

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***EPİLOBİUM PARVIFLORUM* SCHREB. EKSTRAKTININ FARKLI KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

Tevhide SÜT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***EPİLOBİUM PARVIFLORUM* SCHREB. EKSTRAKTININ FARKLI KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

Tevhide SÜT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

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

***EPİLOBİUM PARVİFLORUM* SCHREB. EKSTRAKTININ FARKLI KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

**Tevhide SÜT
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından tarafından
FYL-2018-3896 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***EPİLOBİUM PARVIFLORUM* SCHREB EKSTRAKTININ FARKLI KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

Tevhide SÜT
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 27/06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi M. Aydın AKBUDAK (Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCÜ



ÖZET

***EPİLOBİUM PARVIFLORUM* SCHREB. EKSTRAKTININ FARKLI KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİ**

Tevhide SÜT

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi M. Aydın AKBUDAK

Haziran 2019; 69 sayfa

Amaç: Literatürdeki çalışmalar gözden geçirildiğinde; *Epilobium parviflorum*'un kolon kanser hücre hattına (HT29) ve fibroblast hücre hattına (BJ) uygulanıp apoptotik genlerin ekspresyonunun incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı *Epilobium parviflorum*'un HT29 ve BJ hücreleri üzerindeki apoptotik özelliklerini araştırmaktır.

Yöntem: HT29 ve BJ hücreleri 37°C'de 48 ve 72 saat *Epilobium parviflorum* etanol, su ve hekzan ekstraktları ile inkübe edilmiştir. IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra qRT-PCR yöntemi ile *Caspase-3*, *Bax*, *Caspase-8* ve *P53* genlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Ekstrakt muamelesinden sonra hücrelerde, geç apoptoz evresinde oluşan DNA fragmentasyonu, TUNEL testi ile belirlenmiştir.

Bulgular: *Epilobium parviflorum*'un etanol, su ve hekzan ekstraktlarının uygulandıktan sonra yapılan MTT testi ile belirlenen IC₅₀ değerleri BJ hücrelerinin canlılığını etkilemediği belirlenmiştir. Uygulanan ekstraktlar HT29 hücrelerinde *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin mRNA'larında önemli bir artış gözlenmiştir. TUNEL testi sonuçlarına göre etanol ve su ekstraktları uygulanan HT29 hücrelerinde DNA fragmentasyonunun daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: *Epilobium parviflorum*'un etanol, su ve hekzan ekstraktının HT29 hücreleri ile 48 saat inkübasyonu sonrasında belirlenen IC₅₀ konsantrasyonu BJ hücrelerinin çoğalmasını etkilememiştir. Bu ekstraktlar aynı zamanda HT29 hücrelerinde apoptozda rol oynayan *Caspase-8* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyonunu arttırarak bu hücrelerde apoptoza neden olmuştur. FACS cihazı ile yapılan flow sitometri yöntemi incelemeleri sonucunda *Epilobium parviflorum*'un etanol ve su ekstraktları uygulanan HT29 hücrelerinde yüksek oranda DNA fragmentasyonu gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: apoptoz, *Epilobium parviflorum*, kolon kanseri, qPCR

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi M. Aydın AKBUDAK

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefik UNCU

ABSTRACT

THERAPEUTIC EFFECTS OF *EPILOBIUM PARVIFLORUM* SCHREB. EXTRACT ON DIFFERENT CANCER CELL LINES

Tevhide SÜT

MSc Thesis in The Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

June 2019; 69 pages

Objective: While reviewing the literature; we did not encounter any studies that practised the expression of apoptotic genes which is applied to the colon cancer cell line (HT29) and fibroblast cell line (BJ) of *Epilobium parviflorum*. The aim of this study is to determine the changes in the expression of apoptotic genes when administered to HT29 and BJ cells of *Epilobium parviflorum*.

Method: HT29 and BJ cells were incubated with ethanol, water and hexane extracts of *Epilobium parviflorum* for 48 and 72 hours at 37°C. After determination of IC₅₀ values, expression of *Caspase-3*, *Bax*, *Caspase-8* and *P53* genes were measured by qRT-PCR method. DNA fragments formed in the late apoptosis phase in cells after extract treatment were determined by TUNEL assay.

Results: It was determined from the IC₅₀ values calculated by MTT test, which was performed after application of ethanol, water and hexane extracts of *Epilobium parviflorum* to cells, that it does not affect the viability of BJ cells. A significant increase was observed in mRNAs levels of *Caspase-8* and *Bax* genes in HT29 cells when ethanol, water and hexane extracts of *Epilobium parviflorum* were applied. According to the TUNEL test, it was observed that DNA fragmentation was higher in HT29 cells treated with ethanol and water extracts.

Conclusion: The IC₅₀ concentration determined after 48 hours incubation of ethanol, water and hexane extracts of *Epilobium parviflorum* with HT29 cells did not affect the cell viability of BJ cells. These extracts also induced apoptosis in these cells by increasing the expression of *Caspase-8* and *Caspase-3* genes involved in apoptosis in HT29 cells. As a result of the examination of the flow cytometry method using FACS, a high rate of DNA fragmentation was observed in HT29 cells of ethanol and water extracts of *Epilobium parviflorum*.

KEYWORDS: apoptosis, colon cancer, *Epilobium parviflorum*, qPCR

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

Asst. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU



ÖNSÖZ

Beni eğitim hayatım boyunca destekleyen babam Abdulkadir SÜT'e ve annem Arife SÜT'e çok teşekkür ederim. Aynı laboratuvarında çalıştığım arkadaşlarım Adem KABA ve Pelin ÜNAL'a deneylerde yardımlarından ve yol göstermelerinden dolayı minnettarım.

Yakın arkadaşım Kübra AKSU'ya dertlerimi dinleyip beni hep desteklediği için minnettarım. Doktora öğrencisi Gökçe ERDOĞAN'a tecrübelerini bana aktararak beni aydınlattığı için çok teşekkür ederim.

Flow sitometri deneyinde Tıp Fakültesindeki FACS cihazını kullanmama izin veren ve yardımcı olan Prof. Dr. Sadi KÖKSOY hocama teşekkür ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya laboratuvarında çalışmama izin verdiği ve tecrübeleri ile beni aydınlattığı için teşekkür ederim. Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Aydın AKBUDAK'a bu projeyi bana vermesi ve sağladığı maddi kaynak nedeniyle teşekkür ederim.

Tezin hazırlama sürecinde her daim yanımda, bana destek olan ve yardımlarını benden esirgemeyen Mehmet Can KARAKURT'a canı gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iv
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. <i>Epilobium</i>	3
2.1.1. <i>Epilobium</i> ve prostat ilişkisi.....	5
2.2. Apoptozis.....	7
2.2.1. İçsel (mitokondriyal) sinyal yolağı	9
2.2.2. Dışsal (ölüm reseptörleri) sinyal yolağı	10
2.2.3. Nekrozis	10
2.2.4. Apoptozis ile nekrozis arasındaki farklılıklar	12
2.2.5. Apoptoz belirlemede kullanılan yöntemler	13
2.3. Hücre Hatları	14
2.3.1. Kolon kanser hücre hattı (HT29)	14
2.3.2. Fibroblast (BJ).....	16
3. MATERYAL VE METOD.....	17
3.1. Hücre Kültürü.....	17
3.1.1. Hücre sayımı	18
3.1.2. Hücre pasajlanması ve dondurulması.....	18
3.2. Bitki Ekstraktının Hazırlanışı	19
3.3. MTT Proliferasyon Testi ile Hücre Dozlarının Belirlenmesi.....	19
3.4. qRT-PCR Analizi	20
3.4.1. Total RNA izolasyonu.....	20
3.4.2. İzole edilen RNA'lara DNaz uygulaması	22
3.4.3. cDNA eldesi	22

3.4.4.	qRT-PCR uygulama basamakları.....	23
3.5.	TUNEL Testi	25
3.6.	İstatistiksel Analiz	27
4.	BULGULAR.....	28
4.1.	Hücre Proliferasyon Testi (MTT) Sonuçları	28
4.1.1.	<i>Epilobium</i> etanol ekstraktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu	30
4.1.2.	<i>Epilobium</i> su ekstraktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu	31
4.1.3.	<i>Epilobium</i> hekzan ekstaktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu	33
4.1.4.	IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	34
4.2.	qRT-PCR Bulguları	36
4.3.	TUNEL Testi Bulguları	39
5.	TARTIŞMA	41
6.	SONUÇLAR.....	45
7.	KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Epilobium parviflorum* Schreb. Ekstraktının Farklı Kansere Hücre Hatları Üzerindeki Terapötik Etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

27/ 06/ 2019

Tevhide SÜT



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: yüzde
µl	: mikrolitre
bç	: baz çifti
cm	: santimetre
dk	: dakika
M	: molarite
mg	: miligram
ml	: mililitre
nm	: nanometre
°C	: santigrat derece
sn.	: saniye
µm	: mikrometre

Kisaltmalar

ADP	: Adenozin di fosfat
Apaf 1	: Apoptosis proteaz aktive edici faktör 1
ATP	: Adenozin tri fosfat
Bad	: Bcl-2 hücre ölümü antogonisti
Bak	: Bcl-2 öldürücü antogonisti 1
Bax	: Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	: B hücreli lenfoma proteini 2
Bcl-w	: Bcl-2 benzeri protein 2
Bcl-XL	: Bcl-2 ilişkili protein, uzun izoform
BH	: Bcl-2 homoloji domain

Bid	: BH3 etkileşimli bölge ölüm agonisti
Bik	: Bcl-2 etkileşimli öldürücü
Bim	: Bcl-2 etkileşimli protein
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CAD	: Kaspazlarla aktifleşen DNaz
CARD	: Kaspazların kümelenme bölgeleri
cDNA	: Komplementer DNA
Dd	: Ölüm domaini
dH ₂ O	: Distile su
DISC	: Ölümü başlatan sinyalleme yapısı
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
DR	: Ölüm reseptörü
FADD	: Fas'a bağlı ölüm bölgesi
FasL	: Fas ligand
FBS	: Fetal sıgır serumu
IC ₅₀	: Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
Kaspaz	: Sistein aspartat spesifik proteaz
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
MOMP	: Mitokondrial dış membran geçirgenliği

PARP	: Poli ADP riboz polimeraz
PBS	: Fosfat tampon tuzu
PI	: Propidium iyodür
qRT-PCR	: Kantitatif reverse transkriptaz PCR
Sit C/cyt-c	: Sitokrom C
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü β
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TNFR1	: Tümör nekroz faktör reseptörü 1
TRADD	: TNFR'e bağlı ölüm bölgesi
TRAIL	: TNF'yle ilişkili apoptozisi uyaran ligand
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling
UV	: Morötesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Epilobium parviflorum</i> 'a ait görüntüler.....	3
Şekil 2.2. <i>Epilobium parviflorum</i> 'un Türkiye'deki dağılımı	5
Şekil 2.3. İçsel ve dışsal apoptoz yolları	8
Şekil 2.4. TRAIL apoptozis sinyal yolağı.....	9
Şekil 2.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki bağlantı.....	11
Şekil 4.1. MTT testi görüntüsü	28
Şekil 4.2. HT29 hücrelerinin 24 saat <i>Epilobium</i> ekstraktı ile inkübasyonu sonrası alınan görüntü.....	29
Şekil 4.3. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> etanol ekstraktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları	30
Şekil 4.4. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> etanol ekstraktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları	30
Şekil 4.5. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> su ekstraktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları.....	31
Şekil 4.6. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> su ekstraktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları.....	32
Şekil 4.7. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> hekzan ekstraktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları	33
Şekil 4.8. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> hekzan ekstraktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları	33
Şekil 4.9. <i>Epilobium</i> etanol ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik	34
Şekil 4.10. <i>Epilobium</i> su ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik	35
Şekil 4.11. <i>Epilobium</i> hekzan ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik	35
Şekil 4.12. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> etanol ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği	36

Şekil 4.13. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> su ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği.....	37
Şekil 4.14. HT29 ve BJ hücrelerinin <i>Epilobium</i> hekzan ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği	38
Şekil 4.15. HT29 hücrelerinin <i>Epilobium parviflorum</i> ekstraktları ile 48 saat inkübasyon sonrasında alınan görüntüsü	39
Şekil 4.16. Flow sitometri yöntemi ile değerlendirilen apoptotik hücreleri gösteren grafik	40



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Epilobium parviflorum</i> 'un TÜBİTES'e göre sistematik sınıflandırması	4
Çizelge 2.2. Apoptozis ile nekrozis arasındaki farklar	12
Çizelge 3.1. cDNA sentezinde gereken solüsyonlar	22
Çizelge 3.2. cDNA sentezinde kullanılan sıcaklık ve inkübasyon süreleri	23
Çizelge 3.3. Primerlerin özelliklerini gösteren çizelge	24
Çizelge 3.4. qRT-PCR'da kullanılan malzemeleri gösteren çizelge	24
Çizelge 3.5. qRT-PCR inkübasyon sürelerini gösteren çizelge	25

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser dünyada olduğu gibi Türkiyede’de en çok teşhis konulan kanserler arasındadır. Görülme sıklığı ve hastalıktan ölüm oranları; tedavilerin günden güne gelişmesi ve tarama testlerinin yaygınlaşmasından dolayı giderek düşmektedir. Üçüncü evre kolon kanserinin tedavisinde adjuvant terapi ve bölgesel olarak ilerlemiş kolon kanserinde kemoradasyon ve cerrahi müdahaleler uygulanmaktadır (Siegel vd. 2017). Bitkisel besinlerde, kanseri önleyici özelliklere sahip fitokimyasallar, bileşenler bulunmaktadır (Surh 2003). *Epilobium* türleri çay olarak tüketildiğinde prostat ve idrar yolları hastalıkları üzerinde iyileştirici etkileri olduğu bilinmektedir (Vogl vd. 2013).

Epilobium, Onagraceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Birçok toprak çeşidini ve farklı iklim koşullarını tolere edebilen ve büyük ölçüde tüm dünyaya yayılmış 200'den fazla, yakın ilişkili türden oluşur. *Epilobium* türlerinde bulunan biyolojik olarak aktif bileşikler flavonoidler, fenolik asitler, ellagitanninler, sitosterol türevleri, vitaminler ve yağ asitleri olarak sıralanabilir. (Vitalone ve Allkanjari 2018). 1980'li yıllara kadar farmakolojik literatürde *Epilobium* ile ilgili neredeyse hiçbir çalışmanın yapılmamış olduğu dikkat çekicidir. *Epilobium*'un prostat ile ilişkisini gösteren literatürdeki ilk kayıt Avusturya'dan bir bitki bilimci olan Maria Treben'e aittir. Treben yazısında *Epilobium*'un böbrek, mesane ve prostat kanseri için bir çare olabileceğini de belirtmiştir (Treben 1984). Sonrasında yapılan çalışmalarda *Epilobium*'un çeşitli gastrointestinal hastalıklara, iyi huylu prostat hiperplazisine, yanığa, enfeksiyona ve üriner problemlere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Vitalone vd. 2003a; Vogl vd. 2013).

Prostat hücreleri üzerinde yapılan birçok deney bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, *Epilobium*'un etanolik ekstratlarının insan epitelyal prostat kanseri hücrelerine uygulandığında hücre proliferasyonun ve DNA sentezinin inhibe olduğu gözlenmiştir (Vitalone vd. 2001). Bu etkiler aynı zamanda LNCaP (androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı), HMEC (insan meme epiteli hücreleri) ve 1321N1 (insan astrositoma hücreleri) gibi çeşitli hücre hatları üzerinde de gözlemlendiğinden dolayı inhibisyon mekanizmasının androjen bağımsız olduğu anlaşılmaktadır. *Epilobium*'un biyolojik aktivitesinde önemli olan oenothien B bileşiği sulu ekstraktlarda yüksek miktarda bulunmaktadır (Granica vd. 2014). *Epilobium* ekstraktı uygulanmış LNCaP hücrelerinde mitokondrial potansiyelde önemli bir azalış ve kaspaz-3 proteini aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. *Epilobium* ekstraktının LNCaP prostat kanser hücrelerinde mitokondrial yolak aracılığı ile apoptozu indüklediği bilinmektedir (Stolarczyk vd. 2013).

Apoptozis, hücre popülasyonunun homeostatik mekanizmanın sürdürülmesinde, yaşlanma ve gelişimde normal olarak gerçekleşmektedir. Dışsal (ölüm reseptörleri) ve içsel (mitokondrial) yolak olmak üzere iki farklı apoptotik yolak vardır (Pereira ve Amarante-Mendes 2011). Dışsal sinyal yolağı, hücre dışındaki sinyali ölüm reseptörü

(DR) aracılığı ile hücre içi apoptotik mekanizmaya ileten bir yoldur. Sonuç olarak prokaspaz-8 hidroliz olur ve aktif kaspaz-8 oluşur (Wilson vd. 2009). Kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'e bağlanarak apoptozu başlatır. Yolaklar kaspaz-3'ün bölünmesiyle başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeletinin degrades olması, apoptotik granüllerin oluşması, fagositik hücrelerin bağlanması için ligandların ifade edilmesi ve fagositik hücre tarafından alınması ile sonlanır. Kanseri ilaçları ve radyasyon, hücrede DNA hasarı oluşturarak p53 yolağı aracılığı ile apoptoza neden olabilmektedir (Elmore 2007). Apoptozun mitokondriyal (içsel) yolağındaki Bcl-2 ailesinin üyeleri mitokondrinin dış membranının geçirgenliğini (MOMP) düzenlemektedir. Pro-apoptotik üyeler bax ve bak, anti-apoptotik üyeleri engelleyerek mitokondri porlarının geçirgenliğini artırır ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına sebep olurlar. MOMP çoğunlukla proteolipit porların oluşmasına neden olur. Bu porlardan salınan sitokrom c, apaf-1'e bağlanır (Green 2006).

