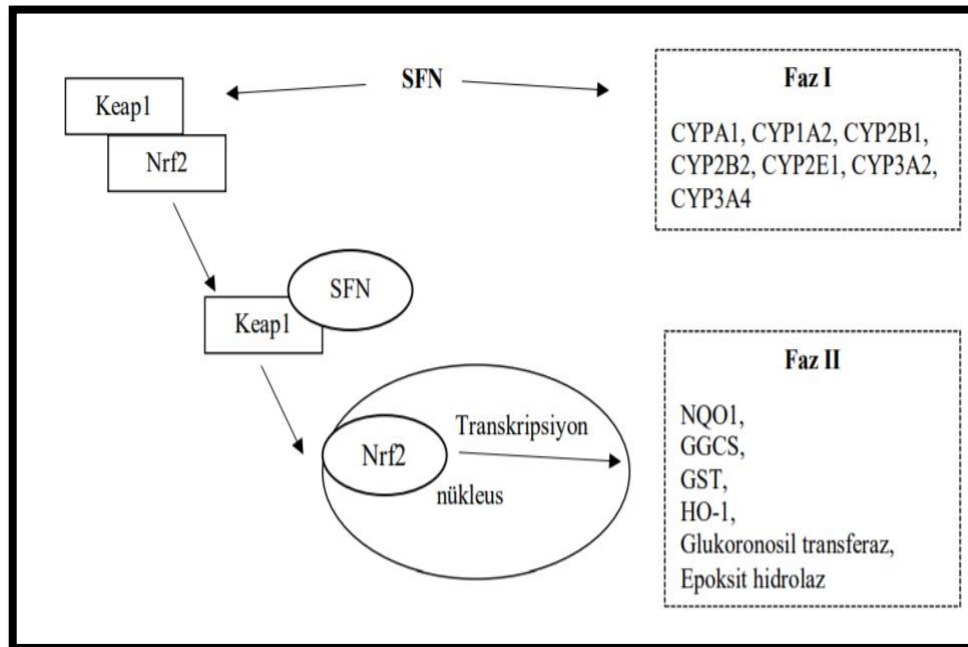
Sulforafan vücutta farklı yollar ile kemopreventif etki sağlayabilmektedir.

1. Kromatin ve DNA modifikasyonları gen diziliminin kontrolünü sağlamaktadır (Bassett ve Barnett, 2014).

2. Histon asetil tranferaz (HAT) ve histon deasetilaz enziminin (HDAC) dengesi ile histon asetilasyonunun azalması kanserin şiddetini ve tekrarlama ihtimalini artırmaktadır. SFN, kanser hücrelerinde histon deasetilaz (HDAC) enzimini baskılayarak transkripsiyon ve hücre büyümesinin engellemektedir (Bassett ve ark., 2014).

3. Nükleer faktör kappa B'yi (NF-kB) regüle ederek, kanser hücrelerinin apoptozisini düzenlemektedir. Böylece tümörlerin anjiojenez ve metastazının inhibe edilmesini ve hücre migrasyonunun önlemesini sağlar (Koçyiğit ve ark., 2019).

4. SFN'nin TrxR'nin sitoplazmada bulunan formu TrxR1 ve mitokondrideki formu TrxR2 ekspresyonunu artışı sağlayarak hücre hasarlarını ve yıkımlarını engellediği gösterilmiştir. Tioredoksinler organizmada tüm hücrelerde yer alan redoks proteinleridir. Tioredoksin redüktaz (TrxR) ve pentoz fosfat yolağında kazanılan NADPH ile beraber indirgenen tioredoksin, stres durumlarında NFkB, AP-1 ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerinin indirgenmişini kontrol ederek, hücreleri apoptozisten korur. Tioredoksin redüktaz enzimi ek olarak reaktif oksijen türlerinin aktivitesini durdurmaktadır (Koçyiğit ve ark., 2019).

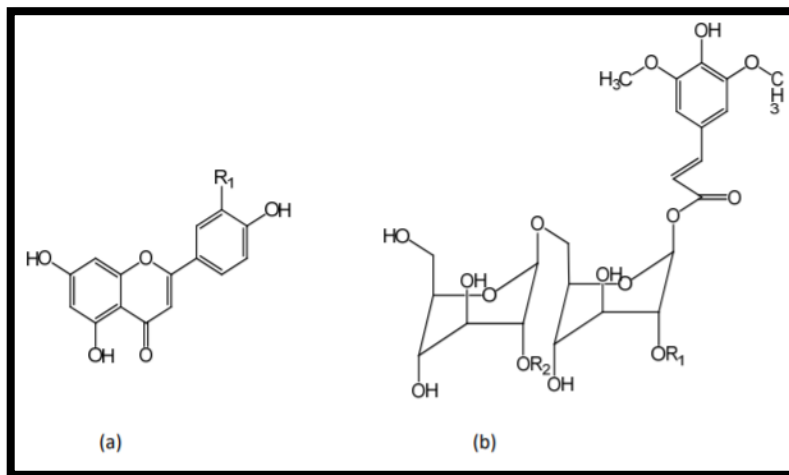


Şekil 2. 6. Sülforafının Etki Mekanizması (Koçyiğit ve ark., 2019).

2.6.7. Fenolik Bileşikler

Polifenoller, bitkilerin yapılarındaki fenol grupları ile karakterize olan ikincil metabolitlerdir. Fenilalanin aracılığı ile sentezlenir. Fenolik bileşiklerin gösterdiği fizyolojik özellikler: antioksidan, antialerjik, antimikrobiyal, antiartrojenik, antienflamatuar, antitrombotik ve kardiyoprotektif etkidir (Jaiswal, Gupta ve Abu-Ghannam, 2012)

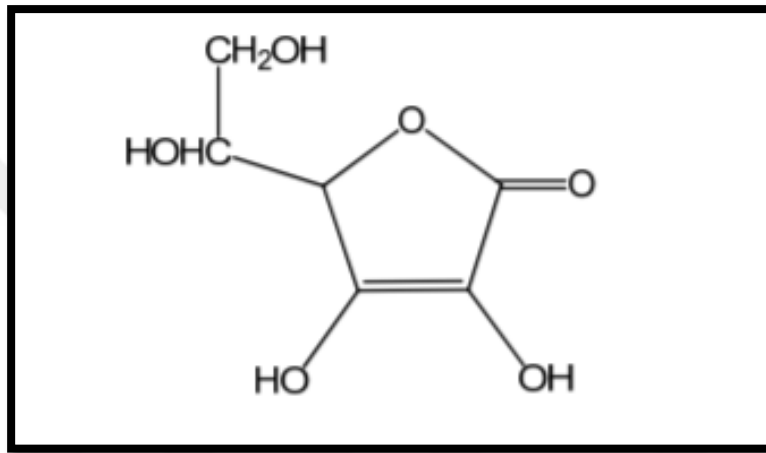
Doymamışlık derecesi, hidroksil gruplarının sayısı ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon seviyesindeki farklılıklara göre flavonoidler; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller, izoflavonoidler ve antosiyanidinler şeklinde sınıflandırılır (Gökmen ve Acar, 2004). Antiradikal aktivite ile ilişkilendirilen 3 yapısal özellikten en az birine sahip olan flavonoidlerin antioksidan etkinliği oldukça güçlüdür. Hidroksilasyon derecesi antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Yapılarında şeker grubu bulunması ise antioksidan seviyesini azaltmaktadır. Brassica türlerinde en etkin olan fenolik asitler şeker ve organik asitlerle birlikte olan kafeik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve ferulik asittir (Landete, 2013). En önemli flavonollerin kuersetin ve kamferol, flavonol glikozitlerin ise kuersetin-3-O-soforosit ve kamferol-3-O-soforosit olduğu bilinmektedir (Koh ve ark., 2009). Brokolide en çok yer alan iki fenolik bileşik Şekil 2.7.'de görülmektedir (Zhang ve Hamauzu, 2004). Ayrıca brokoli hidroksisinnamik asitler açısından en zengin sebzelerden biridir. Brokolide saptanan başlıca hidroksisinnamik asitler 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose, 1,2-diferuloylgentiobiose ve 1,2,2-trisinapoylgentiobiose ve neoklorojenik asittir (Vallejo, Gil-Izquierdo, Pérez-Vicente ve García-Viguera, 2004; Zhang ve ark., 2004).



Şekil 2. 7. Brokolide bulunan başlıca fenolik bileşikler. **a:** flavonol glikozitler, **b:** hidroksisinnamik asit esterleri (Zhang ve ark., 2004).

2.6.8. Askorbik Asit

Askorbik asit güçlü bir antioksidandır. Askorbik asidin kimyasal yapısı Şekil 2.8.'de görülmektedir (Yılmaz, 2019). Gıdalarda askorbik asit, genellikle L-askorbik asit olarak bulunmaktadır. Kararsız bir moleküldür. Miktarı meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında enzimatik ve enzimatik olmayan parçalanmalara bağlı olarak azalmaktadır. Bir çok etkene bağlı (konsantrasyon, oksijen, ışık, basınç, sıcaklık) olarak parçalanma seviyesi değişmektedir (Munyaka, Makule, Oey, Van Loey ve Hendrickx, 2010).



Şekil 2. 8. Askorbik asidin kimyasal yapısı (Yılmaz, 2019).

Askorbik asit hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında önemli bir role sahiptir. Bu vitamin insan vücudunda sentezlenemediği için dışarıdan alınması gerekli ve önemlidir Çünkü steroid ve peptid metabolizması, kollajen sentezi, bağışıklık sistemi, endokrin fonksiyonu, kan basıncının kontrolü, demir ve bakır dengesi, endotel fonksiyonu ve yağ asidi taşınımı gibi birçok metabolik sistem üzerinde askorbik asidin etkisi bulunmaktadır (Davey ve ark., 2000).

Brokolinin askorbik asit seviyesi yüksektir. Bu vitaminin mirosinaz aktivitesini artırarak daha yüksek sulforafan oluşumunu sağlayabildiğini bildirilmektedir (Burmeister, Cottaz, Rollin, Vasella, ve Henrissat, 2000; Shen, Su, Wang, Du ve Wang, 2010). Yüksek sıcaklık brokolideki askorbik asitin etkisini azaltmaktadır. Pişirme, kaynatma ve mikrodalga işlemlerinin askorbik asit seviyesinde önemli bir azalmaya sebep olduğu bildirilmektedir (Yuan, Sun, Yuan ve Wang, 2009).

Günlük alınması gereken C vitaminin RDA (Recommended Dietary Allowances)'ya göre değeri kadınlar için 75 mg/gün ve erkekler için 90 mg/gün'dür. Sigara içen erkek ve kadınlarda C vitamini gereksinimi artmaktadır. (Landete, 2013)

2.7. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, çok hücreli canlılara ait hücrelerin büyüme ve çoğalmasına uygun olan yapay bir ortamda (in vitro) geliştirildiği tekniktir. Farklı hücre kültür ortamlarının geliştirilmesi sayesinde hücrelerin çoğalması, farklılaşması, büyüme faktörlerinin belirlenmesi, çeşitli hücrelerin fonksiyonlarının altında yatan mekanizmaların anlaşılması, hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin ve oluşturulan hastalık modellerinde ilaç adayı moleküllerin etkilerinin saptanması gibi birçok deneysel çalışmanın yapılmasını mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, hücresel ve moleküler biyolojide kullanılan en önemli araçlardan biri hücre kültürü olmuştur (Aslım, 2018).

Hücreler, doğrudan dokudan ayrıştırılabilir veya daha önce oluşturulmuş bir hücre hattından veya hücre türünden çıkarılabilir. Enzimatik veya mekanik yollarla türetilir. Hücre kültürü, hücrelerin standart fizyolojisi ve biyokimyasını incelemek için uygun model sistemleri, tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar. Hücre kültürü modelleri, klasik ilaç absorpsiyon modelleri ile kıyaslandığında birçok üstünlüğe sahiptir (Antoni, Burckel, Josset ve Noel, 2015).

Bunlar;

- İlaçların ve özellikle peptidlerin metabolizmasının hızlı değerlendirilmesi,
- Kontrollü koşullar altında ilaç emilim mekanizmasını çalışma olanağı,
- Farmasötik maddelerin kullanılmasıyla ilaç absorpsiyonunu artırma yöntemlerinin hızlı sonuçlanması,
- Farmasötik maddelerin epitelyum bütünlük üzerindeki etkilerini çalışma imkânı,
- Yardımcı çözücülerin hücresel etkilerinin çalışmaları,
- Bağırsak epitelyumunun bariyer yeteneklerinin incelenmesi,
- İnsan hücreleri üzerinde çalışma yapabilme olanağı sağlanması,
- Zaman ve maliyet kaybını azaltmaya ek olarak hayvan çalışmalarını en aza indirme imkânı,
- İlaç hedefleme stratejilerini hızlı değerlendirme imkânıdır (Gündoğdu, 2009; Bekki, 2010; Brunner, 2010).

Hücreler, temel besin öğelerini (amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller), büyüme faktörlerini, hormonları, gazları (O_2 , CO_2) içeren ve kimyasal ortamı düzenlenmiş (pH, ozmotik basınç, sıcaklık) bir substrat veya ortam içeren yapay bir ortamda büyür. Yapışık hücrelerde, birincil kültür hücrelerinin bağlanmak için katı desteğe ihtiyacı vardır. Bu nedenle çoğu hücre ankraja bağımlıdır ve katı veya yarı katı bir substrata (yapışkan veya tek tabakalı kültür) bağlıyken kültürlenmesi gerekirken, diğerleri kültür ortamında yüzerek büyütülebilir (süspansiyon kültürü). Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri üç ana gruba ayrılmıştır. Bunlar; primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürleri ve diploit hücre kültürleridir (Antoni ve ark., 2015).