Bu çalışmada, kolon kanseri (HT29) ve fibroblast (BJ) hücre hatları ile çalışıldı. İn vitro ortamda bu hücrelere etanol, su ve hekzan ile elde edilen *Epilobium parviflorum* bitki ekstraktı uygulanmıştır. Uygulamadan sonra apoptotik genler olan *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-8* ve *P53* genlerinin ekspresyonundaki değişimler incelenmiştir. TUNEL testi ile uygulamadan sonra oluşan DNA fragmentasyonları gözlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, *Epilobium parviflorum* bitki ekstraktının HT29 ve BJ hücrelerinin üzerindeki apoptotik etkilerini araştırmaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Epilobium*

Epilobium türleri çok yıllık otsu bitkilerdir. İsmi yunanca “epi-lobus” kelimesinden gelmektedir. Dört petale sahip olup türleri pembe, kırmızı, sarı, mor şeklinde güzelce ayrılmıştır. Eğer yüksek polifenolik içerik elde edilmek isteniyorsa bu bitkinin çiçeklenme döneminde toplanması tavsiye edilmektedir. *Epilobium*’da başlıca sekonderler olan flavonoid, glikosit, tannin, fenolikler, B-sitosterol türevleri, triterpen, vitamin ve yağ asitlerinden bulunmaktadır (Lesuisse vd. 1996).



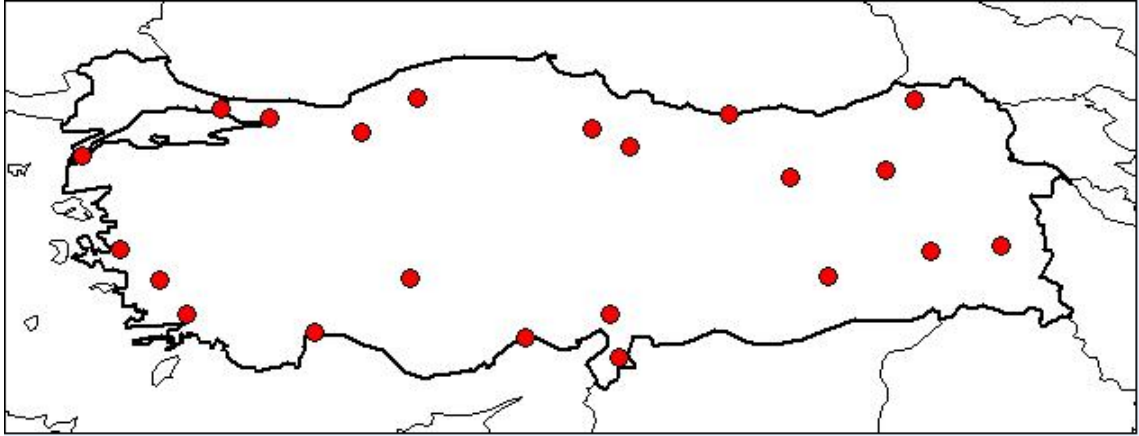
Şekil 2.1. *Epilobium parviflorum*’a ait görüntüler; **A:** *Epilobium parviflorum* genel görüntüsü; **B:** *Epilobium parviflorum* yaprak görüntüsü; **C:** *Epilobium parviflorum* çiçek görüntüsü; **D:** *Epilobium parviflorum* gövde görüntüsü (<https://gobotany.newenglandwild.org/species/epilobium/parviflorum/>, Erişim tarihi: 17.03.2019)

Epilobium parviflorum Avrupa’da doğal olarak yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. *Epilobium* türleri, Avrupa’da hem geçmişte hem de günümüzde bazı hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır. Halk arasında küçük çiçekli söğüt otu ve yakı otu gibi çeşitli adlandırmalara sahiptir. *Epilobium* ürünleri terapötik çaylar ve diyet takviyeleri gibi çeşitli şekillerde Amerika, Avrupa ve Avustralya’da ticari olarak satılmaktadır. 12’si Macaristan’da 27’si Avrupa’da olmak üzere 200 türün üstünde *Epilobium* türü mevcuttur. *Epilobium* türleri arasında üzerine en çok bilimsel araştırma yapılanlar *Epilobium angustifolium* ve *Epilobium parviflorum*’dur. *Epilobium* ekstraktının biyolojik olarak aktif bileşenleri (polifenol ve fitosterol) günümüzde halen daha tanımlanmaya devam etmektedir. Fenolik bileşikler arttıkça antioksidan kapasiteside artış göstermektedir. Ayrıca fitosteroller, prostatik membranların Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini inhibe eder ve patolojik vakalarda prostat metabolizmasını baskılar. Ayrıca Oenothien B, prostatik 5α-redüktaz enziminide inhibe eder. Böylece iyi huylu prostat hiperplazisini tetikleyen hormonu ayarlar (Ducrey vd. 1997).

Epilobium parviflorum’un TÜBİVES’e (Türkiye Bitkileri Veri Servisi) göre sistematik olarak sınıflandırılması:

Çizelge 2.1. *Epilobium parviflorum*’un TÜBİVES’e göre sistematik sınıflandırması

Aile	:	Onagraceae
Cins	:	<i>Epilobium</i>
Takson	:	<i>Epilobium parviflorum</i>
Taksonun yerel isimleri		
Yakı Otu		
Taksonomik Hiyerarşi		
Alem		Plantae
Alt Alem		Tracheobionta
Şube		Magnoliophyta
Sınıf		Magnoliopsida
Alt Sınıf		Rosidae
Takım		Myrtales
Aile		Onagraceae
Cins		<i>Epilobium</i>
Tür		<i>Epilobium parviflorum</i>



Şekil 2.2. *Epilobium parviflorum*'un Türkiye'deki dağılımı; İşaretler Osmaniye, Bolu, İstanbul, Karabük, Bitlis, Amasya, Antalya, Artvin, Aydın, Çanakkale, Diyarbakır, Erzincan, Erzurum, Giresun, Hatay, İçel, İzmir, Kocaeli, Konya, Muğla, Tokat ve Van illerini temsil etmektedir. (http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=1&tax_id=3878, Erişim Tarihi: 10.04.2019)

Toth ve arkadaşları Macaristandan topladıkları çeşitli *Epilobium* türlerinin (*E. parviflorum*, *E. hirsutum*, *E. roseum*, *E. montanum*, *E. tetragonum*) flavonoid kompozisyonlarını incelemişlerdir. Bu bitkilerin türlerine ve yetiştikleri çevre koşullarına göre içerdiği bileşikler değişmektedir. Flavonoidler *Epilobium* için kimyasal markır olarak da kullanılabilir. Hepsinde ortak olarak myricetin, quercetin, kaempferol bulunmaktadır. Özellikle ticari olarak satın alınmış *E. parviflorum*'da myricetin-glycoside, quercetin-glycoside, myricitrin, ellagic acid, myricetin, quercetin bileşikleri bulunmuştur (Tóth vd. 2006).

2.1.1. *Epilobium* ve prostat ilişkisi

Prostat kanseri, erkek hastalarda en sık görülen kanserdir aynı zamanda Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen malignitesi olmaya devam etmektedir. Hastalığın ilerlemiş evrelerine sahip olan hastaların çoğu, başlangıçta mevcut tedaviye (hormonal tedavi, radyoterapi veya kemoterapi) yanıt verir. Ancak prostat kanseri tedavi yöntemlerine dirençli olan bir grup hastada daha çok ilerleme ve daha sonra yaygın metastaz gelişir (Jaworska vd. 2015).

Epilobium türleri üzerinde yapılan deneylerde, prostat kanser hücreleri üzerindeki apoptatik etkisinin mitokondriyal yolak ve kaspaz-3 ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Stolarczyk vd. 2013). Etanol içinde çözeltisi yapılan *Epilobium* türlerinin prostat kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Vitalone vd. 2001). *Epilobium* içeriğinde bulunan polifenollerin insan prostat tümöründe apoptozu tetiklediği kanıtlanmıştır.

Antibakteriyel ve serbest radikalleri yakalama özelliği olduğu bilinen *Epilobium*, iyi huylu prostat hiperplazisine uygulanmış ve *Epilobium parviflorum* ekstratı sahip olduğu anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri sayesinde prostat hiperplazisinde iyileşme gözlenmiştir (Hevesi vd. 2009). İyi huylu prostat hiperplazisi, içerisindeki bezlerin büyümesi nedeniyle prostatın genişlemesidir. Akut bakteriyel, kronik bakteriyel, kronik bakteriyel olmayan olmak üzere görünürde üç çeşit prostat hiperplazisi vardır. Fungi, mikoplazma ya da virüs gibi ajanların neden olduğu bakteriyel olmayan kronik prostatitis en sık görülenidir (Tanner vd. 1999). Akut bakteriyel prostatitis idrar yolu enfeksiyonunda genellikle *E. coli* nedeniyle meydana gelir. Hidroksil radikalleri toplayıcıları siklooksijenazı baskılar ve sonucunda inflamasyon azalır. Prostat hastalarında prostaglandin sentezinde COX-2'nin aşırı ekspresyonu ve prostaglandinde azalma meydana gelmiştir. Çalışmalar hem alkolde hem de suda çözünmüş *Epilobium parviflorum* ekstraktının COX-1 ve COX-2 tarafından katalize edilen prostaglandin biyosentezinin inhibisyonu aracılığıyla anti-inflamatuar etkisi olduğunu göstermiştir. Her ikisi de siklooksijenazın baskılanmasına yol açar ve sonucunda inflamasyon azalır (Steenkamp vd. 2006).

Vitalone ve arkadaşları çeşitli *Epilobium* türlerinin apoptotik etkilerini insan astrositoma hücreleri (1321N1), insan memeli epitel hücresi (HMEC), androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) ve prostat hücresi (PZ-HPZ-7) üzerinde incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada aynı zamanda memeli epitelyal hücrelerinin *Epilobium*'a karşı prostatik hücrelerden daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir. *Epilobium rosmarinifolium*'un su ekstraktı ile yaptıkları başka bir deneyde de, DNA sentezinin sitotoksik etki göstermeksizin inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir (Vitalone vd. 2003b). *Epilobium* otunun apolar çözücüler ile elde edilmiş ekstraktlarının biyolojik aktivitesi daha yüksektir. Bununla birlikte en etkili olan *Epilobium rosmarinifolium* en yüksek oenothien B kapasitesine sahiptir. Oenothien B suda çözünebilen ellagitannin türevi bir birleşiktir. *Epilobium angustifolium*'a göre prostat hücreleri üzerinde DNA sentezini 10 kat daha fazla inhibe etme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. *Epilobium* ekstraktının antiproliferatif etkisi sadece prostat hücrelerine özgü olmadığı kanıtlanmıştır (Vitalone vd. 2003b).

Vitalone ve arkadaşları 5 α -redüktaz inhibitörü olarak geleneksel olarak kullanılan etanolik *Epilobium angustifolium* ekstraktı ile çalışmışlardır. Bu savı değerlendirmek için insan epitelyal prostat hücreleri üzerinde (PZ-HPV-7) bitki ekstraktını uygulamışlardır. 24 ve 48 saat muameleden sonra MTT ve LDH testleri yapılmıştır (Vitalone vd. 2001). Suda çözölmüş *Epilobium* ekstraktı %56 oranında 5- α -redüktaz enzimini inhibe etmiştir. Oenothien B suda çözünen ilk tannin olarak literatüre kaydedilmiştir. Bunun prostatik adenoma tedavisinde etkili olduğu düşünülmektedir (Lesuisse vd. 1996). *Epilobium spicatum*, *Epilobium rosmarinifolium* ve *Epilobium tetragonum*'un DNA sentezini PZ-HPV-7 hücrelerinde durdurduğu görülmüştür. Bu

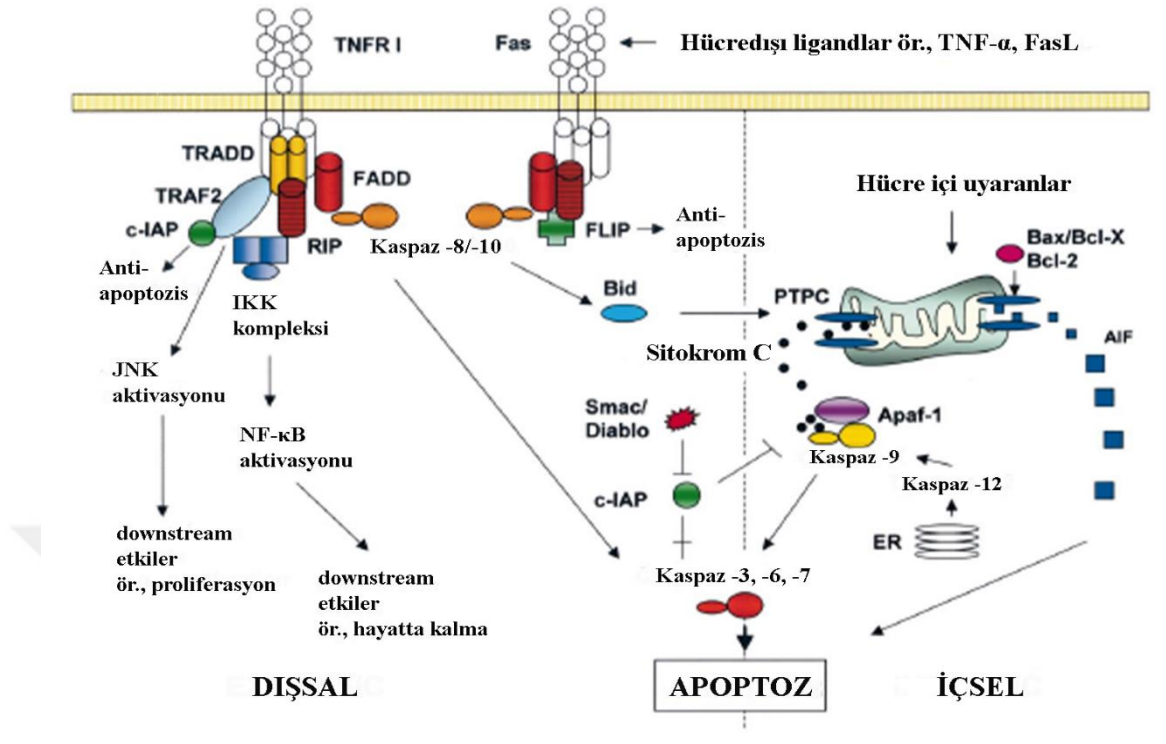
sırada DNA fragmentasyonu ve yoğunlaşması gözlenmemiştir. Flow sitometri ile hücre döngüsünü G₀/G₁ fazında durdurduğu gösterilmiştir (Vitalone vd. 2003a).

Epilobium angustifolium'un prostat büyümesine neden olan prostaglandin biyosentezini azalttığı bilinmektedir. Metanolik ekstraktı çeşitli flavonoidler içerdiğinden birinin bundan sorumlu olması kuvvetle ihtimaldir. Sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde prostat büyümesinde gerileme gözlenmiştir (Juan vd. 1988). *Epilobium* etanolik ekstraktı bakteri, mantar ve mayaya karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. En geniş spektrumlu *Epilobium* türleri *Epilobium angustifolium* ve *Epilobium rosmarinifolium* olarak bulunmuştur (Battinelli vd. 2001).

2.2. Apoptozis

Apoptozis programlı hücre ölümü olup enerji gerektiren bir eylemdir. Apoptozis normal hücre döngüsünde, immün sistemin gelişiminde, embriyonik gelişimde ve kimyasallar ile indüklenen hücre ölümünün de dâhil olduğu çeşitli süreçlerde önemli rol oynar. Pek çok kanser türünde, otoimmün bozukluk ve nörodejeneratif hastalıklarda düzgün olmayan apoptozis söz konusudur (Elmore 2007). Apoptozis kelime olarak ilk defa Kerr tarafından 1972'de kullanılmıştır (Kerr vd. 1972). Apoptozis, hücre popülasyonunun homeostatik mekanizmanın sürdürülmesinde, yaşlanma ve gelişimde normalde gerçekleşmektedir.

Dışsal (ölüm reseptörleri) ve içsel (mitokondrial) yolak olmak üzere iki farklı apoptotik yolak vardır. Bu yolaklar birbirini etkilemektedir. Bunlara ek olarak T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümü adında bir yolak daha tanımlanmıştır. Bu üç yolak büyük oranda benzer şekilde başlar ve sonlanır. Yolaklar kaspaz-3'ün bölünmesiyle başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeletinin degrades olması, apoptotik granüllerin oluşması, fagositik hücrelerin bağlanması için ligandların ifade edilmesi ve fagositik hücre tarafından alınması ile sonlanır (Elmore 2007).