Primer hücre kültürleri, kültür ortamında ilk yer alan ve asıl dokudan yeni ayrılan hücreleri içerir. Dokunun fizyolojik durumunu göstererek genotip ve fenotip olarak asıl doku hücresi ile aynı özellikleri içerir. Ancak deneysel olarak çoğalmaları kısıtlıdır. İlk pasajdan sonra primer hücre kültürleri bir kültür ortamından diğer kültür ortamına alınırlar. Bu işlemin adı subkültürdür. Yeni elde edilen hücre kültürleri aynı işlevsel özelliklere sahip hücre hatlarını oluştururlar. Hücre hatları, hücrelerin alındığı dokuların özelliklerine göre değişmek koşuluyla subkültüre izin verirler.

Devamlı hücre kültürleri, alt kültürleri sürekli yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokularla aynı olmadan geliştirilen kültürlerdir. Transformasyonlarından dolayı fizyolojik özelliklerinin tümünü koruyamaz. Diploit hücre kültürlerine, primer kültürlerin altkültürlerinin yapılmasıyla ulaşılır. Bütün hücreler %85 oranında alındıkları dokunun karyotipini korur ama bazı hücrelerde kromozom çeşitleri kaybolabilir (Ergün, 1998; Taria, Nakao, Matsumoto ve Takahashi, 2000). Devamlı hücrelere kıyasla primer hücrelerin sitotoksitenin değerlendirilmesinde daha verimli olacağı görülmekle birlikte sitotoksik maddeye verdikleri metabolik yanıtta bazı farklılıklar olmaktadır. Genetik ve metabolik stabiliteleri sayesinde test sonuçlarının standartlaşmasında kolaylık sağlayan devamlı hücre hatlarından olan L929 ve Balb3T3 sitotoksiste testleri standart olarak kullanılmaktadır (Ergün, 1998).

2.7.1 Hücre Hattı Çeşitleri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık tanı koyulan kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olup, toplam kanser vakalarının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluşturmaktadır; dolayısıyla bu alandaki araştırmalar hem ekonomik hem de psikolojik yükün üstesinden gelmek için önemlidir (Çakmak ve Gündüz, 2019). Son

yıllarda meme kanserinin tek bir hastalığı değil, memenin epitel hücrelerinden kaynaklanan moleküler olarak farklı bir dizi tümörü temsil ettiği netlik kazanmıştır (Kang ve Kim, 2013).

Hücre dizileri, laboratuvar araştırmalarının birçok alanında ve özellikle kanser araştırmalarında *in vitro* modeller olarak yaygın olarak kullanılabildikleri için meme kanserinde moleküler tanı için kilit bir unsur gibi görünmektedir (Burdall, Hanby, Lansdown ve Speirs, 2003).

2.7.2. MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre dizisi, 51 yaşında metastatik bir meme adenokarsinoması olan bir kadın hastanın, plevral efüzyonundan elde edilen ve en çok kullanılan, epitel, insan meme kanseri hücre dizisidir (Valastyan ve Weinberg, 2011). ER ve PR ekspresyonu ve HER2'den yoksun olması nedeniyle, oldukça agresif ve istilacıdır. Metastaz yapan diğer kanser hücre hatlarında olduğu gibi MDA-MB-231 hücrelerinde de, hücre dışı matriks proteolitik enzimlerce bozulmuştur (Cailleau, Olive ve Cruciger, 1978).

Normal karyotipide sahip olmayan hücrelerde kromozom sayıları normal yapıda değildir. Karyotip analiz içerisinde kromozom miktarlarının triploide yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. Az sayıda normal kromozom bulundurlar. N8 ve N15 kromozomlarına sahip değildir. Bahsedilen kromozomlar sitogenetik analizler boyutunda markır olarak kullanılmaktadır. Karyotip analizler, hücre populasyonlarının kromozom sayıları ve yapıları yönünden benzer olmadıklarını göstermiştir (Cimmino ve ark., 2005).

Meme kanseri hücrelerinin belli özelliklerini modelleyen bu hücre hattı *in vitro* şartlarda çalışılmak için oldukça uygundur. Normal meme hücrelerinin gösterdiği özellikler ER negatif olan MDA-MB231 hücrelerinde yoktur. MDA-MB-231 hücrelerinde bahsedilen bu değişimler, tümörün ilerlemesi, kanserin yayılması ve apoptoza direnç kazanmasıyla alakalıdır (Cimmino ve ark., 2005).

TNBC kısıtlı tedavi olanağı nedeniyle agresif bir meme kanseridir. Bu meme kanserinin esas moleküler temelini anlamak, yüksek metastatik özelliği olan MDA-MB-231 hücre dizisi ile yapılan çalışmaların gelişebilmesi için büyük öneme sahiptir (Esen, 2009).

2.8. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsündeki farklı evrelerin bir düzen içerisinde ilerlemesi ve gerektiğinde döngünün durdurulması için G1/S, S/G2 ve G2/M fazları arasındaki geçişler kontrol noktaları olarak görevlidir.

G1 kontrol noktasında hasarlı DNA'nın S evresine girmeden onarılması sağlanır. Hücre döngüsünün devam etmesi için uygun büyüme faktörleri bulunmuyorsa hücre G0 evresine girer. Bu evre de hücre büyümesi durur ve bölünmeden yaşamına devam eder. Hücre dışı sinyallerle uyarıldıklarında ise hücre bölünme döngüsüne devam eder. DNA'daki hataların düzeltilemeyeceği durumlarda ise hücre S evresine geçmeden apoptoza girmesi sağlanır. S kontrol noktasında DNA hasar kontrolü gerçekleşir. G2 kontrol noktasında DNA replikasyonu tamamlanmadan mitozun başlangıcına engel olur. M kontrol fazında ise mitozda kromozomların iç ipliklerine düzgün dizilimlerinin kontrolü sağlanır. Bu döngüde ve kontrol noktalarında görev alan siklinler, siklin-bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve CDK inhibitörleri (CDI'lar) arasındaki denge, hücre döngüsünün düzenlenmesini ve ilerlemesini sağlamaktadır (Geoffrey, Cooper ve Hausman, 2006).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Tez kapsamında yapılan deneylerin hepsi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Steril edilmiş olan malzemeler kullanıldı ve çalışma steril şartlarda yapıldı. Çalışmada MDA-MB-231 hücre hattı kullanıldı. Hücre hatları Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edildi.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan demirbaş ve sarf malzemelerin isimleri, markaları ve kodları listelenmiştir.

3.1.1. Kullanılan Demirbaş Malzemeler

- Laminar hava akışlı steril kabin (MN/120, Nüve)
- Karbondioksit İnkübatörü (NB-203XL,Biotek)
- Muse® Cell Analyzer (Guava, ABD)
- İnverted Mikroskop (CX31, Olympus)
- Santrifüj (Selecta, İspanya)
- Santifirüj (Sigma)
- Vortex Minishaker (IKA, MS1 S1)
- Mikroskop (Nikon, TS100)
- Rotary Evaporatör (Heidolph)

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Cell Culture Cluster 24'lü (Costar, 3524)
- Cell Culture Flask 25 cm² (Falcon, 137202)
- Cell Culture Flask 50 cm²
- Thoma Lamı (Hemositometri)
- Fetal Bovine Serum (Biowest, S181G-500)
- DMEM (Capricorn Scientific, CP21 -4310)

- Tripsin (SIGMA, SLCH8830)
- L-Glutamine (Capricorn Scientific, CP21-4183)
- Penisilin (SIGMA, 046M486V)
- Beher 100 ml
- Pipet 2-20 µl (Thermo Scientific, MH69348)
- Pipet 20-299 µl (Thermo Scientific, MH69787)
- Steril Pastör Pipeti
- Pipet ucu 200 µl (ISOLAB, L-002-R.2)
- Hassas Terazı (Radwag, WTS 3000)
- Spatül
- Spor
- Parafilm (Bemis, PM-996)
- 0,22 µm Enjektör Ucu Filtre (ISOLAB, 000H02092)
- 0,45 µm Enjektör Ucu Filtre (ISOLAB, 000H03235)
- Santifürüj tüpü (ISOLAB, CTPPN9015002)
- Santifürüj tüpü 15 mm (Citotest, 195477)
- Şırınga 5 ml (Ayset, 18559)
- Eldiven (Vasco, 9201131)

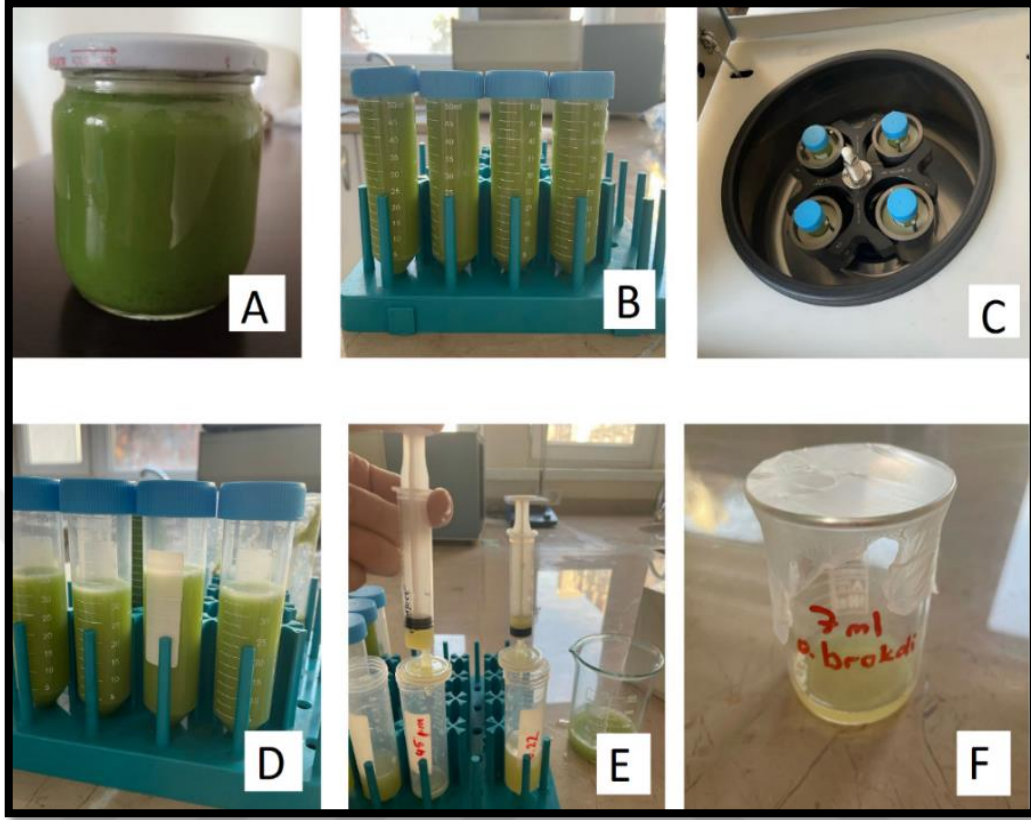
3.2. Ekstre Elde Edilmesi ve Hazırlanması

3.2.1. Olgun Brokoliden Ekstre Elde Edilmesi

Olgun brokoli bitkisi (3 adet) Kayseri’de yerel bir marketten temin edildi. Temin edildiği gün yıkanıp parçalara ayrıldıktan sonra katı meyve sıkacağına (Arçelik, K-1579, Çin) sıkılarak brokoli suyu elde edildi. Cam kavanoza alındıktan sonra Erciyes Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi ve +4 °C sabit sıcaklıkta bekletildi.

Örnekler 50 ml’lik santifürüj tüpüne aktarıldı. Santifürüj cihazında (Selecta, İspanya) 5000 rpm’de 4 kez 15 dakika santifürüj edilerek içeriğindeki posa uzaklaştırıldı. Elde edilen brokoli suyu içindeki makromolekülleri uzaklaştırmak için önce gözenek çapı 0,45 µm olan filtreden ve sonra gözenek çapı 0,22 µm olan filtreden geçirildi. Bu işlem sonucunda 28 ml brokoli ekstresi elde edildi ve beherlere 4 x 7 ml olacak şekilde bölündü.

Beherlerin yüzeyi parafilm ile kapatıldı (Şekil 3.1.). Ekstreler karanlıkta -20°C 'de saklandı.

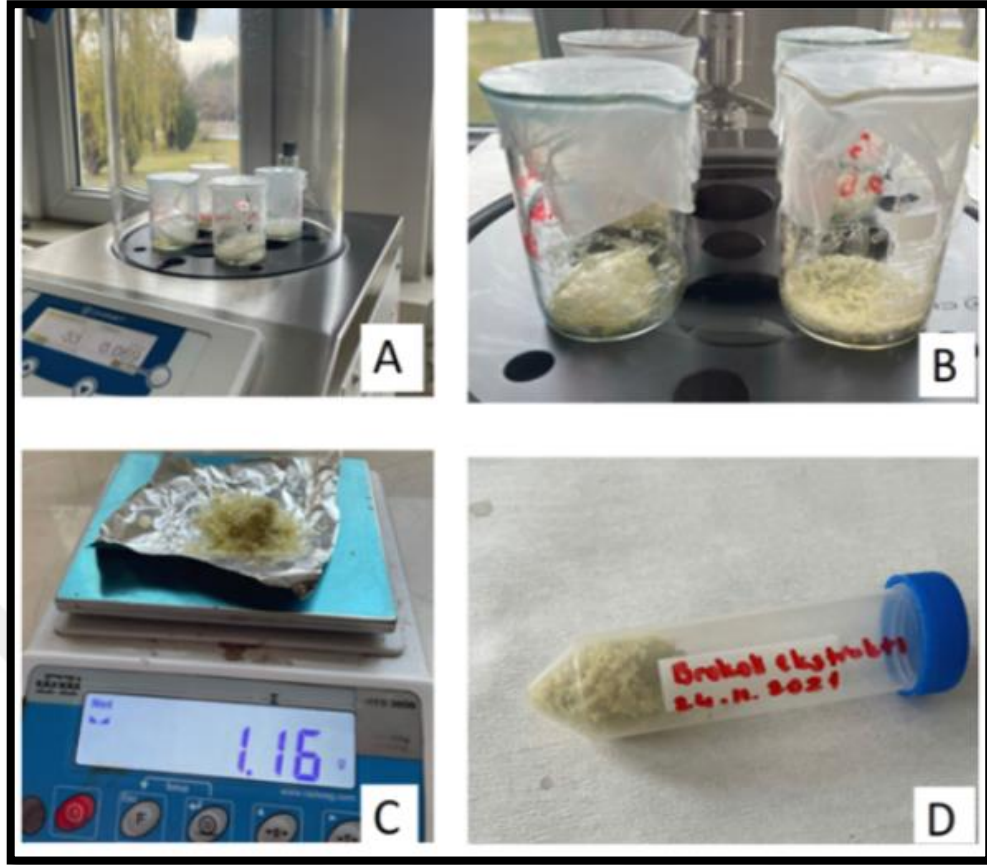


Şekil 3. 1. Brokoli ekstresinin elde edilmesi

(A) Brokoli suyu cam kavonoza alındı, (B) 4x50 ml santifürüt tüplerine alındı, (C) Santifürüt cihazına yerleştirildi, (D) Santirüt edildikten sonra süzöldü (E) 0,45 μm ve 0,22 μm membran filtreden geçirildi, (F) 28 ml brokoli ekstresi kullanılmak üzere beherlere alındı.

Ön işlemlerden geçirilerek -20°C de dondurulmuş örnekler kurutma işlemi için liyofilizatöre (CHRIST) yerleştirildi. Liyofilizasyon -50°C de, $>0,065$ mbar altındaki koşullarda gerçekleştirildi. İşlem 24 saat sürdü.

Toz haline gelen brokoliler beherden çıkarıldı ve alimünyum folyo üzerine alınarak hassas terazide (RADWAG) tartıldı. Brokoli suyundan toplam 1,16 g toz brokoli elde edildi (Şekil 3.2). Elde edilen ektstre analiz anına kadar -20°C de saklandı.



Şekil 3. 2. Liyofilizatörde dondurarak kurutma işlemi

(A) Beherler liyofilizatöre yerleştirildi, (B) Liyofilizatörde 24 saat sonraki görüntü, (C) 1,16 g brokoli ekstresi elde edildi, (D) Ekstre tüpe alınarak -20 °C de saklandı.

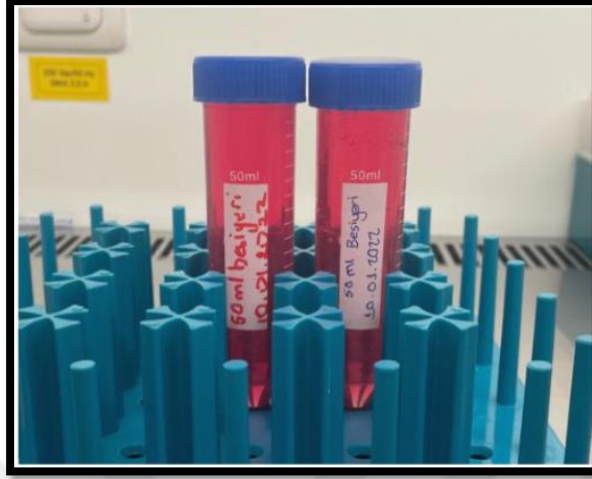
3.3. Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan kültür besiyeri (%15 fetal bovine serum, %84 Dulbecco's middle eagle medium ve %1 penisilin/streptomycin) kullanılarak hazırlandı (Tablo 3.1.).

Tablo 3. 1. Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ve miktarları

Hücre Kültür Besiyeri	Kullanılan Miktar
FBS (Fetal Sığır Serumu)	%15
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	%84
Penisilin / Streptomycin	%1

Besiyerini oluşturan tüm maddeler ayrı ayrı 0,22 μm membran filtrelerinden geçirilerek steril tüplere aktarıldı. Besiyeri kullanılana kadar buzdolabında (+4°C) bekletildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3. 3. 2 x 50 ml hazırlanmış besiyerleri

3.4. Hücre Sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında kültüre edilen hücre sayısının tahmini olarak da olsa bilinmesi gerekmektedir. Hücre sayısına göre hücrenin kültüre edileceği flaskların büyüklükleri belirlendi.

- Hücreler besi yerinde tek tek asılı lır hale gelene kadar pipetlendi.
- Hücreden belirli bir miktar alındı ve Trypan Blue ile boyandı.
- Boyanan hücreler Thoma laminının her iki tarafına 10 μL olarak eklendi (Şekil 3.4).



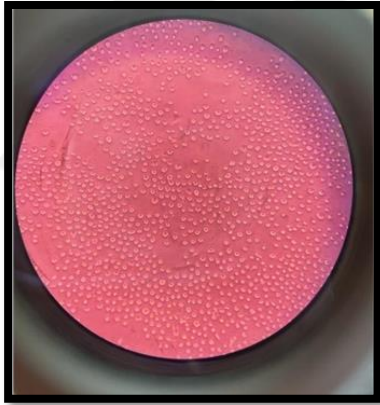
Şekil 3. 4. Thoma laminının Trypan Blue ile boyanması

- Mikroskop ile sayım yapıldı.

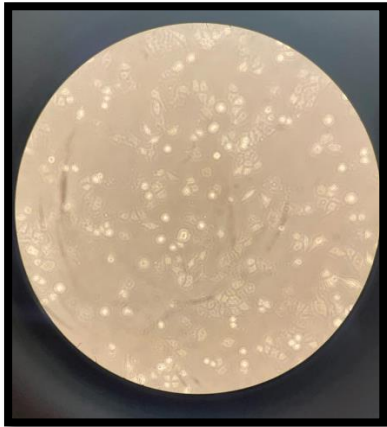
- Sayım yaparken parlayan hücreler canlı kabul edildi ve maviye boyanmış olanlar canlı değildi.
- Her iki taraftan elde edilen sonuçların ortalaması alındı.
- Canlı hücre sayısı (hücre/mL) = Ortalama hücre sayısı $\times 2 \times 10^4$ formülüne göre hesaplandı.

3.5. Hücrelerin Pasajlanması

Kültürde çoğalan hücreler besi ortamındaki besleyici ajanları büyük ölçüde tüketip flask içerisindeki hücre yoğunlukları %70'e ulaştıktan sonra çoğalma hızları düşmekte ve bir süre sonra durmaktadır. Şekil 3.5 ve 3.6'da hücrelerin ekim sırasında ve yüzeye tutunduktan sonraki görüntüleri gösterilmiştir. Hücrelerin mikroskoptaki görüntüsü görülmektedir. Bu dönemde hücrelere zarar verilmeden başka bir flaska transfer edilmeleri gerekmektedir. Bu işleme pasajlama denir. Pasajlama işleminin aşamaları şu şekildedir:



Şekil 3. 5. Hücrelerin ekim sırasında 40x objektifte mikroskoptaki görüntüsü



Şekil 3. 6. Yüzeye tutunan hücrelerin 40x objektifte mikroskop görüntüsü

- Besiyeri, FBS ve tripsin su banyosunda 37°C’de ısıtılır. d-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) oda sıcaklığında ısıtıldı.
- Hücreler CO₂ inkübatöründen alındı ve mikroskopta incelendi
- Flask dik konuma getirilerek hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet ucu değdirilmeden besiyeri yavaşça çekildi (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. Besiyerinin ortamdan çekilmesi

- Hücre tabakasına pipet ucu değdirilmeden flaskın alt köşesine d-PBS eklenerek yüzey yıkandı.
- Eklenen PBS’in flask yüzeyini kaplaması sağlandı ve PBS yavaşça çekildi.
- Ortama tripsin eklendi ve flask 4 dakika CO₂ inkübatöründe tutuldu.
- Mikroskop altında hücrelerin flask tabanından kalkarak serbestleşme durumu kontrol edildi.
- Hücreler serbest hale gelince flaska konulan tripsin miktarının 2 katı kadar medyum içindeki FBS ilave edildi ve hücreler santrifüj tüpüne aktarıldı.
- Hücreler 1500 rpm’de 5 dakika kadar santrifüj edildi. Süpernatant tek seferde uzaklaştırıldı.
- Hücre pelletini çözmek için falkona 10 mL besi yeri eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı ve sayıya göre 25, 50 ya da 75 cm² flasklara ekim yapıldı.
- Flask üzerine ait olan hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı.
- Hücreler mikroskopta incelendi.

- Flasklar CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.

3.6. Hücrelerin Dondurulması

- Hücre dondurma işlemi Cryoprotectan ile gerçekleştirildi.
- Cryoprotectan hazırlanırken, 3 birim Hidroksietil Starch ve 2 birim DMSO enjektör ile alınıp filitreden geçirildi
- Hücre içeren besi yeri $\frac{3}{4}$ oranında cryo tüpüne eklendi.
- Hazırlanan Cryoprotectan $\frac{1}{4}$ oranında cryo tüpüne eklendi.
- Her bir cryo tüpüne 150 μ l Cryoprotectant + 100 μ l DMSO + 750 μ l medyum içeren hücre = 1 ml (1000000 hücre için) kullanıldı.
- Hücreler 24 saat -80 °C’de bekletildi.
- Bu işlem ile 1 ml dondurma çözeltisi içinde 1000000 hücre saklandı.

3.7. Hücre Hattı Üzerinde Dozun Belirlenmesi

Daha önce yapılan çalışmalarda brokoli ekstresinin farklı çözücüler içinde çözülerek 0,25-2,5 mg/mL arasında değişen dozlarının kullanıldığı ve etkin dozun 2,5 mg/ml olduğu rapor edilmiştir (Paško ve ark., 2018). Buna bağlı olarak brokoli dozlarının belirlerken yapılan pilot çalışmaların sonuçları esas alındı. Yapılan pilot çalışmada 1-5 mg/ml dozlar için hesaplamalar yapılarak iki etkili doz olarak 1,25 mg/ml ve 2,5 mg/ml seçildi. Etkili dozlar aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$1 \text{ ml} \cdot 7,5 \text{ mg} = 10 \text{ mg} \cdot x \text{ ml} = 0,75 \text{ ml} = 0,75 \text{ ml} = 750 \mu\text{L}$$

Brokoli toz ekstreleri üzerine 1 ml besiyeri eklenerek vorteksle orta devirde homojenize edildi. MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde brokoli ekstresinin 2 farklı dozu (125 ve 250 μ g/ml) 2 farklı zaman süresinde (24 ve 48 saat) inkübasyon sonucunda değerlendirildi.

3.8. Deneysel Grupların Oluşturulması

In vitro inkübasyondan sonra Muse™ Analyzer Cihazı kullanılarak Annexin V ve Cell Cycle testleri yapıldı.

3.8.1. Annexin V Testi İçin:

Gruplar Tablo 3.2.’de gösterildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 3. 2. Annexin V Testi için oluşturulan deney grupları.

24 saat	Grup I (kontrol)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi
	Grup II (125 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi + 125 μ L brokoli ekstresi
	Grup III (250 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi + 250 μ L brokoli ekstresi
48 saat	Grup I (kontrol)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi
	Grup II (125 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi + 125 μ L brokoli ekstresi
	Grup III (250 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi + 250 μ L brokoli ekstresi

3.8.2. Cell-Cycle Testi İçin:

Gruplar Tablo 3.3.'de gösterildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 3. 3. Cell-Cycle Testi için oluşturulan deney grupları.

24 saat	Grup I (kontrol)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi
	Grup II (125 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 125 μ L brokoli ekstresi
	Grup III (250 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 250 μ L brokoli ekstresi
48 saat	Grup I (kontrol)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi
	Grup II (125 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 125 μ L brokoli ekstresi
	Grup III (250 μL/ml brokoli)	Besiyeri + 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 250 μ L brokoli ekstresi

3.9. Annexin V Testi

Muse Cell Analyzer cihazı ve Muse Annexin V Ölü Hücre kiti kullanılarak test yapıldı. Muse Annexin V ve Ölü hücre kiti, apoptotik hücrelerin dış membranındaki PS'yi belirlemek için kullandı. Bu test ile erken ve geç apoptotik fazdaki hücrelerin ve toplam apoptotik hücrelerin 24 ve 48 saatlik iki farklı periyot için yüzdeleri belirlendi. Hücrelerin kültüre edilmesi için her iki sürede de ayrı ayrı steril kültür kaplarının 6 kuyucuğu kullanıldı. Kültür kabının kapağına grupların isimleri yazıldı. Böylece gruplar doğru şekilde yerleştirildi (Şekil 3.8).