Şekil 2.3. İçsel ve dışsal apoptoz yolları (Zeiss C. J., 2003)

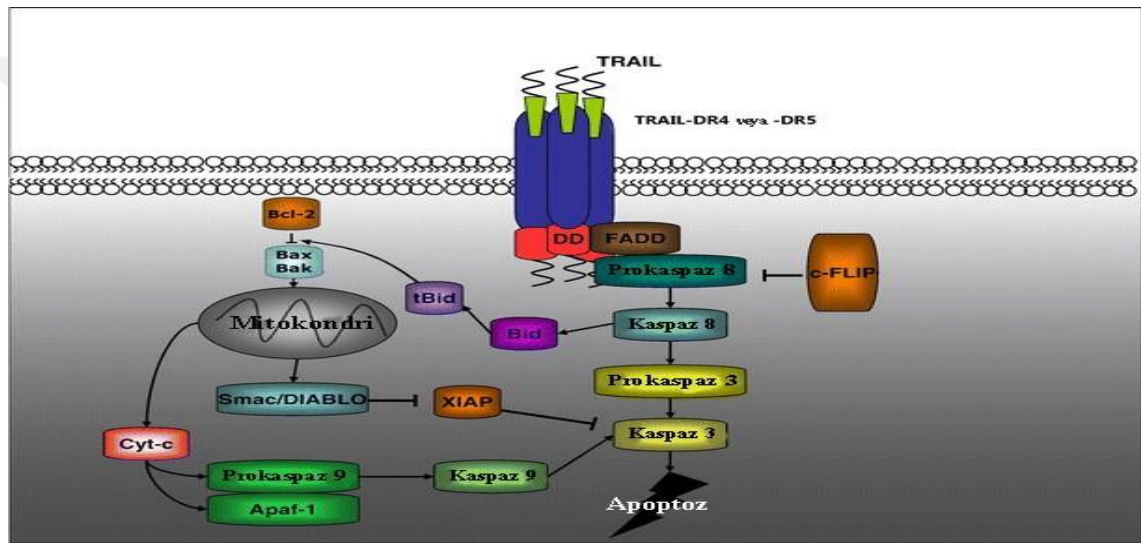
Işık mikroskopunda apoptozis sırasında birçok morfolojik değişiklik gözlenebilmektedir. Apoptozisin erken evrelerinde hücre büzülmesi ve piknozis (çekirdek büzülmesi) meydana gelir (Kerr vd. 1972). Piknozis apoptozisin karakteristik bir özelliği olup kromatin yoğunlaşmasıyla oluşur.

Diğer taraftan hücreler toksik maddelere maruz kaldığında ya da hasara uğradığında da apoptoza girer. Kanser ilaçları ve radyasyon hücrede DNA hasarı oluşturarak p53 yolağı aracılığı ile apoptoza neden olabilmektedir (Elmore 2007). İki farklı ana hücre ölüm şekli vardır: apoptozis ve nekrozis. Nekrozisde kaza ve şiddetli yaralanmalarda hücreler genişleyerek ölürken, apoptoziste ise hücrenin ölüm sinyal yolları aktifleşmektedir. Nekroz ile ilişkili olan hastalıklar nörodejeneratif, otoimmün hastalıklar ve bazı kanser çeşitleridir (Formigli vd. 2000). Apoptozis enerji bağımlı bir olaydır ve bir sistein proteazı olan kaspaz enzimleri rol oynar.

Kromatinin fragmentasyonunu plazma membranının genişlemesi ve tomurcuklanması takip eder. Normalde sitoplazma içinde sıkıca paketlenmiş halde bulunan organeller de birbirine yapışmaya başlarlar. Apoptozun son aşamasında bu hücreler makrofajlar tarafından fagositoze edilirler (Kerr vd. 1972).

2.2.1. İçsel (mitokondriyal) sinyal yolağı

Apoptozun mitokondriyal (içsel) yolağındaki Bcl-2 ailesinin üyeleri mitokondrinin dış membranının geçirgenliğini (MOMP) düzenlemektedir. Bu ailenin üyeleri Bcl-2 ile birden fazla homolojik domain paylaşmaktadır. Bcl-2'nin anti-apoptotik üyeleri olan A1, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 ve Bcl-W; BH1, BH2, BH3 ve BH4 domainlerinin hepsini içermektedir. Pro-apoptotik üyeler olan Bax, Bak ve Bok; BH4 domainini içermezken, diğer proteinlerle reaksiyona girebilen BH3 domainini içermektedir. Bu bölgeyi içeren proteinler; Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa ve Puma olarak sıralanabilir Bim, Bid ve Puma bütün anti-apoptotik üyelere bağlanabilirken; Bad, özellikle Bcl-2, Bcl-W ve Bcl-X_L ile etkileşimdedir. Noxa ise daha spesifik olarak Mcl-1 ile reaksiyona girer (Pereira ve Amarante-Mendes 2011).



Şekil 2.4. TRAIL apoptozis sinyal yolağı (Sayers TJ, 2011)

Pro-apoptotik üyeler Bax ve Bak, anti-apoptotik üyeleri engelleyerek mitokondri porlarının geçirgenliğini artırır ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına sebep olurlar. MOMP çoğunlukla proteolipit porların oluşmasına neden olur. Bu porlardan salınan sitokrom c, apaf-1'e bağlanır. İkisi birlikte kaspaz-9'a bağlanarak aktifleşmesine sebep olurlar. Kaspazlar aktifleşme bile MOMP'un oluşumu hücrenin apoptozise gitmesi için yeterlidir. Bcl-2 üyeleri ile MOMP'un düzenlenmesini açıklayan iki farklı model önerilmiştir. Önerilen ilk modelde anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri, sürekli aktif olan Bax/Bak kanallarını inhibe eder. BH3 ile homolojik pro-apoptotik proteinler anti-apoptiklerden fazla olduğu zaman apoptozis devam eder. İkinci modelde ise BH3 proteinleri aktivatör ve katalizleyici olmak üzere ikiye ayrılır. Katalizleyiciler anti-apoptotikleri nötralize ederken, aktivatörler Bax ve Bak proteinlerini aktifleştirir (Green 2006).

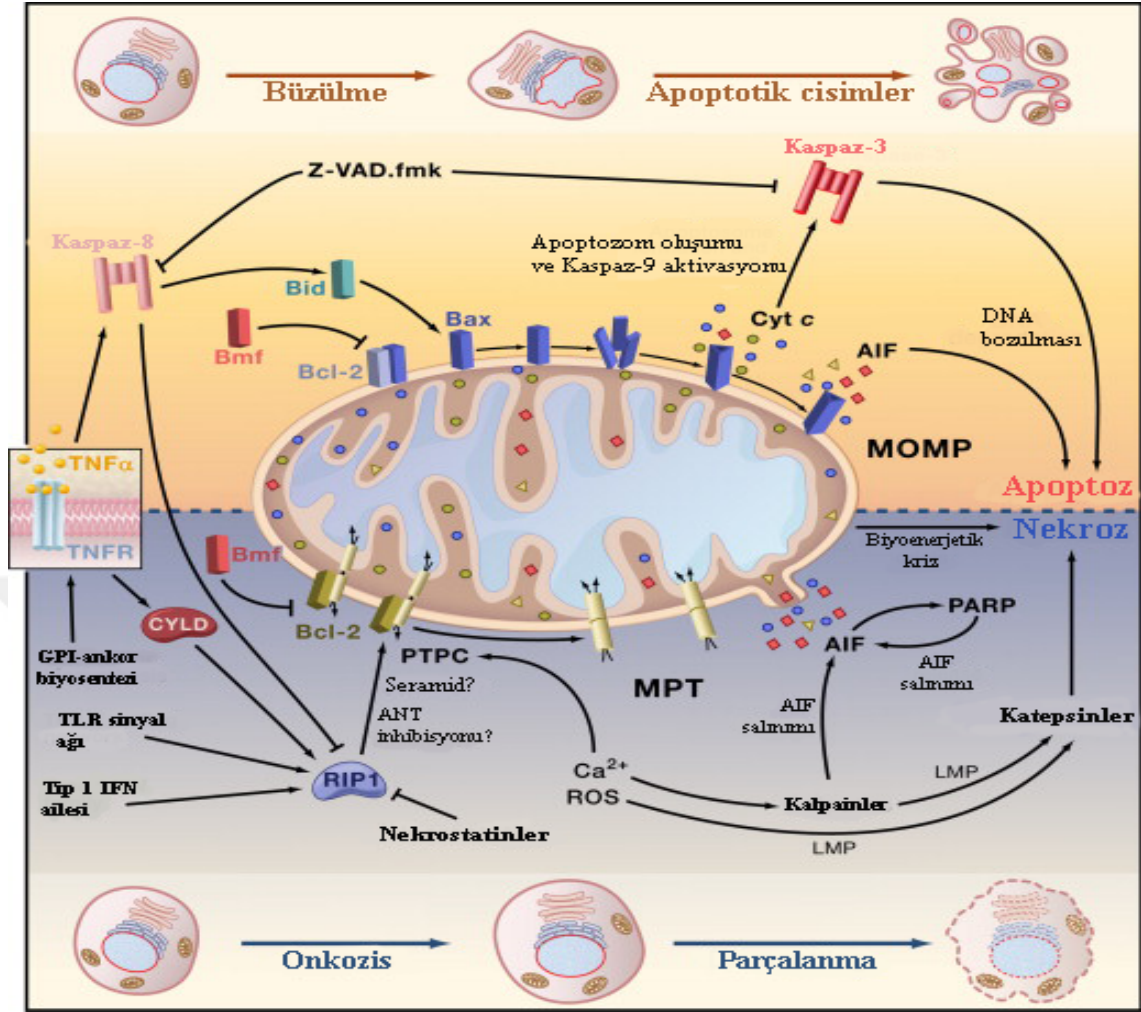
2.2.2. Dışsal (ölüm reseptörleri) sinyal yolağı

Dışsal sinyal yolağı, hücre dışındaki sinyali ölüm reseptörü (DR) aracılığı ile hücre içi apoptotik mekanizmaya ileten bir yoldur. Bu yolda en iyi tanımlanmış ölüm ligandı TNF ailesine ait proteinlerdir. Bu aileye ait olan proteinler TNF, FasL ve TRAIL olup T, NK, NKT, makrofaj ve dentritik immün sistem hücreleri tarafından üretilirler (Sayers 2011). DR membranlar arası bir proteindir ve hücre içinde 80 amino asitlik ölüm domainine (DD) sahiptir. DD sinyali iletmek için uygun Fas ilişkili ölüm domainine (FADD) bağlanır. FADD prokaspaz-8, prokaspaz-10, prokaspaz-2 ya da fllice inhibitör proteinini çağırır. Bu birleşme sonucu ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) meydana gelir. Sonuç olarak prokaspaz-8 hidroliz olur ve aktif kaspaz-8 oluşur (Wilson vd. 2009). Kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'e bağlanarak apoptozu başlatır.

2.2.3. Nekrozis

Nekroz, yunancada ceset; onkos ise şişmek anlamına gelmektedir ve nekrozis hücre şişmesi ve parçalanması ile karakterizedir. Bazı araştırmacılar nekrozis yerine 'onkotik nekrozis' kelimesini kullanmaktadırlar. Nekrozis dış etkenlerin uyarısı sonucu gerçekleşebilmektedir. Bu dış etkenler; enerjide ani azalma, dokularda iskemi olması, hücre zarı geçirgenliği bozulması gibi sıralanabilir. Apoptozisin tersine, nekroziste hücreler, glisin anyon kanallarının açılması sonucu osmotik basınç ile organel ve hücre membranlarını kaybederler. Böylece lizozomdan açığa çıkan enzimler sitozole girerek hücre yıkımına neden olur (Hotchkiss vd. 2009).

Önceleri nekrozisin rasgele gerçekleşen bir hücre ölüm şekli olduğu düşünülmeye karşın son zamanlarda yapılan çalışmalarda nekrozisin iskemi, nörodejeneratif, patojen enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Serin/treonin kinaz reseptör-iliskili protein-1 (RIP1), reseptör ligand etkileşimli indüklemeye ile nekrozisin başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. RIP1 kinaz'ın ölüm domaini; TNFR1, TRAILR1 ve TRAILR2 gibi ölüm reseptörlerine bağlanır. RIP1 ayrıca kaspaz-8 aktivasyonu için gerekli olan FADD ve TRADD ölüm domainleri ile de ilişkilidir (Declercq vd. 2009).



Şekil 2.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki bağlantı (Guido Kroemer, 2008)

PARP, hücre hasarı sonucu oluşan DNA kırıklarını tamir eden bir enzimdir. PARP enerji deposunu korumak için hızlıca parçalanır. Proinflatuar genlerin transkripsiyonunu başlatabilir. PARP, homodimerler oluşturur ve NAD⁺'nin nikotinamite parçalanmasını katalizler. Böylece enerji azalmasına neden olur. ATP'nin azalması hücrenin apoptoza gitmesini engeller. PARP aracılı ekprese olan genler fizyolojik inflammatuar yanıt oluşturabilirler (Jagtap ve Szabo 2005).

Nekroziste hücre içi Ca²⁺ artışı gözlenmektedir ve bu durum proteazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücre dışı Ca²⁺ miktarına bağlı olarak ligand bağımlı nekrozis başlayabilir. Endoplazmik retikulum'da Ca²⁺ depolayabilmektedir ve farklı koşullarda depoladığı Ca²⁺ sitozola salınır. Sitozoldeki Ca²⁺ mitokondri porlarının geçirgenliğini bozar ve nekroza neden olur. Kalpainler Ca²⁺ bağımlı sistein proteazlarıdır ve inaktif olarak sitozolde bulunmaktadır. Kalpain, kathepsinini aktive edip lizozomal membranın geçirgenliğinde bozulmaya yol açar (Zong ve Thompson 2006).

2.2.4. Apoptozis ile nekrozis arasındaki farklılıklar

Çizelge 2.2. Apoptozis ile nekrozis arasındaki farklar (Coşkun ve Özgür 2011)

ÖZELLİK	APOPTOZİS	NEKROZİS
Yol açan nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositleri	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres
Morfolojik özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organeller parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin translokasyonu yoktur
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektrofezinde merdiven)	İyon dengesi bozulur. ATP gerektirmez. DNA rastgele parçalanır (jel elektroforezinde smear)
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Enflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.

Konvansiyonel histolojiyi kullanarak apoptozu nekrozdan ayırt etmek her zaman kolay değildir ve uyarının yoğunluğu ve süresi, ATP tükenmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağlı olarak eşzamanlı ortaya çıkabilir (Zeiss, 2003). Nekrozis, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir işlemdir, oysa apoptozis kontrol edilir ve enerjiye bağlıdır ve bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir. Nekrotik hücre hasarına iki ana mekanizma aracılık eder; hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarına doğrudan hasar (Elmore 2007).

Nekrozis ile birlikte meydana gelen başlıca morfolojik değişikliklerin bazıları hücre şişmesini, sitoplazmik vakuollerin oluşumu, şişmiş endoplazmik retikulum, sitoplazmik kabarcıkların oluşumu, yoğunlaşmış, şişmiş veya yırtılmış mitokondri,

ribozomların ayrıştırılması ve ayrılması, parçalanmış organel membranları, şişmiş ve yırtılmış lizozomlar, ve sonunda hücre zarının bozulmasıdır. Bu hücre zarı bütünlüğünün kaybı, sitoplazmik içeriğin çevre dokuya salınması ile sonuçlanır ve nihayetinde enflamatuvar hücrelerin alınmasıyla kemotaktik sinyaller gönderir. Apoptotik hücreler hücresel bileşenlerini çevresindeki interstisyel dokuya salmadıkları ve makrofajlar veya bitişik normal hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagositoz oldukları için, esasen iltihaplanma reaksiyonu yoktur (Kerr vd. 1972; Savill ve Fadok 2000).

2.2.5. Apoptoz belirlemede kullanılan yöntemler

Sitomorfolojik değişim:

Apoptotik hücreler, eosin ve hematoksilin boyayarak ışık mikroskopunda incelenebilmektedir. Transmisyon elektron mikroskopunun (TEM) apoptozisi doğrulamak için altın standart olduğu düşünülmektedir. Eğer hücre apoptozun karakteristik özelliklerini içeriyorsa TEM ile kategorize edilebilmektedir. Bu özellikler; çekirdeğin yoğunlaşması, nükleer fragmentasyon (parçalanma), bozulmamış hücre membranı, organize olmayan sitoplazmik organel, büyük ve görünen vakuol, hücre yüzeyinde tomurcuk olarak sıralanabilir. Dezavantajları ise maliyetli, uzun süren ve küçük bir alanın gözlenebilir olmasıdır (Elmore 2007).

DNA fragmentasyonu:

Geç apoptozda oluşan, DNA'nın endonükleaz enzimlerince parçalanması agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilmektedir. DNA 180 bp'den oluşan merdiven şeklini oluşturur. Ancak agaroz jel elektroforezinde çok sayıda hücreye ihtiyaç vardır ve nekroz ile apoptoz arasında ayırım yapmak oldukça zordur (Wyllie 1980). Diğer bir yöntem olan TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling) metodu DNA kırıklarının tespit edilmesinde kullanılabilmektedir. Bu metotta DNA kırıklarının sonuna TdT enzimi ile işaretli UTP eklenir ve sonrasında ışık, floresan mikroskopu veya flow sitometri ile görüntülenir. Çok az sayıda hücre ile çalışılabilir. Diğer yandan nekrotik hücreleri ve DNA tamirindeki hücreleri de işaretleyebilmektedir (Archana vd. 2013).