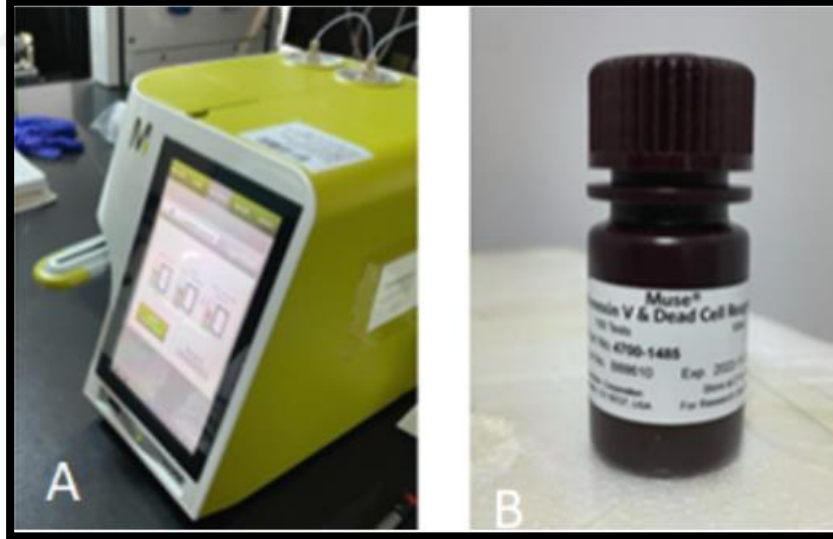
Şekil 3. 8. Hücre ve etken maddelerin 24'lü well plate ekilmesi

Her bir grup için üç kuyucuk ayrıldı. Tüm kuyucuklara 10.000 MDA-MB-231 hücresi ve üzerine 1 ml besiyeri ilave edildi. Grup I için kuyucuklara yalnızca besiyeri eklenirken Grup II ve Grup III için 1 ml besiyerine 125 ve 250 μ l/ml brokoli ekstresi eklenerek ekim yapıldı. Her kuyucuk ayrı ayrı tek kullanımlık pipet ucuyla pipetaj yapılarak hücre ve besiyerinin birbirine karışması sağlandı. Ekim yapıldıktan sonra kültür kapları 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Her kuyucuk için birer adet endorf tüpler (1,5 ml) alındı ve grupların isimleri kapaklarına yazıldı. 24 ve 48 saatlik sürelerle göre kültür kapları inkübatörden çıkarıldı. Kuyucuklar kendine ait olan tüplere aktarıldı.

Eş zamanlı olarak oda sıcaklığına gelmesi için Annexin V ölü hücre kiti buzdolabından çıkartıldı.

Kuyucukları boşaltılması sırasında kültür kabı 45 derecelik açıyla tutuldu ve hücrelerin çökme olasılığına karşı tüplere aktarıldı. Tüpler, santifürj cihazında oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüplere 1 ml steril DPBS eklendi ve tüpler vortekslendi. Tüplerin üst kısmında kalan supernatant uzaklaştırılmasının ardından herbirine 100 µl %1'lik Fetal Bovine Serum ve 100 µl Annexin V kit sıvısı eklendi. Tüpler vortekslenerek 20 dk karanlık ortamda bekletildi.

Bu süre zarfında Muse Cell Analyzer cihazının ön yıkaması yapılarak cihaz hazırlandı. Muse Cell Analyzer Cihazı ve Annexin ve ölü hücre kiti Şekil 3.9.'da gösterilmiştir. Yirminci dakikanın sonunda tüpler teker teker cihazın içerisine yerleştirilerek analiz yapıldı. Önce hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bölgeler belirlendi ve Grup I'den başlayarak örnekler okutuldu. Okutma işlemi sırasında cihaz temizleme uyarısı verdiğinde hızlı yıkama yaptırıldı. Sonuçlar kaydedildikten sonra kopyaları alındı. Aynı işlemler 24 ve 48 saat için tekrar yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.



Şekil 3. 9. (a) Muse Analyzer Cihazı, (b) Annexin V ölü hücre kiti

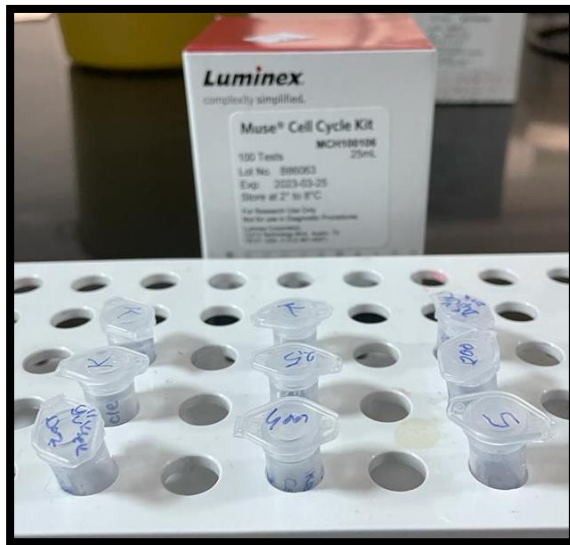
3.10. Hücre Döngüsü Testi

Muse hücre döngüsü kiti, tüm hücre döngüsü fazlarındaki (G_0/G_1 , S ve G_2/M) hücre yüzdelерinin ölçülmesi ve DNA içeriğinin propidyum iyodür bazlı boyaması amacıyla göre kullanıldı.

Muse Cell Analyzer cihazı ve Muse Cell Cycle kiti kullanılarak analiz yapıldı. Hücre döngüsünün G_0/G_1 , S ve G_2/M fazlarındaki hücre yüzdesinin kolay ve hızlı ölçümlerinin yapılması sağlandı. Test için gereken 70 ml alkol, 30 ml distile su oranına göre %70'lik etil alkol hazırlandı ve -20°C de muhafaza edildi.

Hücrelerin kültüre edilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kaplarının 24 ve 48 saatlik periyotlar için 6 kuyucuk kullanıldı. Kültür kabının kapağına grupların isimleri yazıldı ve hangi grubun nereye yerleştirileceğinin belirlenmesi sağlandı. Her bir gruba kontrol ve iki doz için 3 kuyucuk ayrıldı. Her kuyucuğa 1.000.000 MDA-MB-231 hücresi ve 1 ml besiyeri eklendi. Grup I için kuyucuklara yalnızca besiyeri eklenirken Grup II ve Grup III için 1 ml besiyeri içine 125 ve 250 $\mu\text{l/ml}$ brokoli ekstresi eklenerek ekimler yapıldı. Her kuyucuk için ayrı ayrı steril pipet ucu kullanıldı. Pipetaj yapılarak hücre ve besiyerinin karışması sağlandı. Yapılan tüm işlemler steril malzemelerle güvenlik kabini içinde gerçekleştirildi. Kültür kapları 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Sonrasında her kuyucuk için birer adet 1,5 ml'lik standart ependorf tüp alınarak kapaklarına grup isimleri yazıldı. 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucukları pipet kullanılarak kendisine ait olan ependorf tüplerine aktarıldı.

Kültür kabı hafif eğimli bir açıyla tutularak kuyucuklar boşaltıldı ve hücrelerin çökmemesi için sıvı pipetlenerek alındı. Daha sonra kapaklarına grup isimlerinin yazıldığı ependorf tüplere aktarıldı. (Şekil 3.10). Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra santifürij cihazına alınarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından tüplere 1 ml steril DPBS eklendi ve vortekslenerek tekrar 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerinde kalan supernatant uzaklaştırıldı ve hepsine 50 μl DPBS eklendi.



Şekil 3. 10. Ependorflara Muse Hücre Döngüsü Kiti eklenmek üzere hazırlanması

1 ml %70'lik etanol eklendikten sonra tüpler kapatılarak bekletmeden vortekslendi. Tüpler üzeri örtülerek -20°C'de bir gece bekletildi.

Ertesi gün tüpler vortekslendikten sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üzerinde kalan supernatant mikropipet ile uzaklaştırıldı ve her birine 200 µl Muse hücre döngüsü kiti eklendi. Tekrar vorteksleme işlemi yapıldı ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık bir çekmeceye kaldırıldı. Bu bekleme sırasında cihazın standart solüsyonlarla ön yıkaması yapıldı. 30 dakika sonra tüpler tek tek cihaza yerleştirildi ve sonuçları okuması sağlandı. İlk örnek okutulurken hücrelerin yoğun olduğu bölge seçilerek analizin bu bölgeden yapılması sağlandı (Şekil 3.11). Cihaz okuma işlemleri sırasında uyarı verdiğinde hızlı yıkama yaptırıldı. Tüm sonuçlar okutularak kaydedildi ve sonuçlar kopyalandı. Aynı işlem 48 saatlik periyot bitiminde tekrarlandı.



Şekil 3. 11. Muse Cell Analyzer cihazında sonuçların okunması.

3.11. İstatistiksel Analizler

Çalışmadaki verilerin normallik dağılımı ShapiroWilk's test istatistiği, histogram, q-q grafiği ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey kullanıldı. Her bir grup için, 24 saat ve 48 saat ölçümler arasındaki farklılıklar paired t testi uygulandı. p#; Tek yönlü varyans analizi, P*; Paired t testi temsil etmektedir. Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin

aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını, farklı olan harf istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart hata şeklinde verilmiştir. Verilerin analizi TURCOSA (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında analiz edilmiştir.



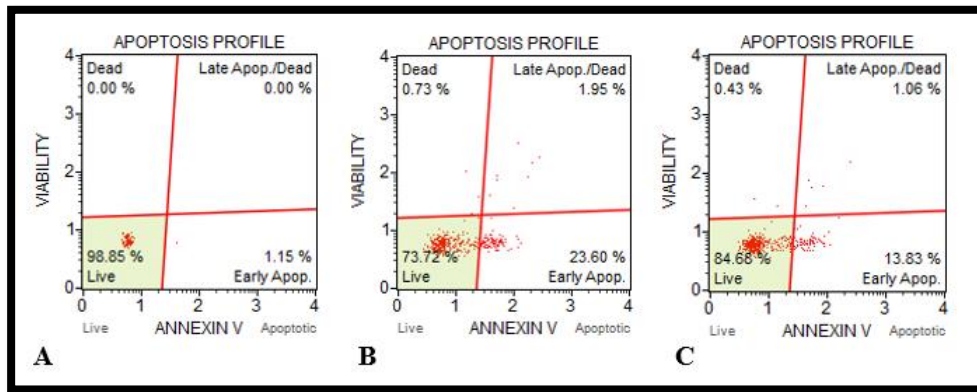
4.BULGULAR

Farklı dozlarda brokoli ekstraktlarının MDA-MB-231 hücrelerine etkisi çeşitli parametrelere göre değerlendirildi. 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilen hücrelerde apoptoza ve hücre döngüsüne yönelik parametreler ölçüldü. Annexin V & Cell Kit ve Cell Cycle Kit kullanılarak Muse® Cell Analyzer cihazında okutuldu.

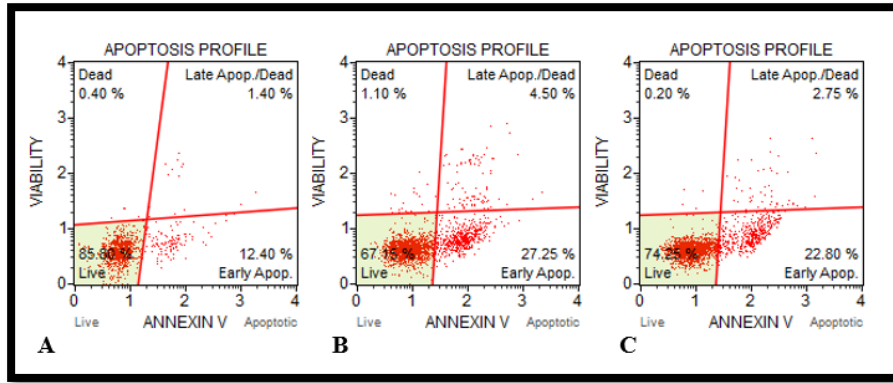
4.1. Annexin V Deneyi ve Sonuçları

Annexin V & Ölü Hücre Kiti hücre örneklerindeki canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve total apoptotik hücrelerin yüzdelik oranlarını belirlemektedir. Bu oranlar gruplar arasında doza ve zamana bağlı olacak şekilde istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ölçümler sonunda Muse Cell Analyzer cihazından alınan esas veri grafikleri kullanıldı.

Cihazdan elde edilen grafiklerde yatay ve dikey eksenlerin kesişmesiyle bölmeler oluşturuldu ve hücre popülasyonları bu bölmelerde sol üstte ölü hücreler, sağ üstte geç apoptoza giren hücreler, sol altta canlı hücreler, sağ altta erken apoptoza giren hücreler olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Tablo 4.1- 4.4’de veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. 24 saatlik ve 48 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.’ de görülmektedir.