İnhibitör, regülatör ve kaspazların tespiti:

Apoptozda rol oynayan kaspazlar western blot, immünopresipitasyon, immünokimyasal testlerle tespit edilebilmektedir. Hem prokaspazlar hem de aktif kaspazlar için antikorlar bulunmaktadır. Diğer bir yöntemde hücreler parçalanıp antikaspazlar bulunan mikro kuyucuklara konur. Sonrasında floresanla işaretlenip görüntülenir. Apoptozis PCR mikroarray yöntemi ile 112 gen ekspresyon profili incelenebilmektedir. Az miktarda mRNA yeterli olabilmektedir.

Membran değişimi:

Apoptozis sırasında hücrelerde fosfotidilserin dış plazma membranına yerleşmektedir. Fosfotidilserine annexin V bağlanarak apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Annexin V'ye FITC gibi bir boya bağlı olup floresan mikroskobu ile görüntülenir. Nekrotik hücreleri de boyamaktadır. Hücreler PI ya da DAPI gibi nükleus boyaları ile muamele edilir. Böylece membranı bozulan nekrotik hücre bu boyalarla boyandığından ayırım kolaylaşır (Martinez vd. 2010).

Mitokondrial deney:

Sitokrom c iç ve dış mitokondri membranının arasında bulunmaktadır. Apoptotik uyaranlar sitokrom c'nin sitozola salınımını indüklemektedir. Sitokrom c, western blot ve elisa testi ile belirlenebilmektedir. Western ile ayrıca kaspazlar, bid, FADD, bcl-2, bax gibi apoptotik proteinlerde tespit edilebilmektedir. Elisa testi apoptoza göre daha hassas olup birkaç saatte gerçekleşmektedir. Mitokondri membran potansiyelinin bozulması sitokrom c'nin salınımına neden olur. Mitokondri membran potansiyeli floresan bazlı metod ile değerlendirilmektedir (Banfalvi 2017).

2.3. Hücre Hatları**2.3.1. Kolon kanser hücre hattı (HT29)**

İnsan kolon adenokarsinom hücre çizgisi HT29, 1964'te 44 yaşındaki Kafkas kadınının primer tümöründen Fogh ve Trempe tarafından izole edildi. O zamandan beri, birçok hücre hatları insan kolon kanserlerinden elde edilmiştir. Başlangıçta, bu hücre hattı insan kanserinin biyolojisinin farklı yönlerini incelemek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu hücreler, enterositler veya mukus üreten hücreler gibi olgun bağırsak hücrelerinin özelliklerini ifade edebilmeleri nedeniyle dikkat çekmiştir (Martínez-Maqueda vd. 2015).

Kolon ve rektum kanserleri için adjuvan fluoropirimidin ile tedavi, evre III'te evre II hastalığından daha fazla sağkalımı arttırır ve oksaliplatin bazlı kombinasyon kemoterapi, rutin olarak evre III hastalık için kullanılır, ancak etkinlik toksisiteye karşı dikkatlice dengelenmek zorundadır. II. Aşama hastalıkta, mikro uydu kararsızlığı gibi moleküler markerler, tedavi için hastaların seçilmesine yardımcı olabilir. Hedeflenen tedavilerin konvansiyonel sitotoksik ilaçlarla entegrasyonu, artımlı sağkalım kazanımlarına yol açan metastatik hastalığın tedavisini genişletti (Cunningham vd. 2010).

Yaşam boyu kolorektal kanser riski, şahsi öyküsü veya ailesinde kolorektal kanser öyküsü olmayan ve 50 yaş üstü olarak tanımlanan; ortalama riskli bir kişide %5-6'dır. Kolorektal kanserli birinci derece ve/veya ikinci derece akrabaların katılımı söz konusu olduğunda bu oran %20'ye kadar artar ve kalıtsal polipozal olmayan kolorektal

kanser gibi kalıtsal kolorektal kanser sendromlarında yaşam boyu % 80-100 riskine ulaşır (Rustgi 2007).

Kolorektal kansere yatkınlığın bazı ailelerde kromozom 2 üzerindeki markırlara bağlı olduğu gösterilmiştir. Ailevi kanserlerin moleküler özellikleri sporadik kolon kanserlerinininkilerle karşılaştırıldı. Ne ailesel ne de sporadik kanserler, kromozom 2 markırları için heterozigotluk kaybı göstermedi ve KRAS, P53 ve APC'de mutasyon insidansı, iki tümör grubunda benzerdi. Ancak ailesel kanserlerin çoğunda kısa süreli tekrarlanan DNA dizilerinde yaygın değişiklikler, tümör gelişimi sırasında çok sayıda çoğaltma hatasının meydana geldiğini düşündürmektedir (Aaltonen vd. 1993).

Kolon kanseri (kolorektal adenokarsinoma), sindirim sisteminden gelen epitelyal hücrelerin, belirli kanser yapıcılar ve/veya tümör baskılayıcı genlerdeki ardışık genetik ve epigenetik mutasyonları sonucunda çoğalma ve kendini yenileme üzerinde avantaj sağladığı durumda ortaya çıkar (Pancione vd. 2012; Ewing vd. 2014). Tüm kolon kanseri türlerinin yaklaşık %70'ini somatik mutasyonlara bağlı sporadik kolon kanserleri (CRC) oluşturur. Ailesel CRC, Mendelian kalıtım göstermez ancak kanser oluşumu için ailesel bir yatkınlığın %10-30, kalıtsal hastalıkların ise %5-7 oranında etkili olduğu gösterilmiştir (Burt 2000).

Hastalığın ailesel tipinden, onkogen ya da tümör baskılayıcı genlerdeki tek nükleotid polimorfizmleri ve/veya germline minör varyantlar sorumluyken aynı genlerdeki inaktive edici mutasyonlar kalıtsal CRC'den sorumludur (Jasperson vd. 2010; Duraturo vd. 2011). Normal sindirim sistemi epitel hücreleri kript-villus hattı boyunca organize olurlar. Kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip, en az farklılaşmış hücre tipleri olan kolon kök ve progenitör hücrelerinden oluşan bir bölüm kriptin en dibinde bulunur. Bu hücreler kript-villus düzlemi boyunca göç ederken aynı zamanda paneth, goblet, enterositler gibi epitel kolon hücresi soylarına farklılaşırlar. Yaklaşık olarak 14 gün süren yolculukları sonucunda villusun en üst kısmına gelirler ve apoptoza uğrarlar (Kosinski vd. 2007). Bu süreç, hücre nişini oluşturan hücre dışı matriks ve stromal hücreler ile birlikte Wnt, BMP ve TGF- β gibi bir grup protein tarafından organize edilir (Medema ve Vermeulen 2011).

Moleküler seviyede, CRC'lerin genomik bütünlüğündeki kayıp sonucu çoklu mutasyonların birikimine olan yatkınlık, CRC'lerin çok heterojenik bir hastalık türü olmasına yol açar. Örnek olarak kromozomlarda ve mikrosatellitlerde oluşan kararsızlıklar, anormal DNA metilasyonu ve tamir kusurları, kolorektal epitel hücre dönüşümüne müdahil olan mekanizmalardır ve CRC'lerin oluşumunda çok önemli bir rol oynarlar (Goel vd. 2007; Pino ve Chung 2010). Wnt/APC/ β -katenin, fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)/AKT/glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), transforming growth faktör- β (TGF)- β /Smad, NF- κ B ya da onarım genlerindeki yanlış eşleşmeler gibi çeşitli değişmiş sinyal yolları CRC oluşumuna müdahil olurlar. Bu değişiklikler hücrelerin

kansere karşı duyarlılık kazanmasından ve anti tümör ajanlarına karşı yanıtızsızlık veya direnç göstermesinden sorumludur (Markowitz ve Bertagnolli 2009).

2.3.2. Fibroblast (BJ)

Fibroblast hücreleri hayvan dokularında hücre dışı matriks ve kollajen meydana getirerek yapısal iskeleti oluşturmaktadır. Fibroblastlar geniş, düz ve uzun bir hücre şekline sahiptirler. Bu tür hücreler bağ dokuda en çok bulunan hücreler olup yara iyileşmesinde rol almaktadır. Bütün bağ doku hücrelerinin de olduğu gibi bütün fibroblastlar primitif mezenşimden türemiştir (Gregoire ve Lieubeau 1995).

Fibroblastlar yara dokusunda lökositleri çağırma ve inflamasyonu başlatmada önemli roller oynamaktadır. Fibroblastlar vücut içerisinde neredeyse her yerde bulunan hücreler olup diğer hücrelerin işlev ve göçüne yardımcı olurlar. Örneğin; infeksiyöz mikroorganizmalar, doku yaralanmalarında aktive olduklarında, kemik iliğinden oluşan hücreleri kemokinler ile çağırırlar (Smith vd. 1997). Fibroblastlar, çeşitli parakrin immün modülatörler olan peptit büyüme faktörleri, kemokinler ve düşük molekül ağırlıklı inflamatuvar mediyatörleri üretebilirler. Bu hücrelerin, doku yaralanmalarında ve kronik inflamatuvarda gözcü hücre olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, mikroçevre efektörleri olarak tümör gelişimi ve ilerlemesinde fibroblastların da dahil olduğuna dair kanıtlar vardır. Tümör ilişkili fibroblastlar tümör doku aracılı bağışıklığın baskılamasına katkı sağlayabilir (Sizle vd. 2004).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hücre Kültürü

Kullanılan solüsyonlar;

- ✓ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(BI, #01-055-1A)
- ✓ Fetal Sığır Serum (FBS)(BI, #04-007-1A)
- ✓ Antibiyotik (100X)(Biowest, # L0010-020)
- ✓ L-glutamin: GlutaMAX™-I (Gibco, # A1286001)
- ✓ Temel olmayan amino-asit (100X)(BI, #01-340-1B)
- ✓ Tripsin enzimi: TrypLE™ Select Enzyme (1X)(Gibco, #12563029)
- ✓ Dimetil Sülfoksit (DMSO)(Santa Cruz, # sc-202581)
- ✓ Fosfat Tamponu: Phosphate Buffered Saline (PBS)(Biowest, # P0750-N1L)

Kullanılan Cihazlar;

- ✓ Steril Kabin: Class II Safety Cabinet
- ✓ İnkübatör: Thermo Scientific, 3141 (Karbondiyoksit, 37 °C)
- ✓ Sıcak Su Banyosu (Isolab, 5-99 °C)
- ✓ Mikroskop: Zeiss Primovert
- ✓ Soğutmalı Santrifüj: SIGMA 2-16P Centrifuge 2-16kl
- ✓ Buzdolabı: Vestel
- ✓ Dondurucu: Thermo Fisher Scientific (88-400V)
- ✓ Sıvı Azot Tankı: Thermo Fisher Scientific (# CY509106)

Karışımların Hazırlanışı:

Hücre kültür ortamı: 435 ml DMEM besiyerinin içerisine %10 FBS, %1 Antibiyotik, %1 Temel olmayan aminoasit, %1 L-glutamin konularak hazırlandı.

Dondurma kültür ortamı: 8 ml hücre kültür ortamının içerisine 2 ml (%2) DMSO konularak hazırlandı.

Bu tezde kullanılan BJ (fibroblast) ve HT29 (kolorektal adenokarsinoma) hücre hatları ATCC'den satın alındı. Hücre kültürünün işlemleri ve hücre kültür ortamı hazırlama UV lambalı steril Class II biyogüvenlik kabin içinde gerçekleştirildi. Steril kabinde çalışmadan önce 30 dk UV lambası açık bırakıldı.

Hücre kültür ortamı hazırlamada DMEM (+4 °C), FBS (-20 °C), antibiyotik (-20 °C), L-glutamin (+4 °C) ve temel olmayan aminoasit (+4 °C) kullanıldı. Buzdolabın da -20 °C'de saklanan malzemeler oda sıcaklığında eritildi. UV kapatıldıktan sonra %70'lik alkol ile steril kabin içerisi silindi. Sonrasında içeriye alınan her malzeme alkollenip peçeteye silinerek steril kabine alındı. Hücre kültür ortamı hazırlamak için 435 ml DMEM besiyerinin içine 50 ml FBS, 5 ml antibiyotik, 5 ml L-glutamin, 5 ml temel olmayan aminoasit eklendi. Buzdolabında +4 °C'de kullanılmak üzere muhafaza edildi. Hücre kültür ortamı hazırlandıktan sonra 1 ay içerisinde kullanılmalıdır. Her kullanımda

steril kabinde 50 ml falkonlara bölünerek 37 °C inkübatörde ısıtılarak kullanıldı. Su banyosu 37 °C'ye ayarlandı. Sıvı azottan (-196 °C) hücrelerin bulunduğu dondurma tüpü çıkarıldı. 37 °C'lik su banyosunda eritildi. Pipet ile 15 ml'lik falkona alınan hücrelerin üzerine ısıtılmış hücre kültür ortamı damla damla konuldu. Sonrasında 12 ml'ye tamamlanarak 400 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml hücre kültür ortamı ile pipetaj yapıldı. Üzerine 11 ml hücre kültür ortamı eklenerek 75 cm²'lik hücre kültürü flasksına ekimi yapıldı. Bir gün sonra hücreler tamamen yapıştı. Üç günde bir hücre kültür ortamı değişimi yapıldı. Hücre kültür ortamı çekilip 10 ml PBS ile hücreler yıkanır. Tekrar inkübatörde ısıtılmış 12 ml hücre kültür ortamı 75 cm²'lik flaska konuldu. 37 °C'lik %5'lik CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildi.

3.1.1. Hücre sayımı

Hücre peleti 1 ml hücre kültür ortamı içinde süspanse edildikten sonra 3 ml hücre kültür ortamı daha eklendi. Hücrelerin homojen dağılması sağlandıktan sonra 90 µl hücre kültür ortamının içine 10 µl hücre kültür ortamı konularak 1/10 oranında seyreltilti. Bu hücre süspansiyonundan 11 µl alınıp üzerine lamel yerleştirilmiş thoma lamına yavaşça kenarından konur. Bu işlemten sonra mikroskop altında 20X büyütmede hücre sayımı yapılır. Thoma lamı iki kareden oluşur ve bu kareler de dokuz küçük kareden oluşmaktadır. Sayım yaparken dokuz karede sayıldı. Sonrasında iki büyük karenin ortalaması alındı. Aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayısı hesaplandı;

$$1 \text{ ml'deki hücre sayısı: } \frac{A}{9} * 10,000 * \text{dilüsyon faktörü} \quad (3.1.)$$

A: İki büyük karedeki hücrelerin toplanıp ortalamalarının alınmasını ifade etmektedir.

3.1.2. Hücre pasajlanması ve dondurulması

Hücreler %90 oranında flasksın yüzeyini kaplandığında pasajlandı. Öncelikle hücre kültür ortamı uzaklaştırılarak 10 ml PBS ile hücreler yıkanır. Hücrelerin üzerine 3 ml tripsin konuldu. Enzimi aktif çalışması için 37 °C'deki inkübatörde 3 dk bekletildi. Sonrasında bir zemine vurularak hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Mikroskop ile kontrol edildi. Tripsini inhibe etmek için 9 ml hücre kültür ortamı konularak hepsi 15 ml'lik falkona alındı. 400 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml hücre kültür ortamı ile pipetaj yapıldı. Hücrelerin üzerine 11 ml hücre kültür ortamı eklenerek flaska konuldu. İnkübatöre yerleştirilerek üç günde bir hücre kültür ortamı değişimi yapıldı.

Hücreler 1 ml kültür ortamı içinde süspanse edildikten sonra 1.5 ml daha kültür ortamı eklendi. Her bir dondurma tüpüne (1 ml) 500 µl hücre süspansiyonu konuldu. -20 °C'de saklanan ve önceden hazırlanmış dondurma kültür ortamı eritildi. Hücrelerin üzerine 500 µl dondurma kültür ortamı eklendi. Dondurma tüpleri dondurma kabına konulup bir gece -80 °C saklandı. Daha sonrasında -196 °C'lik sıvı azota yerleştirildi.

3.2. Bitki Ekstraktının Hazırlanışı

Epilobium parviflorum tohumları The Strictly Medicinal Seeds Company, OR, ABD'den satın alınmıştır. Tohumlar ayrı ayrı torf içeren 20 cm karelik saksılara ekildi. Bitkiler, bir bitki büyüme odasında 24 °C'de ve %60 bağıl nemde 16 saat aydınlık/8 saat karanlık döngüsü altında büyütüldü. Her gün yarı güçte Hoagland'ın sıvı ortamıyla sulandılar. Olgunluğa ulaştıktan sonra (2 aylık), bitkilerin hava kısımları toplandı ve oda sıcaklığında gölge kurutuldu.

Bitki ekstraktları Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nuraniye ERUYGUR tarafından hazırlandı. Bitki ekstraktları kullanılabilecek kadar +4 °C'de dolapta saklandı.

Etanol ekstraktının hazırlanması:

Toz hale getirilmiş bitki materyalinden 35 g tartılarak 50 ml etanol ile karıştırılıp, karıştırıcıda 24 saat maserasyona bırakıldı. Süzildükten sonra bitki küspesi üzerine tekrar eşit hacimde 50 ml etanol eklenerek ekstraksiyon işlemi en az 2 kez tekrarlandı. Sıvı kısımlar birleştirildikten sonra, rotavaporda yoğunlaştırılarak verimleri hesaplandı (13.61 g, verim: %38.89).

Etanol ekstraktlarından alt ekstraktların hazırlanması:

Elde edilen etanollü ekstraktlardan çözücü-çözücü ekstraksiyon işlemiyle alt ekstraktlarına ayrıldı. Etanollü ekstrakt, distile suda süspanse edilerek, hekzan ile çalkalandı. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonrası hekzanlı kısım ayrılarak sulu kısım tekrar hekzan ile çalkalanır (10 defa). Ayrılan hekzanlı kısımlar birleştirilerek yoğunlaştırılır (0.23 g, verim: %2.21). Kalan kısım ise kalan su alt ekstraktı olarak yoğunlaştırılır (5.095 g, verim: %48.99). Gelen ekstraktların üzerine 10 ml PBS konuldu ve vorteks yapılarak homojenize edildi. Dilüsyonlar hücre kültür ortamı içerisinde her deney için ayrı hazırlandı.

3.3. MTT Proliferasyon Testi ile Hücre Dozlarının Belirlenmesi

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- ✓ MTT (Merk, #475989-1GM)
- ✓ Thoma Lamı (Sigma-Aldrich, #Z359629-1EA)
- ✓ Dimetil Sülfoksit (DMSO)(Santa Cruz, # sc-202581)
- ✓ Spektrofotometre: Microplate Spectrophotometer (Thermo fisher scientific)
- ✓ İnkübatör: CO₂ inkubators (Thermo Scientific)
- ✓ Hücre kültür ortamı
 - DMEM Besiyeri (BI, #01-055-1A)
 - %10 FBS (BI, #04-007-1A)
 - %1 Antibiyotik (100X)(Biowest, # L0010-020)

- L-glutamin: GlutaMAX™-I (Gibco, # A1286001)
- Temel olmayan amino-asit (100X)(BI, #01-340-1B)

MTT hücrelerin canlılığının belirlendiği bir yöntemdir. MTT bir tetralium tuzu olup canlı hücrelerin mitokondrialarında indirgenme reaksiyonu ile mor formazan kristallerine dönüştürülür (Berridge vd. 2005). Formazan DMSO gibi bir çözücüde homojen hale getirilir. Bu renk spektrofotometrede okutularak absorbanans değerleri elde edilir. Bu değerden canlı hücre oranı hesaplanır.

HT29, BJ ve hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 100 µl hücre kültür ortamı içinde 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. MTT solüsyonu PBS'in içinde 5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlandı. Toz halindeki bitki ekstraktları 10 ml PBS içinde çözdürüldü. *Epilobium parviflorum*'dan etanol ile elde edilen ekstraktı 5000, 2000, 1000, 100 µg/ml konsantrasyonları 100 µl hücre kültür ortamı içinde hazırlandı. Hekzan ve su ile elde edilen ekstraktlar 1000, 500, 300, 100 µg/ml konsantrasyonları 100 µl hücre kültür ortamı içinde hazırlandı. 100 µl ekstraktlar hücreler ile 48 ve 72 saat muamele edildi. Uygulamadan 48 ve 72 saat sonra 30 µl MTT solüsyonundan her kuyucuğa eklendi. Plakalar 37 °C'de 4 saat inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp, 100 µl DMSO formazani çözmek için her kuyucuğa eklendi. Spektrofotometrede mor formazan 570 nm okutuldu ve arkaplan 690 nm'de ölçülüp bu değerler birbirinden çıkartıldı. IC₅₀ değeri GraphPad Prism 7 programı ile hesaplandı. Hücre canlılığı 3.2 numaralı formül ile hesaplandı;

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}_{(570-690 \text{ nm})}}{\text{Kontrol Absorbansı}_{(570-690 \text{ nm})}} * 100 \quad (3.1.)$$

3.4. qRT-PCR Analizi

qRT-PCR gen ekspresyonundaki değişimi göreceli olarak hesaplamamızı sağlayan bir yöntemdir. Bu deneyde BJ ve HT29 hücre hatlarına *Epilobium parviflorum* 'dan hekzan, etanol ve su ile ekstrakte edilmiş ekstraktların IC₅₀ dozları uygulandı. Bir gün inkübe edildikten sonra aşağıda sıralanan total RNA izolasyonu, izole edilen RNA'lara DNaz Uygulaması, cDNA eldesi, qRT-PCR deneyleri gerçekleştirildi.

3.4.1. Total RNA izolasyonu

Kullanılan cihaz, solüsyon ve malzemeler;

- ✓ Dondurucu (Thermo Fisher Scientific,88-400V)(-80 °C)
- ✓ Mikrosantrifüj (Thermo Scientific, MicroCL 17)
- ✓ Vorteks (Isolab)
- ✓ Etanol (Merck, #100983)
- ✓ β-merkaptotanol (Sigma-Aldrich, #60-24-2)
- ✓ RNA İzolasyon kiti: GeneJET RNA İzolasyon Kiti (Thermo Scientific,#K0731)

- Proteinaz K
- Lizis Buffer
- Yıkama Buffer 1
- Yıkama Buffer 2
- Nükleaz içermeyen su
- GeneJET RNA İzolasyon Kolonu (Toplama Tüpü ile birleştirilmiş)
- Toplama Tüpü (3 ml)
- RNA bulunmayan ependorf (1.5 ml)

Kimyasalların hazırlanışı:

Yıkama tamponu 1'in hazırlanışı: 40 ml yıkama tamponu 1'in üzerine 10 ml etanol (%99) eklendi.

Yıkama tamponu 2'nin hazırlanışı: 23 ml yıkama tamponu 2'nin üzerine 39 ml etanol eklendi.

Lizis tamponunun hazırlanışı: 2.5 ml Lizis tamponu üzerine 50 µl β-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

Hücrelerin 75 cm²'lik hücre kültürü flaskına ekimi yapıldı. İki günde bir hücre kültür ortamları değiştirilerek çoğalmaları sağlandı. Etanol, hekzan ve sulu bitki ekstraktının IC₅₀ konsantrasyonları 2 ml içinde hazırlandı. Hücrelerin üzerinden hücre kültür ortamı çekilip hazırlanan konsantrasyonlar uygulandı. 24 saat uygulamadan sonra aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

Önce Lysis Buffer karışımı hazırlandı. HT29 hücrelerinin üzerinde hücre kültür ortamları çekilerek iki kez 2 ml PBS ile yıkandı. 6 kuyucuklu plakaların her birine 300 µl Lysis Buffer eklendi. Pipet ucuyla kazıyarak hücrelerin parçalanması sağlandı. 300 µl daha eklenip geri kalan hücreler aynı şekilde toplandı. 4 tane örnek ependorflara toplanıp, üzerlerine 360 µl etanol eklendi. Sonrasında pipetaj yapıldı. GeneJET RNA izolasyon kolonuna 700 µl koyularak 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki (3ml) sıvı uzaklaştırılarak bu işlem tekrarlandı. Sonrasında GeneJET RNA izolasyon kolonu yeni bir toplama tüpüne alındı. GeneJET RNA izolasyon kolonu üzerine 700 µl yıkama tamponu 1 eklenerek 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. 600 µl yıkama tamponu 2, GeneJET RNA izolasyon kolonun üzerine konularak 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpün 'deki sıvı uzaklaştırıldı. Tekrar 250 µl yıkama tamponu 2, kolonun üzerine eklendi. 2 dk 12000 g'de santrifüj edildi. GeneJET RNA izolasyon kolonu RNaz bulunmayan ependorfa transfer edildi. Kolon membranının tam üzerine 50 µl nükleaz bulunmayan su konularak 3 dk bekletildi. 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Bu işlem tekrarlandı. 100 µl total RNA elde edildi. Örnekler diğer deneylerde kullanılabilecek kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.4.2. İzole edilen RNA'lara DNaz uygulaması

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ✓ Spektrofotometre: BioDrop-μLITE (Isogen, 80-3006-51)
- ✓ Santrifüj Mini (Isolab)
- ✓ PCR cihazı: T100 Thermal Cyclers (Biorad, #1861096)
- ✓ RQ1 RNaz içermeyen DNaz (Promega, #M6101)
 - RQ1 RNaz bulunmayan DNaz
 - Durdurma solüsyonu
 - RQ1 DNaz 10X Reaksiyon Tamponu

Total RNA'den cDNA sentezi RQ1 RNaz içermeyen DNase kiti ile gerçekleştirildi. Her bir örnekten 8 μl RNA alınarak 0.2 μl'lik ependorflara konuldu. Üzerlerine 1 μl RQ1 DNaz 10X Reaksiyon tamponu ve 1 μl RQ1 RNaz bulunmayan DNaz konuldu. DNaz enziminin çalışması için PCR cihazında 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için 1 μl durdurma solution konuldu. PCR cihazında 65 °C'de 10 dk inkübe edilerek DNaz tamamen inaktive edildi. BioDrop cihazında miktar ve saflığı kontrol edildi. *Gapdh* primer (Tablo 3.3) ile PCR yapılarak genomik DNA'nın parçalandığı doğrulandı. Örnekler -80 °C'de muhafaza edildi.

3.4.3. cDNA eldesi

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ✓ PCR cihazı: T100 Thermal Cyclers (Biorad, #1861096)
- ✓ Santrifüj Mini (Isolab)
- ✓ iScript™ cDNA Sentez Kiti, Biorad, #1708890
 - 5x iScript reaksiyon karışımı
 - Nükleaz içermeyen su
 - iScript geri transkriptaz

Çizelge 3.1. cDNA sentezinde gereken solüsyonlar

İçerik	Hacim (μl)
5X iScript reaksiyon karışımı	4
iScript geri transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen su	X
RNA kalıbı (100 fg-1 μg)	X
Toplam	20

Nanodrop ile RNA örneklerini miktarı ve saflığı belirlendi. Her bir örnekten 500 ng'a karşılık gelen hacimde RNA alınarak 0.2 µl'lik ependorflara konuldu. Sonrasında nükleaz içermeyen su ile 15 µl'ye tamamlandı. 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı ve 1 µl iScript geri transkriptaz eklenerek pipetaj yapıldı. PCR cihazında Çizelge 3.2'de belirtilen sürede ve sıcaklıkta inkübe edildi. cDNA sentezinden sonra örnekler -20 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.2. cDNA sentezinde kullanılan sıcaklık ve inkübasyon süreleri

Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
5	25
30	42
5	85
∞	4

3.4.4. qRT-PCR uygulama basamakları

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ✓ LightCycler® 96 Instrument qRT-PCR cihazı (Roche)
- ✓ Santrifüj ROTINA 420 R (Hettich)
- ✓ Primerler (Çizelge 3.3)(Sentegen)
- ✓ Nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific™,#R0582)
- ✓ Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific™,#K0251)

Çizelge 3.3. Primerlerin özelliklerini gösteren çizelge; F:İleri Primer, R: Geri Primer

NCBI Numarası	Gen	Primer (5'→3')	Tm(°C)	Uzunluk (bp)
NM_004346.3	<i>Caspase 3</i>	F:GCACTGGAATGACATCTCGGTC R:ATGGCTCAGAAGCACACAAACA	61	191
NM_001228.4	<i>Caspase 8</i>	F:ATGAAAAGCAAACCTCGGGGATAC R:GTGCCATAGATGATGCCCTTGTC	61	296
NM_000546.5	<i>P53</i>	F:CTGCTCAGATAGCGATGGTCTGG R:AACCTCAGGCGGCTCATAGG	62	133
NM_002046.6	<i>Gapdh</i>	F:GGGCTCTCCAGAACATCATCCC R:GGTCCACCACTGACACGTTG	61	132
NM_001291428.1	<i>Bax</i>	F:AGTGTCTCAAGCGCATCGGG R:TGTCCACGGCGGCAATCA	62	72

Primerler NCBI programı ile dizayn edildi (Çizelge 3.3). Primerin dimer oluşturma özellikleri kontrol edildi. Öncelikle firmadan gelen primerler 100 µM olacak şekilde sulandırıldı. Sonrasında bu primerler 1/10 oranında qRT-PCR'de kullanılmak üzere tekrar sulandırıldı. cDNA sentezinde elde edilen ürünler 1/20 oranında dilüe edildi. Çizelge 3.4'te belirtilen miktarlarda malzemelerden konuldu.

Çizelge 3.4. qRT-PCR'da kullanılan malzemeleri gösteren çizelge

İçerik	Miktar (µl)
SYBR qPCR karışımı	6.25
İleri primer	0.3
Geri primer	0.3
Nükleaz içermeyen su	4.15
cDNA	2
Toplam	12.5

Oluşturulan karışım pipetaj yapılarak 96 kuyucuklu qPCR plakalarına konuldu. Daha sonrasında 2 µl cDNA'lar dağıtıldı. Plakalar bir dakika santrifüj edilerek dipe çökmesi sağlandı. qPCR cihazında program ayarlandı ve 40 döngü gerçekleştirildi. Erime eğrisi analizi ile qPCR ürünlerin spesifikliği ve primerlerin dimer yapıp yapmadığı değerlendirildi. Döngü ve erime eğrisi Çizelge 3.5'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. qRT-PCR inkübasyon sürelerini gösteren çizelge

	Sıcaklık(°C)	Zaman(sn)	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	600	1
Denatürasyon	95	15	40
Yapışma ve uzama	60	60	
Erime Eğrisi	95	10	1
	65	60	1
	97	1	1

Genlerin relatif ekspresyon değişimleri $\Delta\Delta Ct$ metodu ile hesaplandı. Sonuçlar Gapdh'e göre normalize edildi. Hesaplamalar için aşağıda verilen 3.3 numaralı formül kullanıldı.

$$\text{Ekspresyon Değişimi} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{Örnek})} - \Delta Ct_{(\text{Kontrol})} \quad (3.3.)$$

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{Hedef Gen})} - Ct_{(\text{Housekeeping Gen})}$$

3.5. TUNEL Testi

Kullanılan cihaz ve malzemeler;

- ✓ Paraformaldehit (Merck, #104005)
- ✓ Etanol (Merck, #100983)
- ✓ Fosfat Tamponu: Phosphate Buffered Saline (PBS)(Biowest, # P0750-N1L)
- ✓ Flow Sitometri cihazı: BD FACSCanto II
- ✓ Flow tüpü (Fisher Scientific, #352054)
- ✓ Soğutmalı Santrifüj (SIGMA 2-16P)
- ✓ APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor™ 488 Anti-BrdU (Invitrogen, #A23210)
 - Pozitif kontrol hücreleri
 - Negatif kontrol hücreleri
 - Terminal deoksinükleotidil transferaz
 - 5-Bromo-2'-deoksiüridin 5'-trifosfat (BrdUTP)
 - Anti-BrdU fare monoklonal antikör PRB-1, Alexa Fluor 488 konjugat
 - Propidium iyodür /RNaz A boyama tamponu
 - Reaksiyon tamponu
 - Yıkama tamponu
 - Durulama tamponu

Apoptozisin neden olduğu hücre yıkımı nükleazları aktive ederek DNA kırıklarına neden olur. Bu DNA parçaları 200 bp uzunlukta olmaktadır. Bu parçaların sonunda 3'-OH bulunmaktadır. TUNEL testinde bulunan terminal deoksinnükleotidil transferaz enzimi 3'-OH bölümüne BrdUTP (5-bromo-2'-deoksiüridin 5'-trifosfat) eklemektedir (Graslkrepp vd. 1995). Sonrasında Alexa Fluor boyalı anti-BrdU antikoru ile uygulanarak belirlenebilir hale getirilir.

1. Hücrelerin 6 kuyucuklu plakalara 7×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldı. Ekimden 24 saat bitki ekstraktları ile muamele edildi. 2 ml hücre kültür ortamı içinde konsantrasyonlar oluşturulup 2 gün hücrelerle inkübe edildi.
2. Sonrasında hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsinize edildi. Hücre kültür ortamı ile tripsin etkisizleştirilip 400 g'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.
3. Süpernatant uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 500 µl PBS eklenip, pipetaj yapıldı.
4. Bu süspansiyonun üzerine 5 ml %1'lik paraformaldehit konup 15 dk buz içinde bekletildi.
5. 5 dk 300 g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
6. Pelet halindeki hücreler 5 ml PBS ile yıkandı. Bu işlem tekrarlandı.
7. Hücreler 500 µl PBS ile süspanse edildi.
8. Üzerine 5 ml %70'lik soğuk etanol eklendi ve bir gece -20 °C'e konuldu.

Bu aşamadan sonra kitin pozitif ve negatif kontrolü ve kendi örneklerimiz için aynı basamaklar uygulandı.

9. Kitin pozitif ve negatif kontrolü alt üst edildi. Her birinden 1 ml (yaklaşık 1×10^6 hücre/ml) alınarak flow santrifüj tüpüne konuldu. Bir gece -20 °C bekletilen örneklerle birlikte 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. %70'lik etanol hücre peletine dikkat edilerek uzaklaştırıldı.
10. Her bir tüpe 1ml yıkama tamponu eklendi. 400 g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem tekrarlandı.
11. DNA işaretleme hazırlaması; 10 µl reaksiyon buffer, 0.75 µl TdT enzimi, 8 µl BrdUTP ve 31.25 µl dH₂O eklenerek hazırlandı. Bu sayılar bir örnek içindir ve sonrasında örnek sayısı ile çarpıldı. Bu solüsyon aktifliğini sadece 24 saat boyunca korumaktadır.
12. Hücreler DNA işaretleme solüsyonu ile bir gece inkübe edildi.
13. İnkübasyon sonrasında 1 ml durulama tamponu her bir tüpe eklendi. 400 g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem tekrarlandı.
14. Antikoru işaretleme solüsyonu 5 µl Alexa Fluor 488 boyası ile işaretlenmiş anti-BrdU antikoru 95 µl rinse bufferın içine konularak hazırlandı.

15. Hücreler 100 µl antikor solüsyonu ile süspanse edildi. Sonrasında 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler inkübasyon sırasında ışıktan korundu.
16. 500 µl propidyum iyodür her örneğe eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
17. Örnekler flow sitometri ile analiz edildi.