Şekil 4. 1. 24 saatlik apoptoz oranlarının gruplara göre Muse Cell Analyzer cihazında veri grafikleri. **A.** Grup I (Kontrol grubu) **B.** Grup II (125 µL brokoli ekstresi), **C.** Grup III (250 µL brokoli ekstresi)



Şekil 4. 2. 48 saatlik apoptoz oranlarının gruplara göre Muse Cell Analyzer cihazında veri grafikleri. **A.**Grup I (Kontrol grubu), **B.** Grup II (125 µl brokoli ekstresi), **C.** Grup III (250 µl brokoli ekstresi)

4.1.1 Canlı Hücre Sayısı

Canlı hücreye ilişkin sonuçlar, gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde hem kontrode hem de Grup III’de istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p < 0,05$), Grup II’de anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

Gruplar 24. ve 48. saat için doza bağlı olarak değerlendirildiğinde anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). Çoklu karşılaştırma testine göre canlı hücre sayısı 24 ve 48 saat ölçümlerinde kontrol grubu, Grup II ve Grup III arasında olası ikili karşılaştırmalar arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p < 0,001$) (Tablo 4.1.). Canlı hücre sayısındaki azalma en belirgin 125 µL/ml brokoli grubu olmuştur.

Tablo 4. 1. Annexin V& Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda canlı hücre yüzdeleri.

Canlı Hücre	Grup I (kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml brokoli)	Grup III (250 µl/ml brokoli)	$p^{\#}$ değeri
24 saat	98,85±0,30 ^a	73,72±3,72 ^b	84,68±5,43 ^c	0,001
48 saat	85,80±0,80 ^a	67,15±1,95 ^b	74,25±3,57 ^c	<0,001
p^*	0,002	0,183	0,010	

p#; Tek yönlü varyans analizi, p*; Paired t testi

4.1.2 Erken Apoptotik Hücre

Erken apoptotik hücreye ilişkin sonuçlarda gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde erken apoptik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

24. ve 48. saatlerde doza bağlı olarak erken apoptik hücre sayısı değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Kontrol grubuna kıyasla Grup II ve Grup III'de erken apoptotik hücre yüzdesinin arttığı görüldü. Çoklu karşılaştırma testine göre apoptotik hücre sayısı 24 saat için Grup I, Grup II ve Grup III arasında olası ikili karşılaştırmalar arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.2). Bu sonuçlara göre erken apoptoz artışında en belirgin grup 24 saatlik 125 µL/ml brokoli grubu olmuştur.

Tablo 4. 2. Annexin V& Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda erken apoptotik hücre yüzdeleri.

Erken Apoptotik Hücre	Grup I (kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml brokoli)	Grup III (250 µl/ml brokoli)	<i>p* değeri</i>
24 saat	1,15±0,60 ^a	23,6±0,30 ^b	13,83±1,42 ^c	<0,001
48 saat	12,4±6,60 ^a	27,25±1,90 ^b	22,8±4,05 ^b	0,019
<i>p[#]</i>	0,083	0,058	0,105	

p[#]; Tek yönlü varyans analizi, *p**; Paired t testi

4.1.3. Geç Apoptotik Hücre

Geç apoptotik hücre yüzdesine ilişkin sonuçlarda gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde kontrol ve grup II için istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,05$), Grup III için anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.3.)

Gruplar doza bağlı olarak geç apoptik hücre sayısı için değerlendirildiğinde 24. saatte anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,05$), 48. saatte anlamlı bir farklılık bulunmadı

($p>0,05$). Çoklu karşılaştırma testine göre geç apoptotik hücre sayısı 24. saat ölçümü kontrol grubunda Grup II'ye göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4. 3. Annexin V& Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda geç apoptotik hücre yüzdeleri

Geç Apoptotik Hücre	Grup I (Kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml brokoli)	Grup III (250 µl/ml brokoli)	$p^{\#}$ değeri
24 saat	0,0±0,0 ^a	1,95±0,05 ^b	1,06±0,98 ^{ab}	0,016
48 saat	1,40±0,25	4,50±0,85	2,75±2,0	0,063
p^*	0,010	0,031	0,430	

$p^{\#}$; Tek yönlü varyans analizi, p^* ; Paired t testi

4.1.4. Toplam Apoptotik Hücre

Gruplar içinde doza bağlı olarak toplam apoptik hücre sayısı değerlendirildiğinde 24. ve 48. saatlerde anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,05$).

Gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde toplam apoptik hücre sayısında kontrol grubunda anlamlı bir farklılık bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplarda anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$). Çoklu karşılaştırma testine göre hücre sayısı 24. ve 48. saat ölçümlerinde tüm gruplar arasında olası ikili karşılaştırmalar sonucunda anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,05$). Toplam apoptotik hücre artışında en belirgin grup 125 µl/ml brokoli grubu olmuştur (Tablo 4.4.).

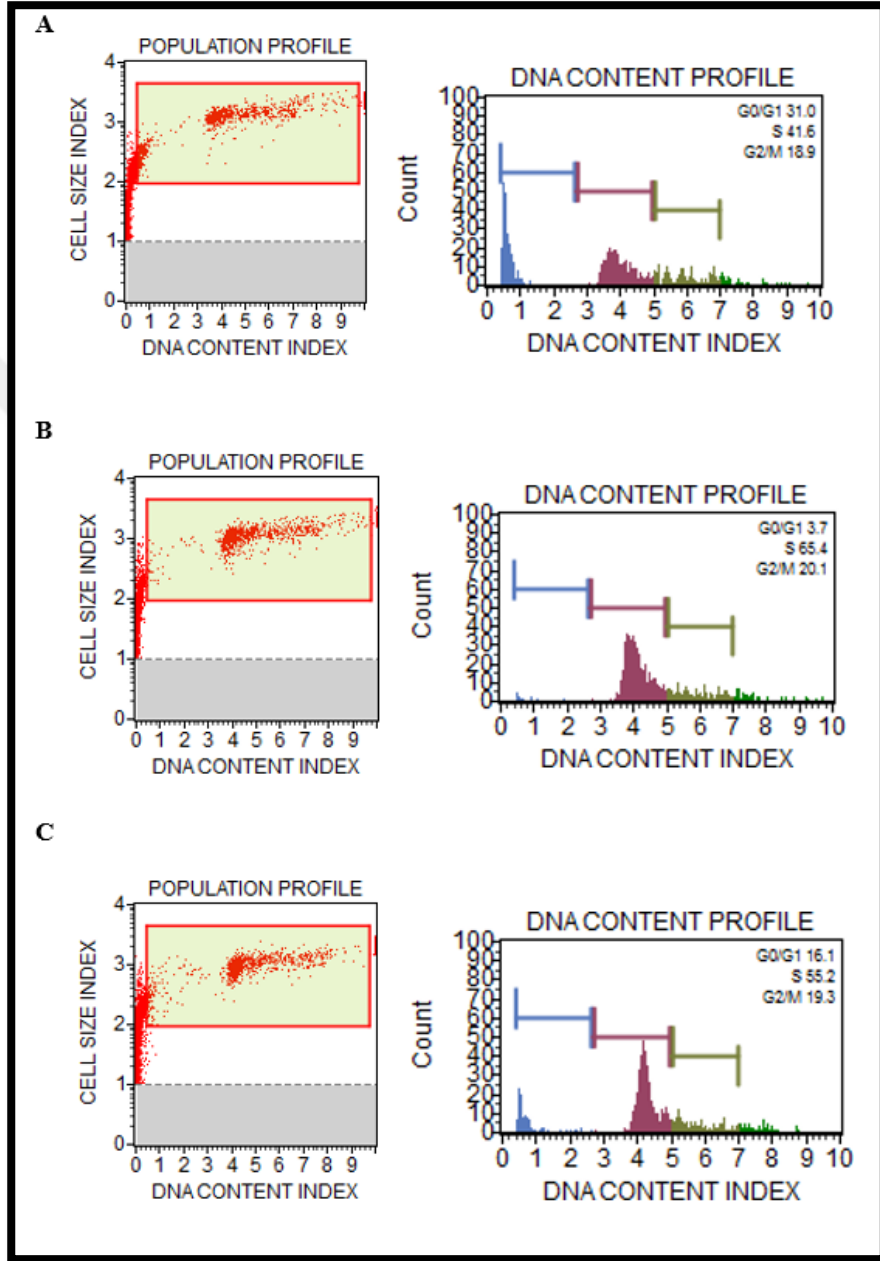
Tablo 4. 4. Annexin V& Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda toplam apoptotik hücre yüzdeleri

Toplam Apoptotik Hücre	Grup I (kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml brokoli)	Grup III (250 µl/ml brokoli)	p^* değeri
24 saat	1,15±0,05 ^a	25,55±2,65 ^b	14,89±3,89 ^c	<0,001
48 saat	13,8±1,05 ^a	31,75±3,66 ^b	25,55±4,61 ^c	0,002
$p^{\#}$	0,003	0,231	0,162	

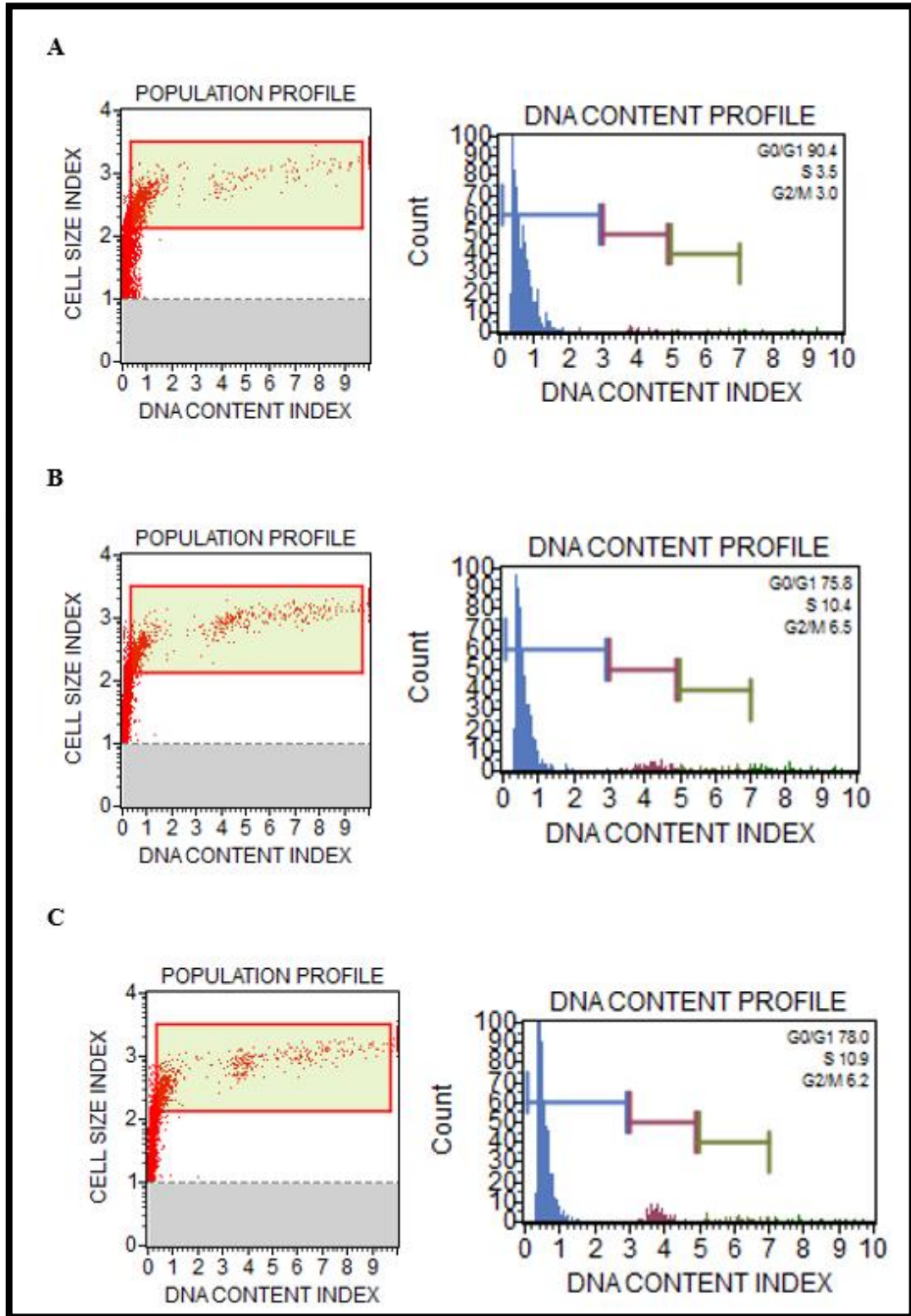
$p^{\#}$; Tek yönlü varyans analizi, p^* ; Paired t testi

4.2. Cell Cycle Deneyi Sonuçları

MDA-MB-231 hücresinin brokolinin artan dozlarına göre hücre döngüsü evrelerinin yüzde dağılımı 24 ve 48 saatlik sonuçlara ait grafiksel veriler Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de görülmektedir.



Şekil 4. 3. 24 saatlik hücre döngüsü evrelerinin gruplara göre yüzde dağılım oranlarının Muse Cell Analyzer cihazında okutulan veri grafikleri. **A.** Grup I (Kontrol grubu) **B.** Grup II (125 µL brokoli ekstresi), **C.** Grup III (250 µL brokoli ekstresi)



Şekil 4. 4. 48 saatlik hücre döngüsü evrelerinin gruplara göre yüzde dağılım oranlarının Muse Cell Analyzer cihazında okutulan veri grafikleri. **A.** Grup I (Kontrol grubu) **B.** Grup II (125 µL brokoli ekstresi), **C.** Grup III (250 µL brokoli ekstresi)

4.2.1. G₀/G₁ Evresi Sonuçları

24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde G₀/G₁ evresindeki hücrelerin oranlarının kontrole göre Grup II ve Grup III'de daha düşük olduğu ($p < 0,05$), 48 saatlik sonuçlarda ise anlamlı farklılık bulunmadığı ($p > 0,05$) görüldü. Gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde G₀/G₁ evresinde bütün gruplarda anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 4.5.). Çoklu karşılaştırma testine göre hücre sayısı 24. saat ölçümlerinde tüm gruplar arasında olası ikili karşılaştırmalar sonucunda anlamlı farklılıklar bulundu ($p < 0,05$).

Tablo 4. 5. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak G₀/G₁ evresindeki değişim oranları

G ₀ /G ₁ Evresi	Grup I (kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml brokoli)	Grup III (250 µl/ml brokoli)	p* değeri
24 saat	31,00±5,40 ^a	3,70±0,90 ^b	16,17±12,32 ^c	<0,001
48 saat	90,40±4,50	75,76±1,15	78,00±10,90	0,079
p [#]	0,009	<0,001	0,004	

p[#]; Tek yönlü varyans analizi, p*; Paired t testi

4.2.2. S Evresi Sonuçları

S evresinde 24. saat ve 48. saat hücre döngüsü değerlendirilmesinde gruplar içinde doza bağlı anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,05$).

Gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde S evresinde bütün gruplarda anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,05$). Çoklu karşılaştırma testine göre S evresi 24. ve 48. saat hücre ölçümünde tüm gruplar arasında olası ikili karşılaştırmalar anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4. 6. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak S evresindeki değişim oranları

S Evresi	Grup I (kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml)	Grup III (250 µl/ml)	<i>p* değeri</i>
24 saat	41,60±4,80 ^a	65,40±0,70 ^b	55,20±5,80 ^c	0,002
48 saat	3,50±0,30 ^a	10,40±1,40 ^b	10,90±3,20 ^c	0,007
<i>p[#]</i>	0,006	<0,001	0,013	

p[#]; Tek yönlü varyans analizi, *p**; Paired t testi

4.2.3. G₂/M Evresi Sonuçları

24 saatlik ve 48 saatlik hücre döngüsü değerlendirilmesinde gruplar içinde doza bağlı anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). (Tablo 4.7.). Gruplar kendi içlerinde süreye bağlı olarak değerlendirildiğinde G₂/M evresinde bütün gruplarda anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4. 7. Kültüre edilen MDA-MB-231 hücrelerinin zamana bağlı olarak G₂/M evresindeki değişim oranları

G ₂ /M Evresi	Grup I (Kontrol grubu)	Grup II (125 µl/ml)	Grup III (250 µl/ml)	<i>p* değeri</i>
24 saat	18,90±3,90	20,10±4,10	19,30±6,70	0,955
48 saat	3,00±1,20	6,50±2,40	6,20±2,80	0,215
<i>p[#]</i>	0,033	0,005	0,028	

p[#]; Tek yönlü varyans analizi, *p**; Paired t testi

5.TARTIŞMA

Kanser genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan ve hücrelerin kontrolsüz bölünerek çoğalması ile ortaya çıkan ölümcül bir hastalıktır. Kanser tedavisi için olabildiğince standart protokoller geliştirilse de herkesin DNA'sı farklı olduğu için benzer tedavilere farklı cevaplar verilmektedir. Günümüzde kanserin tedavisinde kullanılan cerrahi, radyoterapi, hormon terapisi, kemoterapi ve immünoterapi gibi yöntemlerin ciddi yan etkileri görülmektedir. Bu nedenle doğal kaynaklardan güvenli ve güçlü antikanser bileşenlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Baykara, 2016).

Epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebzelerden zengin bir diyetin akciğer, yemek borusu, gırtlak, pankreas, kolorektal, mide ve prostat kanserlerinin yanı sıra meme kanseri riskini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Ullah ve ark., 2014; Abuajah, Ogbonna ve Osuji, 2015). *Brassicaceae* familyasından sebzeler, zengin bir kemopreventif madde kaynağıdır. Bu sebzelerde bulunan fitokimyasal bileşiklerin ve bunların öncülerinin meme kanseri de dâhil olmak üzere kanser geliştirme riskini azalttığı gösterilmiştir (Ambrosone ve ark., 2014).

Sulforafan, prokarsinojenleri karsinojenlere dönüştüren faz I enzimlerini baskılamaktadır. Ayrıca faz II enzimlerini uyarması, karsinojenlerin detoksifiye edilmesi ve vücuttan atımına yardımcı olduğu için kanseri başlangıç aşamasında bloke edebilme ve kanser başladığında hücre döngüsünü durdurarak ya da apoptozisi uyarak kanserin ilerlemesini baskılayabilmektedir (Koçyiğit ve ark., 2019).

Brokoli/brokoli filizlerinden elde edilen doğal bir bileşik olan sülforafanın kansere karşı etkinliği çeşitli kanserlerde değerlendirilmiştir. SFN, brokoli ve diğer turpgillerden elde edilen sebzelerden izole edilmiştir. Antioksidasyon ve detoksifikasyon reaksiyonlarına katılmasının yanı sıra melanom gibi birçok kanser türünde antikanser rol oynadığı açıklanmıştır (Fimognari ve Hrelia, 2007; Hamsa ve Kuttan, 2011; López-Chillón ve ark., 2019). AKT fosforilasyonunu azaltarak hücre canlılığını inhibe etmiştir ve kaspaz 3 ve 9, p53 gibi bazı genlerin aktivasyonu yoluyla apoptozu indüklemiştir (Choi ve Singh, 2005; Hamsa ve ark., 2011 ; López-Chillón ve ark., 2019). Sulforafan oral veya

intraperitoneal uygulaması, prostat PC-3 ve pankreas Panc-1 ksenograftlarında tümör büyümesini inhibe etmiştir (Pham ve ark., 2004). Premenopozal meme kanseri riskinin brokoli tüketimi ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Ambrosone ve ark., 2004). Ağızdan verilen sülforafan meme bezine ulaşmış ve detoksifikasyon enzim aktivitesini artırmıştır (Cornblatt ve ark., 2007). NF- κ B ile indüklenen anti-apoptotik sinyallemeye müdahale ederek sülforafanın TNF-ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL)'a karşı pankreas tümör direncini ortadan kaldırmadaki etkinliğini göstermiştir (Myzak ve Dashwood, 2006; Kallifatidis ve ark., 2009). Başka bir çalışma, sülforafanın doksorubisin direncinin üstesinden gelebileceğini ve hücrelerde apoptoz indüksiyonunu geri yükleyebileceğini göstermiştir (Fimognari, Sangiorgi, Capponcelli, Nüsse ve Fontanesi, 2005). Bu bulgular, klinik deneylerde sülforafan, brokoli ve brokoli filizlerinin kemoprevensiyon özelliğini araştırmak için güçlü bir gerekçe sağlar.

Licznarska ve ark. (2015), MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının 5 ve 20 μ M SFN konsantrasyonlarında 72 saat muamelesi sonucu apoptozu indüklediğini göstermiştir (Licznarska, Szaefer, Matuszak, Murias ve Baer-Dubowska, 2015).

Lewinsa ve ark. (2017), meme kanseri hücrelerinin (MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3) düşük dozlarda sülforafanla (5-10 μ M) uyarılmasının hücre döngüsünü durdurduğunu, p21 ve p27 seviyelerini yükselttiğini ve hücre yaşlanmayı desteklediğini, 20 μ M'lik konsantrasyonda apoptozu indüklediğini göstermiştir (Lewinska, Adamczyk-Grochala, Dereowska ve Wnuk, 2017).

Licznarska ve ark. (2021)'nin yaptığı bir diğer çalışmada, R-SFN'nin meme hücre hatlarında AhR, Nrf2 ve Er α , NQO1'in faz II enzim indüksiyonu ve ekspresyonu üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. NQO1'in R-SFN tarafından indüksiyonu meme karsinogenezinin erken aşamasını temsil eden tümörjenik olmayan hücrelerde ve kısmen MCF7 hücrelerinde, R-SFN kanserin başlamasına ve ilerlemesine karşı koruma sağlarken, MDA-MB-231'de belirli kemoterapötiklerle tedaviyi destekleyebileceği bulunmuştur (Licznarska, Szaefer ve Krajka-Kuźniak, 2021).

Yapılan başka bir çalışmada ise MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 ve T47D meme kanseri hücre dizilerinde hücre büyümesi ve apoptoz üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir ve sülforafanın bu hücre dizilerinde bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olarak görev yaptığı hipotezi incelenmiştir. Çalışma sonucunda hücre büyümesini inhibe etmiş, apoptozu aktive etmiştir. Ayrıca HDAC aktivitesini de inhibe

etmiştir. Meme kanseri proliferasyonunda rol oynayan anahtar proteinlerin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu sonuçlar, sülforafanın in vivo test edilmesini desteklemekte ve insan meme kanserinde sülforafanın klinik potansiyelini inceleyen gelecekteki çalışmaları garanti etmektedir (Pledge-Tracy, Sobolewski ve Davidson, 2007).

Son yapılan çalışmalardan biri, 5, 25 ve 100 μM ITC'nin in vitro olarak MCF-7 hücrelerinde DNA hasarını ve onarımla ilişkili proteinleri değiştirme yoluyla sitotoksik etkilere (canlı hücre sayısında azalma) neden olduğu göstermiştir (Pledge-Tracy, Sobolewski ve Davidson, 2007).

Pasko ve ark. (2018), brokoli filizlerinin ve çiçeklerinin apoptotik etkisini karşılaştırdığı çalışmada, brokoli (5 g) ekstralarını dondurarak kurutma yöntemiyle elde ederek toz brokoliyi DMSO içinde çözmüştür. BJ, SW480, HepG2 hücrelerinde 0,25, 1 ve 2,5 mg/ml brokoli 24 saat boyunca inkübe edilmiştir ve Annexin V testi uygulanmıştır. Filizlerin çiçeklere kıyasla daha etkili olduğu ve 2,5 mg/ml brokoli dozunun kolorektal kanser hücreleri üzerine apoptoza etkisi anlamlı bulunmuştur (Paško ve ark., 2018).

MDA-MB-231 hücresine karşı apoptotik etkileri incelenecek olan brokoli toz ekstralarının dozları Pasko ve ark. yaptığı çalışma referans alınarak yapılan pilot çalışmaya göre belirlendi. Literatür değerlendirmesi yapıldığında hücre kültürü çalışmalarında brokolinin etken maddesi olan SFN, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak tayin edilmiştir. Ancak bu çalışmada ekipman eksikliğinden kaynaklı SFN tayin edilememiştir. Brokoli ekstraları kurutulmuş toz haline getirilmiş ve besiyeri içinde çözülerek hücrelere verilmiştir. Bu nedenle elde edilen sonucun başta SFN olmak üzere brokoli içindeki biyoaktif bileşenlerden kaynaklandığını düşünülmektedir. Saf SFN'nin temel beslenmede kullanılamayacağı için bu etkinin turpgillerden doğal yolla takviye edilerek sağlanması gerektiği düşünülmektedir.

Gökay (2019)'ın, SFN'nin böbrek adenokarsinom kökenli 769-P ve böbrek epitel 293T hücre hatlarında 6 farklı konsantrasyonun apoptotik etkisini belirleyebilmek için 769-P ve 293T hücre hatlarına Annexin V yöntemi uygulayarak analiz yapmıştır. Bu sonuçlar, apoptoz için önemli bir marker olan erken apoptotik yanıtın 769-P hücrelerinde tüm SFN konsantrasyonlarında anlamlı olduğunu, 293T hücre hattında ise 25 μM ve 12,5 μM konsantrasyonlarında hem apoptotik hem de nekrotik yanıtı oluşturduğunu göstermiştir (Gökay, 2019).

Kanser hücre hatlarında birçok bitkisel ekstrenin etkisi araştırılmaktadır. Bu gibi çalışmalarda Annexin V analizi sonucunda toplam apoptotik hücre yüzdelерinin arttığı gösterilmiştir (R. Bogнар, Fekete ve Z. Bogнар, 2018; Kim, You ve Lee, 2018; Lin, Hsieh ve Yeh, 2018). Bu çalışmada MDA-MB-231 hücreleri 24 ve 48 saat 37⁰C’de ve %5 CO₂’li ortamda kültüre edildi ve apoptoz yüzdelерini belirlemek için Annexin V ve hücre döngüsü testi kullanılarak elde edilen parametreler değerlendirildi. 24 ve 48 saat sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki apoptoz yüzdesinin arttığı ve canlı hücre yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu (Tablo 4.1) (p<0,05).

Brokoli ile kültüre edilen MDA-MB-231 hücre hattında % toplam apoptoz oranında kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlemlendi. Ancak artış zamana bağımlı olarak anlamlı değildi. Erken apoptoz oranı yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda anlamlı olarak artmıştı. Ancak zamana bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı. Geç apoptotik yanıtlar 24.saat kontrol grubunda en düşüktü (Tablo 4.3) (p<0,05).

Canlılık ve erken apoptotik yanıt birbirlerine zıttı ve canlı hücrenin azalmasıyla erken apoptotik hücre sayısında bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, MDA-MB-231 hücrelerinde apoptoz için önemli olan erken apoptotik yanıtın en belirgin olarak 24.saat 125 µl/ml brokoli ekstresi içeren gruptaydı (Tablo 4.2).