TUNEL testinin sonucu BD FACS Canto cihazı ile analiz edildi. DNA kırıkları Alexa Fluor boyalı anti-BrdU antikor ile işaretlendi. PI bütün kromozoma bağlanarak hücre döngüleri olan G₁, S, G₂ evrelerini analiz etmemizi sağlamıştır. Flow sitometri sonuçları Flow Jo programı ile analiz edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

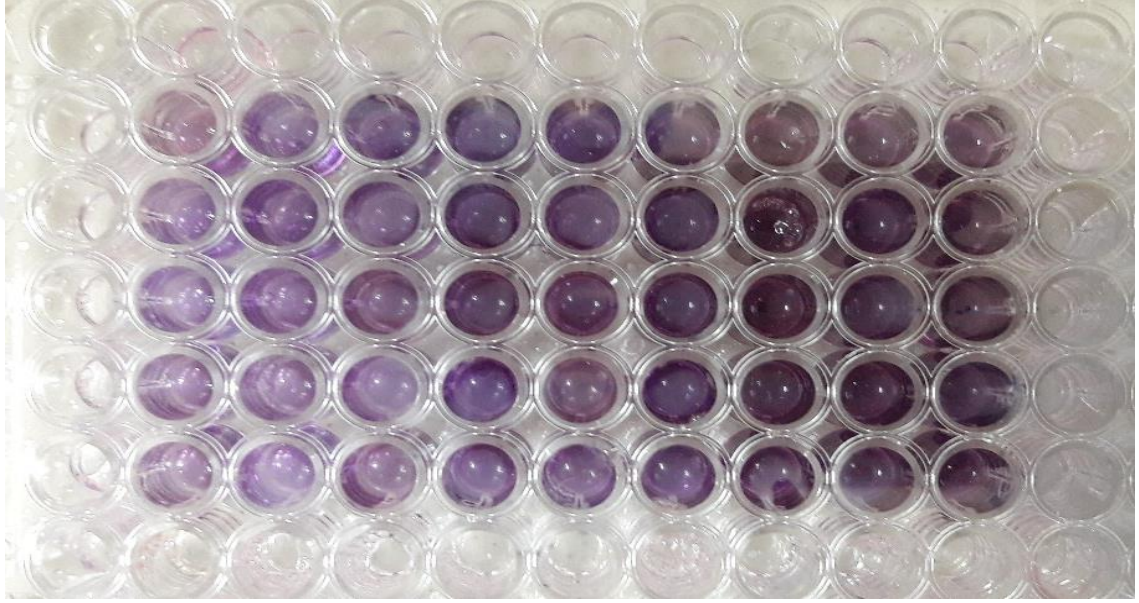
MTT denemelerinde bitki ekstraktının konsantrasyonları arasındaki farkın analizinde her bir değişken için ayrı ayrı Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) yapılmıştır. Anlamlı çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalar bonferroni ile elde edilmiştir. Analizler için SAS 9.4 programı kullanılmıştır. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

qRT-PCR denemelerinde gen ekspresyon değişimlerinin analizinde her bir değişken için ayrı ayrı Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) yapılmıştır. Anlamlı çıkan durumlarda ikili karşılaştırmalar bonferroni ile elde edilmiştir. Analizler için Sigma Stat32 programı kullanılmıştır. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

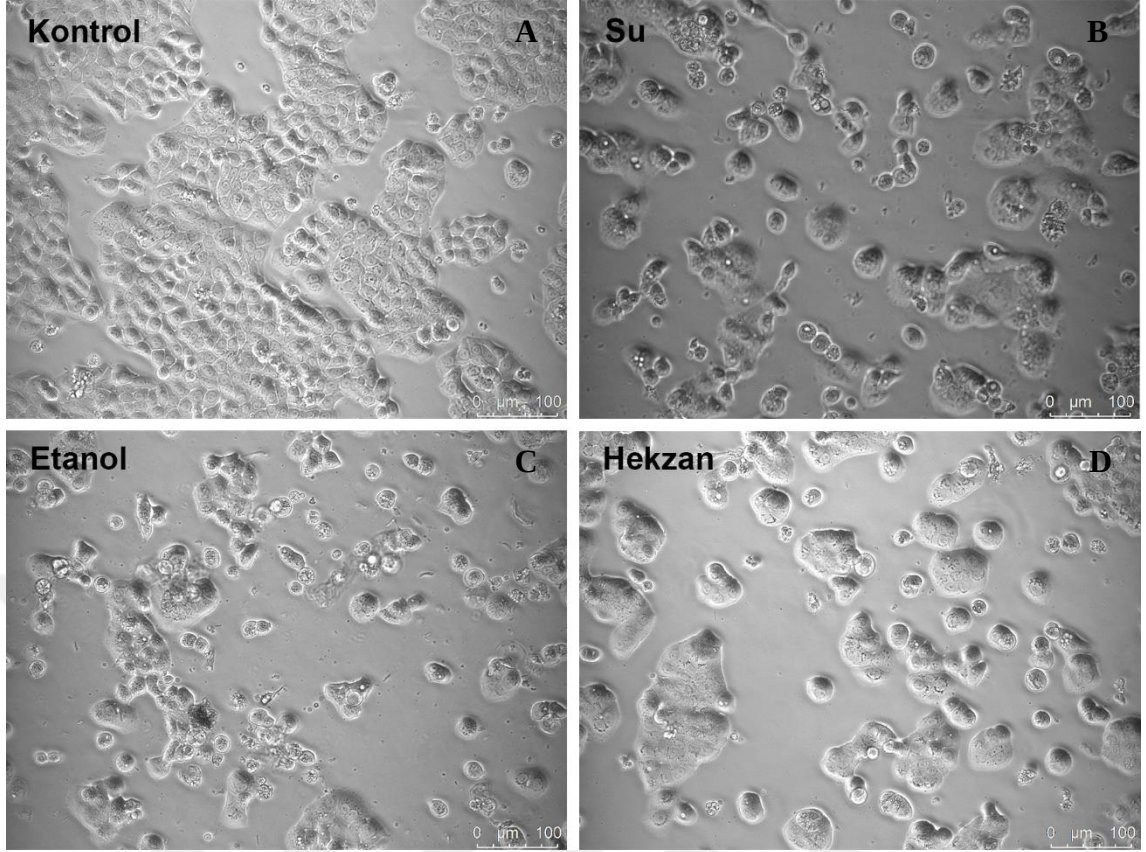
4. BULGULAR

4.1. Hücre Proliferasyon Testi (MTT) Sonuçları

Canlı hücreler tetrazolium tuzu olan MTT'yi indirgenme reaksiyonu ile mitokondrilerinde mor formazan dönüştürürler. Bu formazan suda çözünmez ve hücrelerin içinde birikir. DMSO ve HCl gibi çözücülerle hücre dışına çıkartılarak absorbensı ölçülür. Bir kuyucuktaki hücre sayısına göre mor renk yoğunluğu artmaktadır. Pembeye yakın renk olanlarda daha az hücre bulunmaktadır (Şekil 4.1).

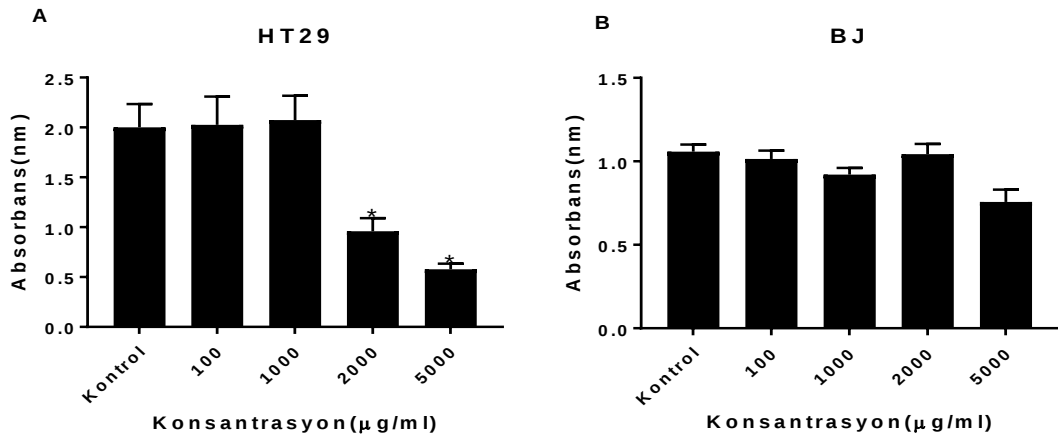


Şekil 4.1. MTT testi görüntüsü; 96 kuyucuklu plakalarda 10,000 HT29 hücresi ekildi; MTT testi sonunucu oluşan formazan DMSO ile çözüldü; Pembeden mora gittikçe hücre sayısı artmaktadır



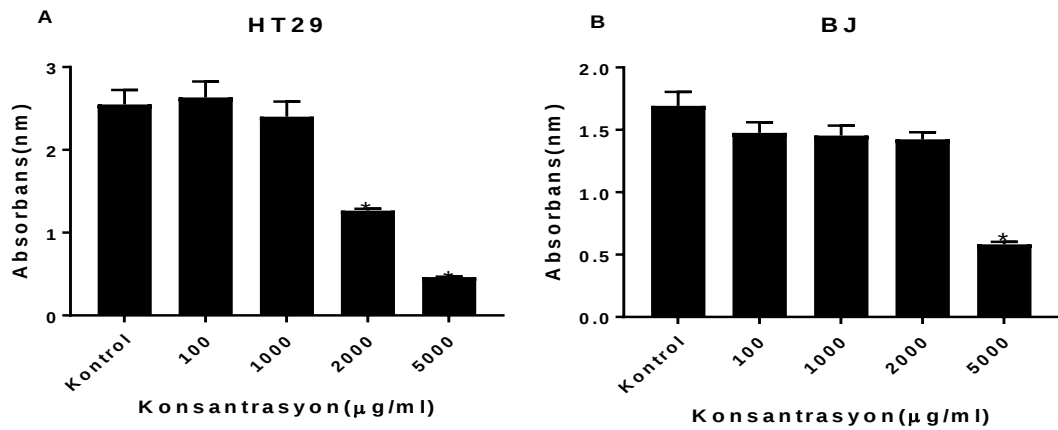
Şekil 4.2. HT29 hücrelerinin 24 saat *Epilobium* ekstraktı ile inkübasyonu sonrası alınmış görüntüler; **A:** *Epilobium* ekstraktı içermeyen ortamda 24 saat inkübasyon sonrası görüntü; **B:** Su ile hazırlanmış *Epilobium* ekstraktı ile 24 saat inkübasyon sonrası alınmış görüntü; **C:** Etanol ile hazırlanmış *Epilobium* ekstraktı ile 24 saat inkübasyon sonrası alınmış görüntü; **D:** Hekzan ile hazırlanmış *Epilobium* ekstraktı ile 24 saat inkübasyon sonrası alınmış görüntü

4.1.1. *Epilobium* etanol ekstraktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu



Şekil 4.3. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* etanol ekstraktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$)

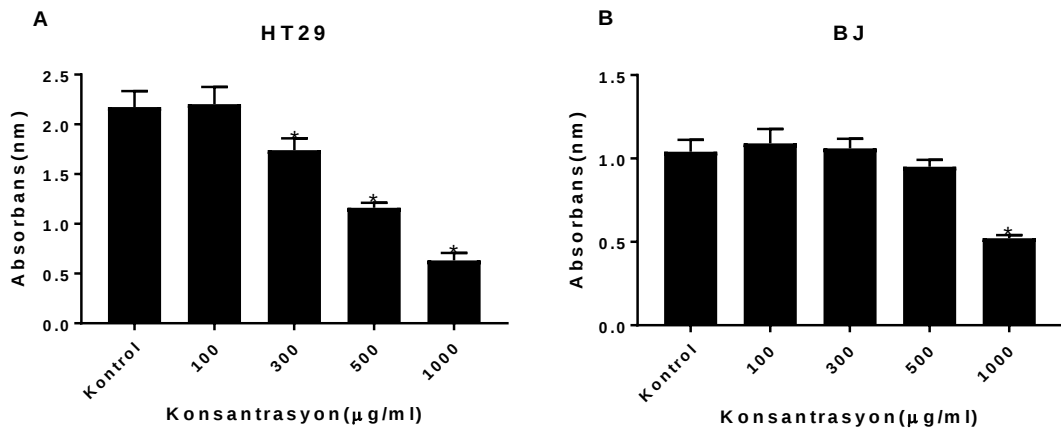
HT29 hücrelerinin *Epilobium parviflorum* etanol ekstraktı ile 48 saat muamelesi sonucu 2000 µg/ml ve 5000 µg/ml konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerine *Epilobium parviflorum* etanol ekstraktının çeşitli konsantrasyonları ile 48 saat muamelesi sonucu hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* etanol ekstraktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$)

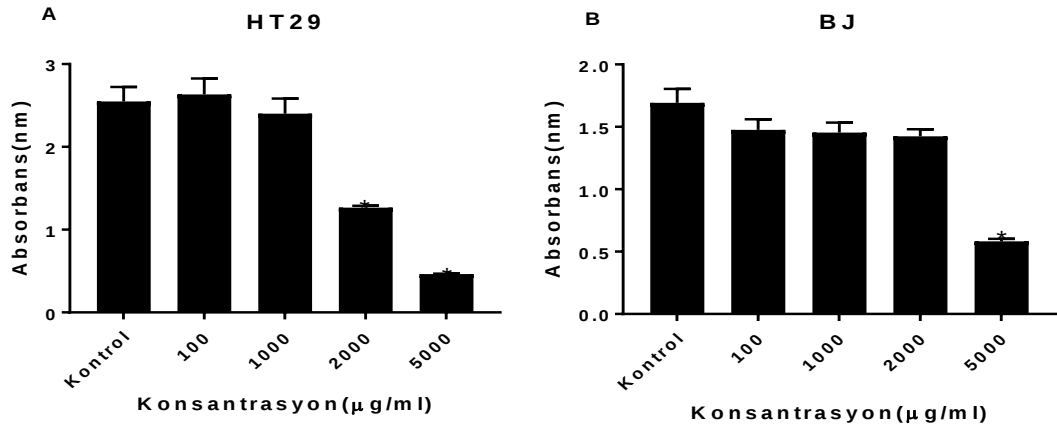
HT29 hücrelerinin *Epilobium parviflorum* etanol ekstraktı ile 72 saat muamelesi sonucu 2000 µg/ml ve 5000 µg/ml konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerine *Epilobium parviflorum* etanol ekstraktının çeşitli konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonucu 5000 µg/ml’de hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.4).

4.1.2. *Epilobium* su ekstraktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu



Şekil 4.5. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* su ekstraktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0.05$)

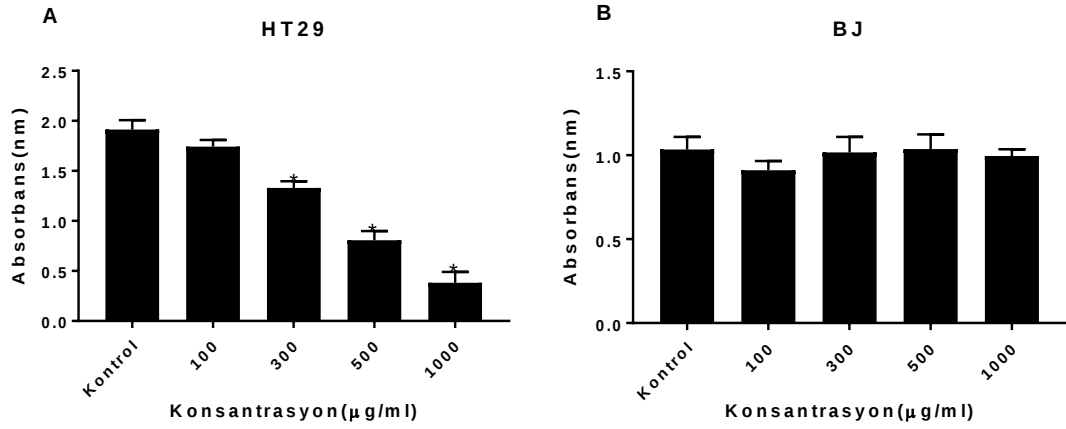
HT29 hücrelerinin *Epilobium parviflorum* su ekstraktı ile 48 saat muamelesi sonucu 300 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerinin *Epilobium parviflorum* su ekstraktının çeşitli konsantrasyonları ile 48 saat muamelesi sonucu 1000 µg/ml’deki hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.6. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* su ekstraktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

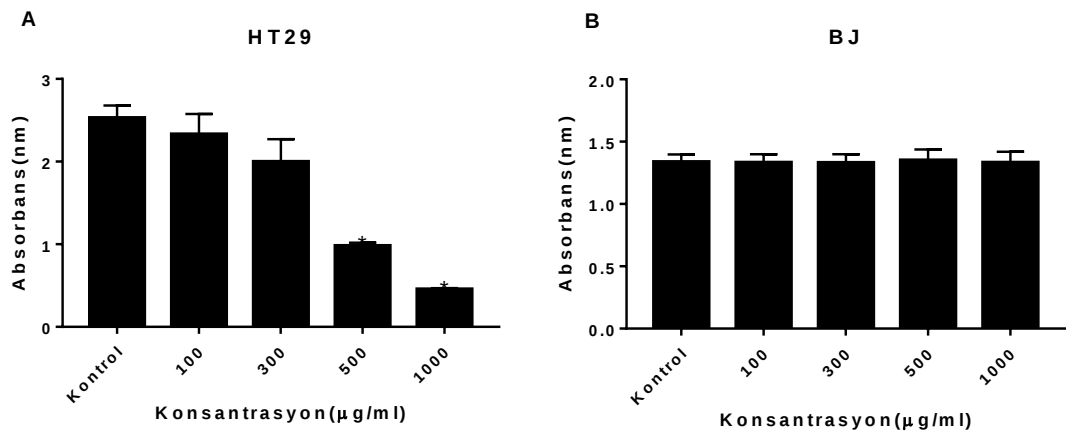
HT29 hücrelerine *Epilobium parviflorum* su ekstraktı ile 72 saat muamelesi sonucu 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerine *Epilobium parviflorum* su ekstraktının çeşitli konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonucu 1000 µg/ml'deki hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.6).

4.1.3. *Epilobium* hekzan ekstaktının HT29 ve BJ hücreleri ile 48 ve 72 saat inkübasyonu



Şekil 4.7. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* hekzan ekstaktı ile 48 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği. * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

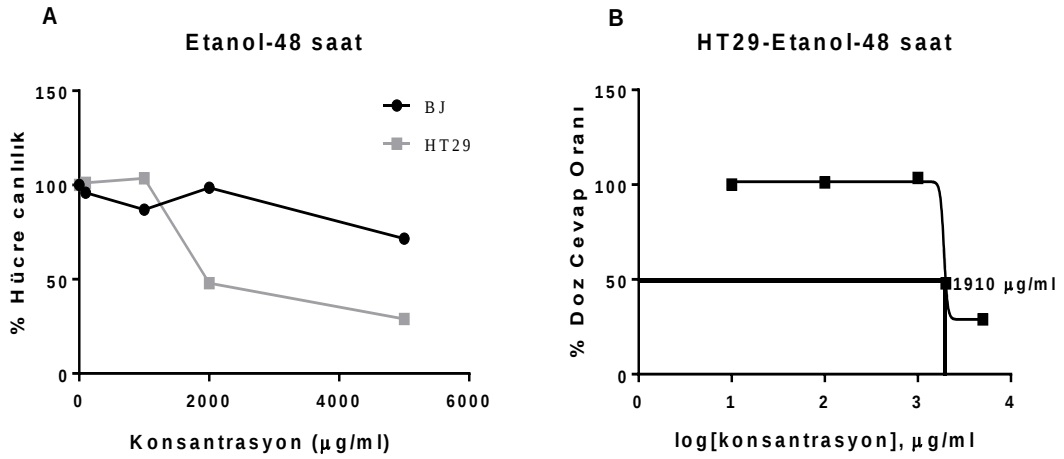
HT29 hücrelerine *Epilobium parviflorum* hekzan ekstaktı ile 48 saat muamelesi sonucu 300 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerinin *Epilobium parviflorum* hekzan ekstaktının çeşitli konsantrasyonları ile 48 saat muamelesi sonucu hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p < 0.05$)(Şekil 4.7).



Şekil 4.8. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* hekzan ekstaktı ile 72 saat inkübasyonu sonrasında MTT testi sonuçları; **A:** HT29 kanser hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği; **B:** BJ hücrelerine ait hücre canlılığı grafiği. * : kontrole göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p < 0.05$)

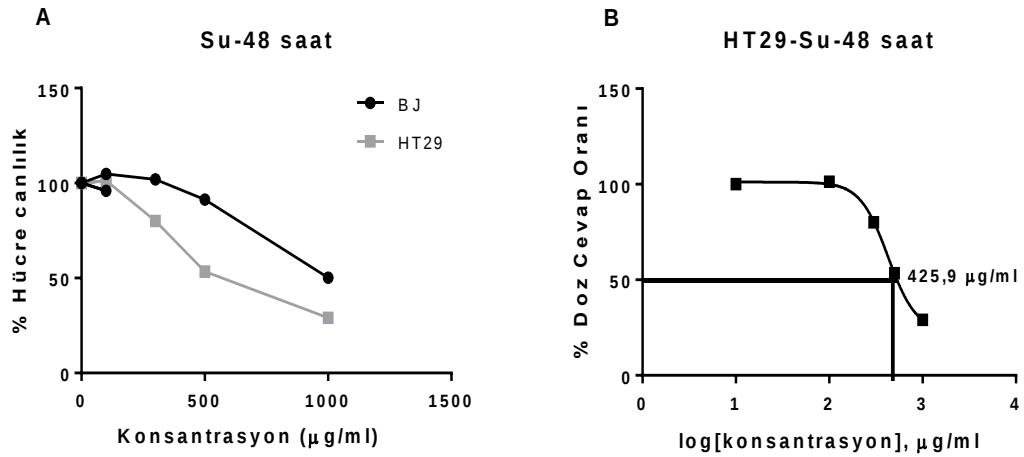
HT29 hücrelerinin *Epilobium parviflorum* hekzan ekstraktı ile 72 saat muamelesi sonucu 500 $\mu\text{g/ml}$ ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. BJ hücrelerinin *Epilobium parviflorum* hekzan ekstraktının çeşitli konsantrasyonları ile 72 saat muamelesi sonucu hücrelerin canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).

4.1.4. IC₅₀ değerinin belirlenmesi



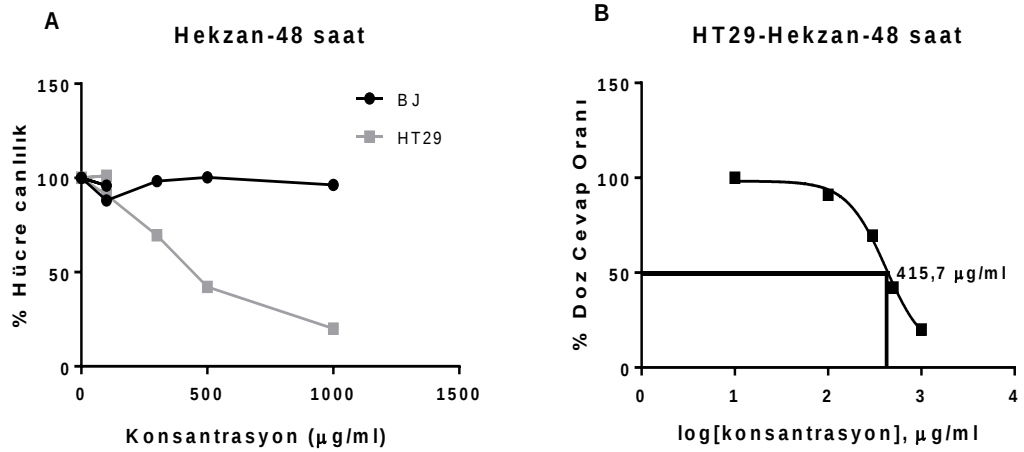
Şekil 4.9. *Epilobium* etanol ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik; **A:** HT29 ve BJ hücrelerine 48 saat inkübasyonu sonrası kontrolün absorbansı 100 kabul edilerek hesaplandı; **B:** GraphPad Prism 7 programı ile hesaplanan *Epilobium* etanol ekstraktının IC₅₀ konsantrasyonunu göstermektedir

Epilobium'un etanol ekstraktının HT29 hücrelerinin %50 oranında hücre çoğalmasını inhibe eden konsantrasyonu 1910 $\mu\text{g/ml}$ olarak GraphPad programı ile belirlenmemiştir. Bu IC₅₀ konsantrasyonunda BJ hücrelerinin çoğalmasında kontrole göre bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. *Epilobium* su ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik; **A:** HT29 ve BJ hücrelerine 48 saat inkübasyonu sonrası kontrolün absorbansı 100 kabul edilerek hesaplandı; **B:** GraphPad Prism 7 programı ile hesaplanan *Epilobium* su ekstraktının IC_{50} konsantrasyonunu göstermektedir

Epilobium'un su ekstraktının HT29 hücrelerinin %50 oranında hücre çoğalmasını inhibe eden konsantrasyonu $425.9 \mu\text{g/ml}$ olarak GraphPad programı ile belirlendi. Bu IC_{50} konsantrasyonunda BJ hücrelerinin çoğalmasında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.10).

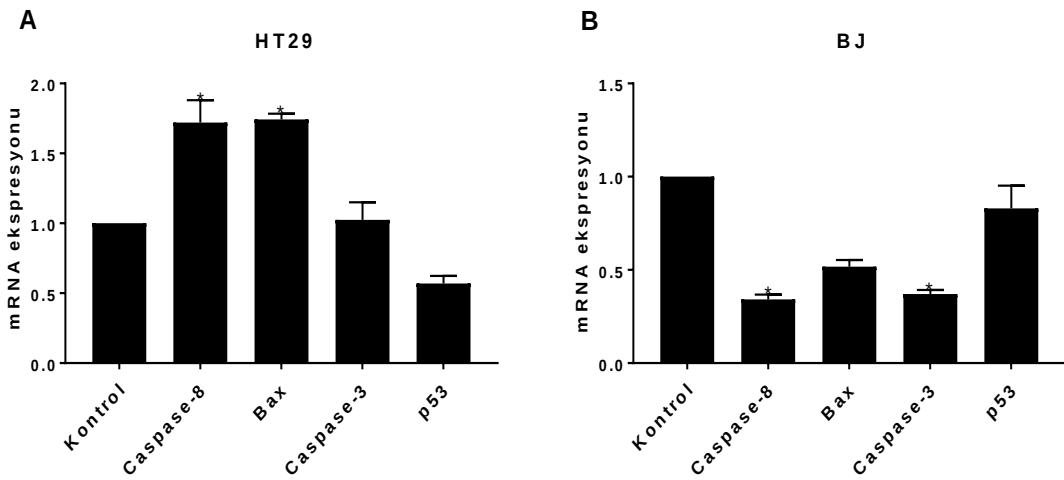


Şekil 4.11. *Epilobium* hekzan ekstraktı uygulaması sonrası hücrelerin çoğalmasını %50 oranında inhibe olduğu konsantrasyonu gösteren grafik; **A:** HT29 ve BJ hücrelerine 48 saat inkübasyonu sonrası kontrolün absorbansı 100 kabul edilerek hesaplandı; **B:** GraphPad Prism 7 programı ile hesaplanan *Epilobium* hekzan ekstraktının IC_{50} konsantrasyonunu göstermektedir

Epilobium'un hekzan ekstraktının HT29 hücrelerinin %50 oranında hücre çoğalmasını inhibe eden konsantrasyonu 415.7 µg/ml olarak GraphPad programı ile belirlenmiştir. Bu IC₅₀ konsantrasyonunda BJ hücrelerinin çoğalmasında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.11).

4.2. qRT-PCR Bulguları

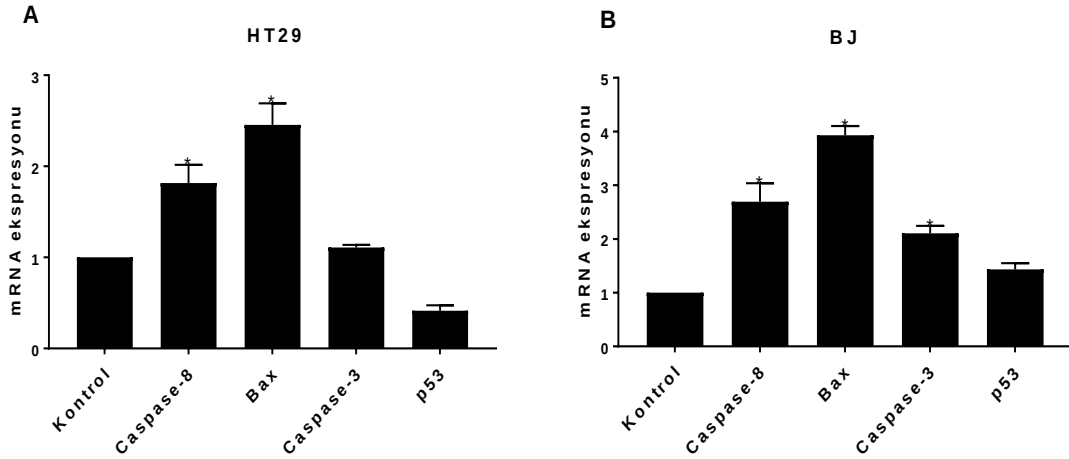
HT29 ve BJ hücrelerini *Epilobium* ekstraktlarının IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyonu edildi. Sonrasında *Caspase-8*, *Bax*, *Caspase-3* ve *P53* genlerinin ekspresyonu qRT-PCR yöntemi ile analiz edildi.



Şekil 4.12. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* etanol ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği; **A:** HT29 hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir; **B:** BJ hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir

HT29 hücrelerinin *Epilobium* etanol ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonu kontrole göre artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). *Caspase-8* geninin ekspresyonunda kontrole göre 1.72 ± 0.16 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). *Bax* geninin ekspresyonu kontrole göre 1.74 ± 0.04 kat artış gözlenmiştir ($p < 0.05$). Aynı zamanda HT29 hücrelerinin *P53* geninde azalış gözlenmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.12.A).

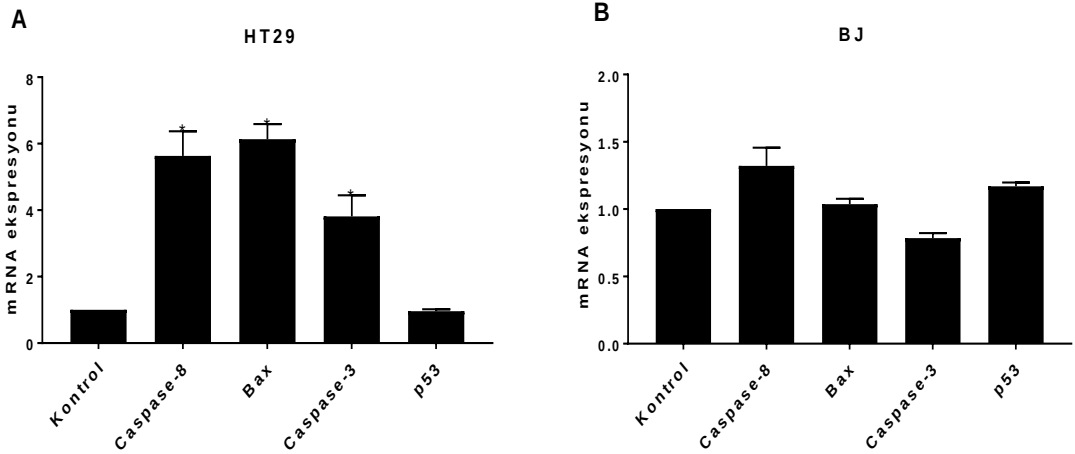
BJ hücrelerinin *Epilobium* etanol ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0.05$). *Caspase-8* geninin ekspresyonu kontrole göre 0.34 ± 0.03 kat azalma gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Caspase-3* geninin ekspresyonu kontrole göre 0.37 ± 0.21 kat azalma gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Bax* geninin ekspresyonu kontrole göre azalma gözlenmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 4.12.B).



Şekil 4.13. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* su ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği; **A:** HT29 hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir; **B:** BJ hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir

HT29 hücrelerinin *Epilobium* su ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir şekilde artış gerçekleşmiştir. *Caspase-8* geninin ekspresyonu kontrole göre 1.82 ± 0.2 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Bax* geninin ekspresyonunda kontrole göre 2.45 ± 0.24 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *P53* geninin ekspresyonu kontrole göre azaldığı gözlenmiştir ($p > 0.05$). *Caspase-3* geninde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.13.A).

BJ hücrelerinin *Epilobium* su ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8*, *Bax* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyonu kontrole göre anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. ($p < 0.05$). *Caspase-8* geninin ekspresyonunda kontrole göre 2.69 ± 0.34 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Bax* geninin ekspresyonunda kontrole göre 3.93 ± 0.17 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Caspase-3* geninin ekspresyonu kontrole göre 2.104 ± 0.14 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *P53* geninin ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.13.B).