Hücre döngüsündeki fazların durdurulması kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilir. Bu bazı fitokimyasal ürünler tarafından gerçekleştirerek anlamlı sonuçlar bulunmuştur (Lin ve ark., 2018).

Steven ve ark. (2004)’nın, sulforafanın BALB/c fare böbrek kanseri hücrelerine in vivo ve in vitro olarak etkilerinin araştırdıkları çalışmada, hücre döngüsü testinde 15 µM sulforafanın 24 saatte G₂M (profaza/prometafaz) erken fazında hücre döngüsünü inhibe ettiğini göstermiştir (Jackson ve Singletary, 2004).

Cheng ve ark. (2019), tarafından yapılan, ZR-75-1 hücrelerinin 24-72 saat boyunca farklı SFN konsantrasyonları (0, 6,25, 12,5 ve 25 µ M) ile muamele edildiği in vitro çalışmada, 24 saat sonra SFN’ın, G1 fazı hücre popülasyonunda artışa yol açtığını bunun da ZR-75-1 hücrelerinin G1/S fazı kontrol noktasında bir gecikmeye maruz kaldığı gösterilmiştir. Bu sonuç, SFN’ın G1/S fazındaki hücre popülasyonlarını artırırken, S fazı popülasyonunu eşzamanlı olarak azalttığını göstermiştir (Cheng, Shen, Hung ve Hsu, 2019).

Rutz J. ve ark. (2018)'nın yaptığı çalışmada, 5 μ M SFN maruziyeti ile Caki-1 ve A498 hücrelerinde hücre döngüsünün S evresinde hücre sayısını artırdığı ve G₀/G₁ evresindeki hücre sayılarını ise azalttığı gözlenmiştir. Caki1 hücreleri 20 μ M SFN ile muamele edildiğinde hem S hem de G₂/M evresinde hücre sayısının arttığı gözlenmiştir (Rutz ve ark., 2018).

Osteosarkom hücreleri üzerinde yapılan deneyler, SFN'nin ≤ 10 μ M konsantrasyonlarında G₂/M evresinde etkili olurken, >10 μ M konsantrasyonlarında S evresinde etkili olmuştur (Liu ve ark., 2016).

Önceki çalışmalar, SFN'nin kanser hücresi apoptozunu ve hücre döngüsü durmasını indükleyebileceğini göstermişti (Jackson ve ark., 2004; Mao, Xiao ve Jiang, 2011; Liu ve ark., 2016; Rutz ve ark., 2018; Cheng ve ark., 2019). Mevcut çalışmada, 24. ve 48. saat sonuçları brokoli ekstresinin S fazında hücre sayısında istatistiksel olarak bir artış sağladı (Tablo 4.6) ($p < 0,05$). En belirgin artış ise S fazındaki hücre sayısında görüldü. Bu da brokoli ekstresinin etkin olarak kanser hücrelerini S fazında durdurabileceğini düşündürdü. Rutz ve ark. (2018)'nın ZR-75 insan meme kanseri hücrelerinde SFN'in hücre döngüsüne etkisi gözlemlendiği çalışmada S fazı ve G₂M fazında hücre sayısında artış gözlemlenmiştir (Rutz ve ark., 2018). Bu çalışmanın sonuçları mevcut çalışmayı desteklemektedir (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7)

G₀/G₁ fazında ise kontrol grubuna kıyasla brokoli ekstresi içeren gruplarda anlamlı bir azalma mevcuttu (Tablo 4.5) ($p < 0,05$). G₀/G₁ evresinde hücre sayısında görülen en belirgin azalma 125 μ l/ml brokoli ekstresi içeren grupta görülürken, S fazındaki hücre sayısında da en belirgin artış da 125 μ l/ml brokoli ekstresi gruplarında gözlemlendi. G₀/G₁ fazında, ana hücre döngüsü düzenleyicilerinden olan Siklin E ve Siklin Bağımlı Kinaz -2'nin G₁ fazından S kontrol noktasına hücre geçişini teşvik için birleşerek oluşturdukları kompleksin fonksiyonunun baskılanması ile hücreler G₁ ile S kontrol noktası geçişinde durdurulmaktadır (Mao ve ark., 2011). Buna dayanarak yapılan çalışmada, brokoli ekstresinin MDA-MB-231 hücrelerinde G₁ ile S kontrol noktası geçişinde hücre döngüsünü yavaşlattığı düşünülmüştür.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmalarda brokolinin karaciğer, mide, kolon, mesane, böbrek, meme ve prostat hücre hatlarında kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek antikanserojen bir madde olmaya aday besin olduğu görülmektedir (Boivin ve ark., 2009). Sunulan bu tez çalışmasında MDA-MB-231 hücreleri üzerine farklı dozlarda brokoli suyundan elde edilen toz brokoli ekstraktlarının etkileri çalışılmıştır.

Brokoli ekstresinin canlı hücre sayısında azalma sağladığı, erken ve toplam apoptozu anlamlı bir şekilde artırdığı ek olarak hücre döngüsünü G1 ila S kontrol noktasına geçişte yavaşlattığı görüldü (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6) ($p<0,05$).

Bu sonuçların apoptozla ilgili yapılan çalışmaların sonuçlarına benzerlik göstermesi brokolinin kanser hücreleri üzerinde apoptozu çeşitli mekanizmalarla artırdığını ve bu etkinin en belirgin 125 $\mu\text{L}/\text{ml}$ brokoli grubunda olduğu bulundu.

Çalışmadaki sınırlılıklar; brokolinin etken maddesi olan SFN elde edilemediği için brokoli suyu liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuş ve besiyeri içinde çözülerek hücreye verilmiştir. Bu nedenle diğer çalışmalardaki etkin dozlarla ilişkilendirilememiştir. Kullanılan brokolinin temin edilene kadar hangi koşullarda depolandığı bilinmemektedir.

Günlük tüketilen brokoli dozu ile yeterli etkiyi sağlayamayacağı için brokoli tohumlarının filizlendirilerek salatalara eklenmesi ve günlük beslenmede yer alması önerilebilir. Ayrıca brokoliye doğru depolama, hazırlama ve pişirme metotları uygulanmalı ve aktif bileşenlerin kaybı azaltılmalıdır. Uzun süreli depolama glukosinolatların yararlarını azaltabileceğinden 4-8°C'de 3 gün içerisinde tüketilmelidir. Glukosinolat içeren sebzelere hazırlık aşamasında uygulanan kesme, doğrama, dilimleme gibi işlemler izotiyosiyanatların miktarında artışa neden olacağı için kesme işleminden sonra 45 dakika bekletilmesi önerilmektedir. Glukosinolatların suda çözünür olmasıyla ilişkili olarak haşlama işlemi aktif bileşiklerin azalmasına neden olmaktadır. Brassica sebzelerinin taze olarak, kısa sürede ve buharda pişirme gibi suya maruz bırakılmadan aktif bileşiklerin kaybının azalması açısından önemlidir. Hardal tohumu tozu mirosinaz

enzimi içerdđđ için pişirme işleminden sonra brokoli üzerine hardal tohumu tozu ile yapılan soslar ilave ederek sulforafan oluşumunu artırabilir.

Yapılan tez çalışmasının brokolinin dñzenli ve doğru tñketiminin yaygınlaşmasının kanser oluşumu ve ilerlemesini yavaşlatmada etkili olacađđ ve bu çalışmanın kanser araştırmalarına katkıda bulunacađđ dñřñnñlmektedir. Uygun dozun belirlenebilmesi için insanlar ùzerinde de çalışmalar yapılması gerekmektedir.



7.KAYNAKLAR

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2522-2529.
- Akhlaghi M, Bandy B (2010) Dietary broccoli sprouts protect against myocardial oxidative damage and cell death during ischemia-reperfusion. *Plant Foods Hum Nutr* 65(3):193–199. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0182-4>
- Alarcón-Flores, M. I., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2013). Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141(2), 1120-1129.
- Ambrosone, C. B., McCann, S. E., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Zhang, Y., & Shields, P. G. (2004). Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *The Journal of nutrition*, 134(5), 1134-1138.
- Anonymous. (2018a). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, www.turkomp.gov.tr.
- Anonymous. (2018b). http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5517-5527.
- ASLIM, B. (2018). Üç Boyutlu Hücre Kültürü Modelleri ve Uygulamaları.
- Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., & Zayeri, F. (2019). Global Trend of Breast Cancer Mortality Rate: A 25-Year Study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 20(7), 2015–2020. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2015>
- Baenas, N., Gómez-Jodar, I., Moreno, D. A., García-Viguera, C., & Periago, P. M. (2017). Broccoli and radish sprouts are safe and rich in bioactive phytochemicals. *Postharvest Biology and Technology*, 127, 60-67.

- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Hosseinpanah, F., Rajab, A., Asghari, G., & Azizi, F. (2012). Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes research and clinical practice*, 96(3), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.01.009>
- Bassett, S. A., & Barnett, M. P. (2014). The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. *Nutrients*, 6(10), 4273-4301.
- BAYKARA, O. (2016). KANSER TEDAVİSİNDE GÜNCEL YAKLAŞIMLAR. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Bekki S. (2010) , Kekik Yağı, Yaban Meriği Suyu, Lahana Suyu Ve Brokoli Suyunun In Vitro Koşullarda Antibakteriyel Ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Bognar Z, Fekete K, Bognar R, et al. Amiodarone's major metabolite,
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., ... & Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112(2), 374-380.
- Braicu, C., Mehterov, N., Vladimirov, B., Sarafian, V., Nabavi, SM., Atanasov, A.G. ve Berindan-Neagoe, I. (2017). Nutrigenomics in 58 cancer: Revisiting the effects of natural compounds. *Semin Cancer Biol.*46: p. 84-106
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 27(1), 53-62.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe?. *Breast cancer research*, 5(2), 1-7.
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., & Henrissat, B. (2000). High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39385-39393.

- Cailleau, R, Olive, M, Cruciger, QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 1978. 14(11):911– 915.)
- Cartea, M.E. and Velasco, P. (2008) Glucosinolates in Brassica Foods: Bioavailability in Food and Significance for Human Health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 213-229.
- Chen, C., & Kong, A. N. T. (2005). Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends in pharmacological sciences*, 26(6), 318-326.
- Cheng, AC, Shen, CJ, Hung, CM ve Hsu, YC (2019). SERTAD1 ekspresyonunun sülforafan azalması, meme kanseri hücrelerinde G1/S tutuklanmasını tetikler. *Tıbbi gıda dergisi* , 22 (5), 444-450.
- Cheung, K.L. ve Kong, A.N. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J.* 12(1): p. 87-97.
- Choi, S. ve Singh, S.V. (2005). Bax and Bak are required for apoptosis induction by sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent. *Cancer Res.* 65(5): p. 2035-43.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, ... & Rassenti L (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39): 13944-13949
- Clarke, J. D., Dashwood, R. H., & Ho, E. (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer letters*, 269(2), 291-304
- Cornblatt, B. S., Ye, L., Dinkova-Kostova, A. T., Erb, M., Fahey, J. W., Singh, N. K., ... & Visvanathan, K. (2007). Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis*, 28(7), 1485-1490.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England journal of medicine*, 358(5), 502-511.
- Curado, M. P., Edwards, B., Shin, H. R., Storm, H., Ferlay, J., Heanue, M., & Boyle, P. (2007). *Cancer incidence in five continents, Volume IX*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer.

- ÇAKMAK, M., & GÜNDÜZ, M. (2019). Dimensions and Emerging Themes in Teaching Practicum Preface
- Çelik, F., & Köksal, G. (2013). Kanser ve Sülföröfan. Beslenme ve Diyet Dergisi, 41(3), 266-273.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., ... & Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7), 825-860.
- Dawood, S. (2010). Triple-negative breast cancer. Drugs, 70(17), 2247-2258
- desethylamidarone induces apoptosis in human cervical cancer cells. Canadian journal of physiology and pharmacology 2018; 96(10): 1004-1011.
- Ergün G. (1998). Farklı yöntemlerle polimerize edilen bazı akrilik rezinlerin biyolojik uyumlarının incelenmesi, Doktora tezi. Gazi Üniversitesi Dişhekimliği fakültesi, Ankara.
- Esen M., (2009) Farklı Meme Kanseri Hücre Tiplerinin (Mcf-7,Mda-Mb-231,Crl-4010) Organik Asit Profilinin İncelenmesi (Master's thesis, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.)
- Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(19), 10367- 10372.
- Fimognari, C. ve Hrelia, P. (2007). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. Mutat Res. 635(2-3): p. 90-104.
- Fimognari, C., Sangiorgi, L., Capponcelli, S., Nüsse, M. ve Fontanesi, S. (2005). A mutated p53 status did not prevent the induction of apoptosis by sulforaphane, a promising anti-cancer drug. Invest New Drugs. 23(3): p. 195-203.
- Frandsen, H. B., Markedal, K. E., Martín-Belloso, O., Sánchez-Vega, R., Soliva-Fortuny, R., Sørensen, H., ... & Sørensen, J. C. (2014). Effects of novel processing techniques on glucosinolates and membrane associated myrosinases in broccoli. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 64(1), 17-25.

- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811
- Geoffrey, M. Cooper ve Hausman, R. (2006). *Hücre: Moleküler Yaklaşım*. 3ed, ed. P.D.N.A. Prof. Dr. M. SAKIZLI. İzmir Tıp Kitabevi.
- Gökay G., (2019), Sülforafanın 769-P İnsan Böbrek Kanseri Hücre Dizisinde Apoptoz Üzerine Etkisi Ve Hücre Migrasyonunun İnhibisyonu
- Gökmen*, V., & Acar, J. (2004). Fumaric acid in apple juice: a potential indicator of microbial spoilage of apples used as raw material. *Food additives and contaminants*, 21(7), 626-631.
- Gullett, N.P., Ruhul Amin, A.R., Bayraktar, S., Pezzuto, J.M., Shin, D.M., Khuri, F.R., Aggarwal, B.B., Surh, Y.J. ve Kucuk, O. (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol*, 37(3): p. 258-81.
- Gultekin, M., Dunder, S., Kucukyildiz, I., Karaca, M. Z., Boztas, G., Turan, S. H., ... & Keskinilic, B. (2017). Survival of gynecological cancers in Turkey: where are we at?. *Journal of gynecologic oncology*, 28(6).
- Guo, L., Yang, R., Zhou, Y., & Gu, Z. (2016). Heat and hypoxia stresses enhance the accumulation of aliphatic glucosinolates and sulforaphane in broccoli sprouts. *European Food Research and Technology*, 242(1), 107-116.
- Gündoğdu E. (2009), Feksofenadin hidroklorür absorpsiyonunun in vitro, in situ ve in vivo olarak belirlenmesi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
- Hamsa, TP ve Kuttan, G. (2011). Harmine, B16F-10 melanomunda apoptozun içsel ve dışsal yollarını aktive eder. *Çin Tıbbı* , 6 (1), 1-8.
- Heywood, V. H. (1978). *Flowering plants of the world*. Mayflower Book. New York, USA.
- Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological research*, 55(3), 224-236.
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13(4), 1-7.

- Houghton, C.A., Fassett, R.G. ve Coombes, J.S. (2016). Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev.* p. 7857186.
- Jackson, S. J., & Singletary, K. W. (2004). Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis*, 25(2), 219-227.
- Jaiswal, A. K., Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment. *Food Chemistry*, 131(1), 63-72.
- Jeffery, E. H., & Araya, M. (2009). Physiological effects of broccoli consumption. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 283-298.
- Jiang, X., Jiang, X., Liu, Y., Ma, L., Ji R., Qu, Y., Xin, Y. ve Lv, G. (2018). Chemopreventive activity of sulforaphane. *Drug Des Devel Ther*, 12: p. 2905-2913.
- Juengel, E., Erb, H.H., Haferkamp, A., Rutz, J., Chun, F.K. ve Blaheta, R.A. (2018). Relevance of the natural HDAC inhibitor sulforaphane as a chemopreventive agent in urologic tumors. *Cancer Lett.* 435: p. 121- 126.
- Juge, N., Mithen, R.F. ve Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64(9): p. 1105-27.
- Kallifatidis, G., Rausch, V., Baumann, B., Apel, A., Beckermann, B. M., Groth, A., ... & Herr, I. (2009). Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF- κ B-induced antiapoptotic signalling. *Gut*, 58(7), 949-963.
- Kang, Y., & Kim, S. D. (2013). 11th international conference on gas-liquid and gas-liquid-solid reactor engineering (gls-11) preface. *Chemical Engineering Science*, 100, 1-1.
- Keum, Y. S., Jeong, W. S., & Kong, A. N. (2005). Chemopreventive functions of isothiocyanates. *Drug news & perspectives*, 18(7), 445-451.
- Kim HJ, You MK, Lee YH, et al. Red pepper seed water extract inhibits preadipocyte differentiation and induces mature adipocyte apoptosis in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research and Practice* 2018; 12(6): 494-502.

- KOÇAK, Ş., Çelik, L., Özbaş, S., SAKA, D. S., Tükün, A., & Yalçın, B. (2011). Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu. *Meme Sağlığı Dergisi*, 7(2), 47-67.
- Koçyiğit E, Köksal E. Sülföröfan, potansiyel etki mekanizması ve hastalıklarla ilişkisi. *Sağlık Bilimleri ve Meslekleri Dergisi* 2019;6(1): 153-160
- Koh, E., Wimalasiri, K. M. S., Chassy, A. W., & Mitchell, A. E. (2009). Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(7-8), 637-643
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., ... & American Cancer Society 2010 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. (2012). American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1), 30-67.
- Kutluk, T. (2013). Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler.
- Landete, J. M. (2013). Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(7), 706-721.
- Le, T. N., Chiu, C. H., & Hsieh, P. C. (2020). Bioactive compounds and bioactivities of brassica oleracea l. var. italica sprouts and microgreens: An updated overview from a nutraceutical perspective. *Plants*, 9(8), 946.
- Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Dereowska, A., & Wnuk, M. (2017). Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics*, 7(14), 3461–3477. <https://doi.org/10.7150/thno.20657>
- Liang, H., Yuan, Q., & Xiao, Q. (2006a). Effects of metal ions on myrosinase activity and the formation of sulforaphane in broccoli seed. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1-4), 19-22.
- Licznarska, B., Szaefer, H., & Krajka-Kuźniak, V. (2021). R-sulforaphane modulates the expression profile of AhR, ER α , Nrf2, NQO1, and GSTP in human breast cell lines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(2), 525-533.
- Licznarska, B., Szaefer, H., Matuszak, I., Murias, M. ve Baer-Dubowska,

- Lin HW, Hsieh MJ, Yeh CB, et al. Coronarin D induces apoptotic cell death through the JNK pathway in human hepatocellular carcinoma. *Environmental toxicology* 2018; 33(9): 946-954.95
- Liu, K.C., Shih, T.Y., Kuo, C.L., Ma, Y.S., Yang, J.L. ve Wu, P.P. (2016). Sulforaphane Induces Cell Death Through G2/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells. *Am J Chin Med*, 44(6): p. 1289-1310.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479-3485.
- Liu, R. H. (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384-392.
- López-Chillón, M. T., Carazo-Díaz, C., Prieto-Merino, D., Zafrilla, P., Moreno, D. A., & Villaño, D. (2019). Effects of long-term consumption of broccoli sprouts on inflammatory markers in overweight subjects. *Clinical Nutrition*, 38(2), 745-752.
- Mao F, Xiao B, Jiang Z, et al. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol* 2011; 28:121–126
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Gulewicz, P., Gulewicz, K., & Vidal-Valverde, C. (2008). Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1635-1644.
- Matusheski, N. V., Swarup, R., Juvik, J. A., Mithen, R., Bennett, M., & Jeffery, E. H. (2006). Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6), 2069-2076.
- Mayne, S.T., Playdon, M.C. ve Rock, C.L. (2016). Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nat Rev Clin Oncol*. 13(8): p. 504-15.
- Moon JK, Kim JR, Ahn YJ, Shibamoto T (2010) Analysis and anti-*Helicobacter* activity of sulforaphane and related compounds present in broccoli (*Brassica oleracea* L.) sprouts. *J Agric Food Chem* 58(11):6672–6677. <https://doi.org/10.1021/jf1003573>
- Munyaka, A. W., Makule, E. E., Oey, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Thermal stability of L-ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Food Science*, 75(4), 336-340.

- Myzak, M. C., & Dashwood, R. H. (2006). Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer letters*, 233(2), 208-218.
- Oliviero, T., Verkerk, R., Van Boekel, M. A. J. S., & Dekker, M. (2014). Effect of water content and temperature on inactivation kinetics of myrosinase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Food Chemistry*, 163, 197-201.
- Özcan, M. (2021). Antioksidan Kullanımının Meme Kanseri Tedavisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması.
- Özmen, V., Özmen, T., & Doğru, V. (2019). Breast cancer in Turkey; an analysis of 20.000 patients with breast cancer. *European journal of breast health*, 15(3), 141.
- Partridge, A. H., Hughes, M. E., Warner, E. T., Ottesen, R. A., Wong, Y. N., Edge, S. B., ... & Tamimi, R. M. (2016). Subtype-dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival. *Journal of Clinical Oncology*, 34(27), 3308-3314.
- Paško, P., Tyszká-Czochara, M., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Żmudzki, P., Bartoń, H., ... & Gorinstein, S. (2018). Comparative study of predominant phytochemical compounds and proapoptotic potential of broccoli sprouts and florets. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 95-100.
- Pérez, C., Barrientos, H., Román, J., & Mahn, A. (2014). Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets. *Food Chemistry*, 145, 264-271.
- Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M., & Hedley, D. W. (2004). The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular cancer therapeutics*, 3(10), 1239-1248.
- Pledge-Tracy, A., Sobolewski, M. D., & Davidson, N. E. (2007). Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Molecular cancer therapeutics*, 6(3), 1013-1021.
- Rutz, J., Juengel E., Euler S., Maxeiner, S., Justin, S., Roos, F., Chun, F.K. ve Blaheta, R.A. (2018). Chronic Sulforaphane Application Does Not Induce Resistance in Renal Cell Carcinoma Cells. *Anticancer Res.*38(11): p. 6201-6207.

- Sapienza, C., & Issa, J. P. (2016). Diet, nutrition, and cancer epigenetics. *Annual review of nutrition*, 36, 665-681.
- Shen, L., Su, G., Wang, X., Du, Q., & Wang, K. (2010). Endogenous and exogenous enzymolysis of vegetable-sourced glucosinolates and influencing factors. *Food Chemistry*, 119(3), 987-994
- Song, L., & Thornalley, P. J. (2007). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and chemical toxicology*, 45(2), 216-224.
- Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA (2011) Vegetables and fruits consumption and risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Int J Cancer* 129(11):2681–2693. <https://doi.org/10.1002/ijc.25928>
- Subedi, L., Cho, K., Park, Y. U., Choi, H. J., & Kim, S. Y. (2019). Sulforaphane-Enriched Broccoli Sprouts Pretreated by Pulsed Electric Fields Reduces Neuroinflammation and Ameliorates Scopolamine-Induced Amnesia in Mouse Brain through Its Antioxidant Ability via Nrf2-HO-1 Activation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3549274. <https://doi.org/10.1155/2019/3549274>
- Sulforophane glucosinolate. Monograph. (2010) *Altern Med Rev.* 15(4): p. 352- 60.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & 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.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- Taria M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. (2000). Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts *Int J Prosthodont.* 26: 395-397.
- Topal, T., Öter, S., & Korkmaz, A. (2009). Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3).
- Topuz, E., Aydinler, A., & Karadag, A. (2000). *Klinik Onkoloji Kitabı*. İstanbul. Tunç Matbaası. s. 35, 39.

- Ullah, M. F., Bhat, S. H., Husain, E., Abu-Duhier, F., Hadi, S. M., Sarkar, F. H., & Ahmad, A. (2014). Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. *Phytochemistry Reviews*, 13(4), 811-833.
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.
- Vallejo, F., Gil-Izquierdo, A., Pérez-Vicente, A., & García-Viguera, C. (2004). In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 135-138.
- Van Eylen, D., Bellostas, N., Strobel, B. W., Oey, I., Hendrickx, M., Van Loey, A., ... & Sørensen, J. C. (2009). Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (*Brassica oleracea* L. cv *Italica*) heads. *Food Chemistry*, 112(3), 646-653.
- Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2007). Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea* Cv. *Italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2163-2170.
- Van Zanden, J. J., Wortelboer, H. M., Bijlsma, S., Punt, A., Usta, M., van Bladeren, P. J., ... & Cnubben, N. H. (2005). Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochemical pharmacology*, 69(4), 699-708.
- W. (2015). Modulating potential of L-sulforaphane in the expression of cytochrome p450 to identify potential targets for breast cancer chemoprevention and therapy using breast cell lines. *Phytother Res*.29(1): p. 93-9.
- Watkins, E. J. (2019). Overview of breast cancer. *Journal of the American Academy of PAs*, 32(10), 13-17.6.
- World Health Organization (WHO). (2020). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. World Health Organization.

- Yalçın, A. S., Yılmaz, A. M., Altundağ, E. M., & Koçtürk, S. (2017). Kurkumin, kuersetin ve çay kateşinlerinin anti-kanser etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(1), 19-29.
- Yemiş, O., & ARTIK, N. (2007). Glukosinolatlar ve insan sağlığı. *Gıda*, 32(6), 293-303.
- Yepes-Molina, L., & Carvajal, M. (2021). Nanoencapsulation of sulforaphane in broccoli membrane vesicles and their in vitro antiproliferative activity. *Pharmaceutical Biology*, 59(1), 1490-1504.
- Yılmaz, D., & Demirel, Z. B. (2012). Glukosinolatlar ve Sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 40(2), 170-177.
- Yılmaz, E. (2019). Brokolideki biyoaktif bileşenlerin membran prosesleri ile kazanılması. (Doktora Tezi).
- Yuan, G. F., Sun, B., Yuan, J., & Wang, Q. M. (2009). Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(8), 580-588.
- Zhang, D., & Hamauzu, Y. (2004). Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food chemistry*, 88(4), 503-509.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G., & Posner, G. H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(6), 2399-2403.

8.EKLER

8.1. Orjinallik Raporu

BROKOLİ (BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA) EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE HATTINDA APOPTOZA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 19	% 18	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 4
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
4	archhealthscires.org İnternet Kaynağı	% 1
5	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.turkomp.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	www.1faydalari.com İnternet Kaynağı	% 1
8	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1

www.researchgate.net