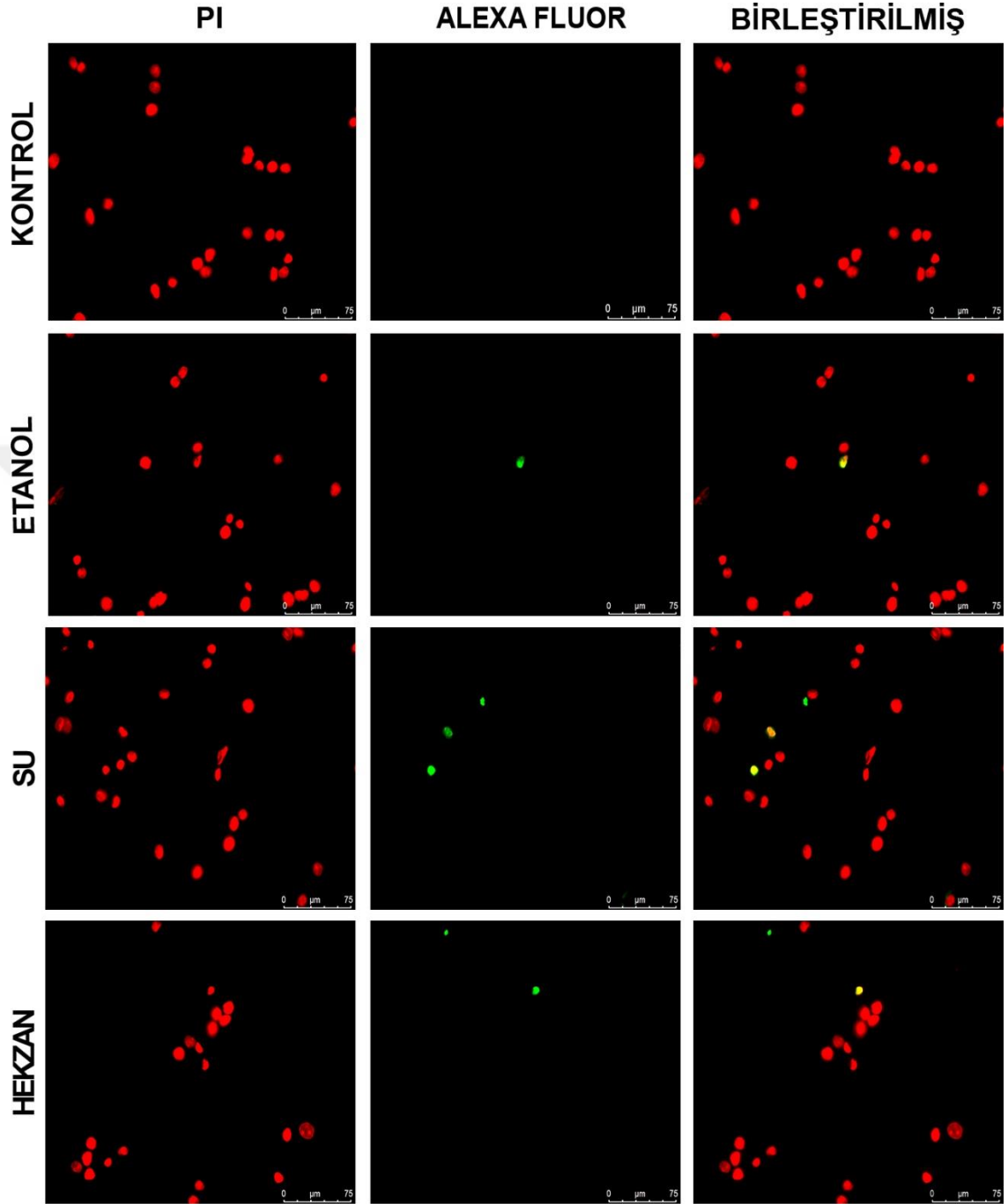


Şekil 4.14. HT29 ve BJ hücrelerinin *Epilobium* hekzan ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonrası relatif gen ekspresyon değişim grafiği; **A:** HT29 hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir; **B:** BJ hücrelerinin gen ekspresyon değişimini göstermektedir

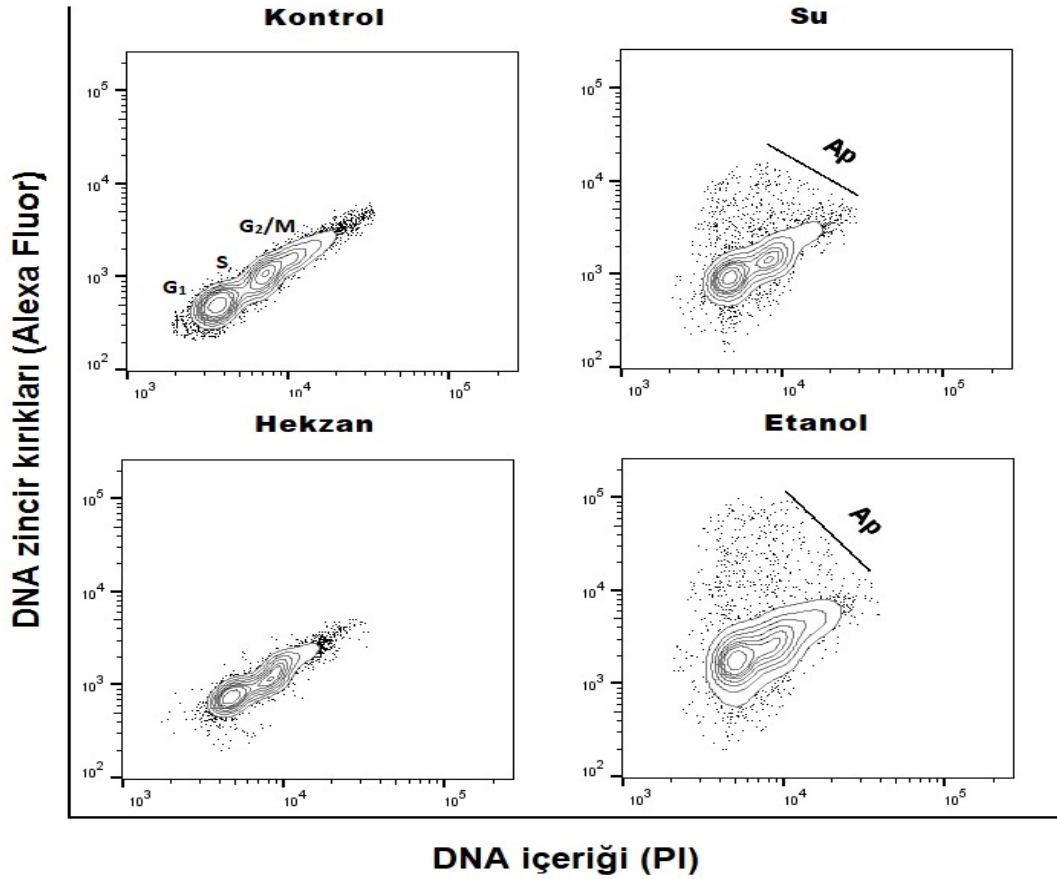
HT29 hücrelerinin *Epilobium* hekzan ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8*, *Bax* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyonunda kontrole göre anlamlı şekilde artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Caspase-8* geninin ekspresyonunda kontrole göre 5.63 ± 0.74 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Bax* geninin ekspresyonunda kontrole göre 6.14 ± 0.46 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$). *Caspase-3* geninin ekspresyonunda kontrole göre 3.81 ± 0.63 kat artış gerçekleşmiştir ($p < 0.05$)(Şekil 4.14.A).

BJ hücrelerinin *Epilobium* hekzan ekstraktı ile 24 saat muamelesi sonucu *Caspase-8*, *Bax*, *Caspase-3*, *P53* genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.14.B).

4.3. TUNEL Testi Bulguları



Şekil 4.15. HT29 hücrelerinin *Epilobium parviflorum* ekstraktları ile 48 saat inkübasyon sonrasında alınan görüntüsü; Görüntü invert mikroskop ile 20X objektif ile çekilmiştir (75 μm); PI hücre çekirdeğini boyayan kırmızı boyadır; Alexa fluor yeşil olup kromozom parçalarını boyar



Şekil 4.16. Flow sitometri yöntemi ile değerlendirilen apoptotik hücreleri gösteren grafik; Kırmızı florasan boya olan PI bütün DNA'yı boyamaktadır; Yeşil olan Alexa fluor ise DNA kırıklarını boyar; Flow Jo programı ile analiz edildi; Ap: Apoptotik hücreler

Epilobium parviflorum etanol, hekzan, su ekstraktı HT29 hücreleri ile 48 saat inkübe edilmiştir. TUNEL testinin sonucu BD FACS Canto cihazı ile analiz edilmiştir. Flow sitometri sonuçları Şekil 4.16'de gösterilmektedir. DNA kırıkları Alexa Fluor boyalı anti-BrdU antikoru ile işaretlenmiştir. PI bütün kromozoma bağlanarak hücre döngüleri olan G₁, S, G₂ evrelerini analiz etmemizi sağlamıştır. Flow sitometri sonuçları Flow Jo programı ile analiz edilmiştir.

Flow sitometri sonuçlarına göre, su ekstraktı ile muamele edilen HT29 hücrelerinin %6.9'u apoptoza uğramıştır. Aynı şekilde, etanol ekstraktı uygulanan HT29 hücrelerinin %13.3'ü apoptoza uğramıştır. Şekilde görüldüğü gibi hekzan ekstraktı uygulanan HT29 hücrelerinde hiçbir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.16).

5. TARTIŞMA

Kanser, gelişmiş veya gelişmekte olan bütün ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Şu anda, ABD'de her dört ölümden biri kanserden kaynaklanmaktadır. Diğer bir yandan son yıllarda geliştirilen yeni uygulamalar ve tedaviler sonucunda, kanserin öldürücülüğünde bir düşüş olmuştur. Bu düşüş erkeklerde en sık görülen üç kanser türünden (akciğer ve bronş, kolon ve rektum ve prostat) ve kadınlarda en sık görülen meme ve kolorektal kanserden kaynaklı ölümlerde de görülmektedir. Kadınlarda görülen akciğer kanseri mortalitesi üzerinde yapılan bir çalışmada, ölümlerin yıllarca arttığı, sonrasında ise günümüze gelirken azalma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Jemal vd. 2005).

Hastalarda erken polip tespiti sıklıkla etkili bir tedavi ile sonuçlanmakla birlikte, çoğu durumda polipler erken dönemlerde saptanamaz halde bulunurlar ve erken teşhisin yapılamaması ölüm riskinin artmasına neden olur. Bu gibi durumlarda, ileri evre kolorektal kanserine sahip hastalar üzerinde hemoterapötik ilaçlar, 5-florourasil ile tek başlarına ya da oksaliplatin ve avastin gibi adjuvan kombinasyonları uygulanarak tedavi denenir. Her ne kadar bu tedavi yöntemleri hastalığı ve genel sağ kalımı iyileştirse de kemoterapötik ilaçların kullanımında, şiddetli mide bulantısı, kusma, kilo kaybı gibi yan etkiler görülmektedir (Edwards vd. 2012; Van Cutsem vd. 2015). Bunun yanında immün sistemin baskılanması sonucunda enfeksiyöz komplikasyonların ortaya çıkması gibi riskler vardır ve bu normal hücrelerin ölümüne neden olabilmektedir (Tsuda vd. 2016). Bizim çalışmamızda, *Epilobium parviflorum* bitkisi HT29 ve BJ hücrelerine uygulanıp, MTT yöntemi kullanılarak hücrelerin canlılığı, qRT-PCR yöntemi ile apoptotik gen ekspresyonlarındaki değişimler ve TUNEL testi ile DNA fragmentasyonu incelenmiştir.

Stolarczyk ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Epilobium* türlerinin bileşenlerinin, hormon bağımlı prostat kanser hücreleri (LNCaP) üzerindeki etkilerini incelemişlerdir ve 38 adet bileşeni karakterize etmişlerdir. Bulgularına göre *Epilobium*'da en çok bulunan bileşenler oenothien B, flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Uygulanan tüm ekstraktlar, hücrelerdeki mitokondrial potansiyelde önemli bir azalış ve kaspaz-3 proteini aktivesinde bir artış oluşmasına sebep olmuştur. *Epilobium* ekstraktı LNCaP prostat kanser hücrelerinin mitokondrial yolak aracılığı ile apoptozunu indüklemiştir. Bu sonuca yüksek oenothien B miktarının neden olduğu düşünülmektedir (Stolarczyk vd. 2013).

Çalışmamızda *Epilobium*'un polar çözücüler olan etanol ve su ile elde edilmiş ekstraktlarının kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. HT29 hücreleri için hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonu BJ hücrelerinin çoğalmasını etkilememiştir. Bu da kanserin çoğalmasını durduran konsantrasyonun vücut hücrelerini etkilemediğini göstermektedir. *Epilobium* sulu ekstraktında yüksek miktarda oenothien B, askorbik, gallik, ellagic asitler ve kaempferol-3-O-glukozit bulunmaktadır (Shikov

vd. 2006; Bazylko vd. 2007). Oenothien B'nin DNA sentezini inhibe ederek hücrenin proliferasyonu engellediği bilinmektedir (Vitalone vd. 2003b). Karşılaştığımız sonuçta, oenothien B etkili olmuş olabilir.

Mitokondrial (içsel) yolak, hücresel strese bir cevap olarak indüklenir ve pro-apoptotik BH3 proteinlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Yalnızca BH3 proteinleri bax ve bak'ı doğrudan bağlayabilir ve aktive edebilir; ayrıca bax ve bak'ı dolaylı olarak aktive etmek için pro-apoptotik bcl-2 benzeri proteinlere bağlanabilir. Aktive edildikten sonra bax ve bak, sitokromu salgılayan mitokondriyal dış zarda gözenekler oluşturmak üzere oligomerize olur. Sitozolik sitokrom c, kaspaz aktivasyonuna ve daha sonra hücre ölümüne yol açar (Westphal vd. 2011). Aynı zamanda dışsal yolda kaspaz-8'in *bid*'i aktive ederek mitokondri membranına bağlanmasına neden olur ve apoptoz meydana gelir (Luo vd. 1998).

Etanol ekstraktı ile muamele sonucu BJ hücrelerinde *Caspase-3* ve *Caspase-8* genlerinin ekspresyonları düşüş göstermiştir. Bu sonuçlar Yushimura ve arkadaşlarının 2013'de yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. Yoshimura ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; *Epilobium*'un içinde bulunan oenothien B'yi dendritik hücreler üzerine uyguladıklarında protein seviyesinde kaspaz-3 ve kaspaz-8'in azaldığını bulmuşlardır (Yoshimura vd. 2013). Bu sonuçlar *Epilobium*'un fibroblast hücrelerini öldürmeyen konsantrasyonunun kaspazların ekspresyonunu da etkilemediğini göstermektedir.

Pei ve arkadaşları *Epilobium* en önemli bileşeni olan oenothien B'nin akciğer kanser hücrelerinin (A549) proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hücreleri G₁ fazında durdurduğunu gösterdiler. Yaptıkları çalışmada oenothienin aynı zamanda hem hücre içi reaktif oksijen radikallerini hem de apoptotik tetikleyicilerin miktarının arttırdığını göstermişlerdir. Bununla birlikte bax, p53, sitokrom c ve PARP seviyesinde artış gözlenirken anti-apoptotik bcl-2 seviyesi azalmıştır. Bulgular hücrelerde içsel yolağın tetiklenerek onların apoptoza gittiğini göstermiştir (Pei vd. 2019). Bu bilgiler ışığında, uygulamasını yaptığımız *Epilobium* hekzan ekstraktının hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini düşünmekteyiz. Yaptığımız TUNEL testi sonucunda hücrelerin apoptoza gitmediği ve çoğalmasının durduğunun gözlenmesi, bu görüşümüzü desteklemektedir. P53 geni ekspresyon seviyesinde bir değişim gözlenmedi ancak mRNA oranı, protein seviyesi ile her zaman kolerasyon göstermemektedir. Diğer bir yandan *Bax*'ın ekspresyonu ile birlikte *Caspase-8* ve *Caspase-3*'te de artış gözlemlendi.

p53 proteini DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünü durdurabilmektedir. Puma ve Noxa, pro-apoptozda yer alan bcl-2 ailesinin iki üyesidir. Puma, p53 aracılı apoptozda önemli bir rol oynar. Puma'nın in vitro aşırı ekspresyonuna, artan bax proteinin ve sitokrom salınımının artması eşlik ettiği gösterilmiştir (Elmore 2007).

Hekzan gibi apolar ekstraksiyonlarda antiproliferatif etkisi olan flavonoidler ve sitosteroller bulunmaktadır. *Epilobium* hekzan ekstraktı apoptotik genler olan *Bax*, *Caspase-3* ve *Caspase-8* genlerin ekspresyonunu büyük ölçüde artırdı. Ancak apoptozun geç evresinde gerçekleşen DNA fragmentasyonu gözlenmedi. Kaspazların artış gösterip DNA fragmentasyonunun gözlenmemesi kolon kanseri hücrelerinin çoğalmasının durduğunu ancak ölmediklerini düşündürmektedir.

Diğer bir çalışmada, HT29 hücreleri quercetin ile inkübe edildiğinde, *Bax* seviyesinde değişiklik olmadan *Bcl-2* seviyesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Quercetin *Epilobium*'da da bulunan bir flavonoidtir (Hertog vd. 1993). Bu bulgu, quercetin proapoptotik etkilerinin *bcl-2* protein seviyelerini düşürme kabiliyetine bağlı olabileceğini göstermiştir. Kanıtlar, quercetin *bax* seviyesinde bir değişim olmadan *bcl-2*'nin protein seviyesini azalttığını göstermektedir. Bu sitokrom c salınımını ve ardından kaspaz-3'ü aktive ederek mitokondriyal zar bütünlüğünü bozduğunu göstermektedir (Martinou vd. 2000). Kaspaz-3, nükleer enzim PARP gibi birçok önemli proteinin proteolitik bölünmesinden sorumlu olan apoptozun kilit uygulayıcılarından biridir (Kim vd. 2005). Bu sonuçlar *Epilobium* ekstraktlarının kolon kanser hücrelerini mitokondrial yolak ile apoptotoza götürebileceğini desteklemektedir.

Bizim çalışmamızda, *Epilobium parviflorum* etanol, su ve hekzan ekstraktlarının 24 saat HT29 hücrelerine uygulanması sonucu genel olarak *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonlarında artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, *Epilobium*'da bulunan bir molekülün dışsal yolağı tetikleyerek sırasıyla *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonun artırmış olabileceğini göstermektedir. *Bax* geninin ifadesindeki artış ile mitokondri zarında porlar oluşmasına ve hücrenin apoptotoza gitmesine neden olmuş olabilir.

Özetle bu çalışmada anti-enflamatuar, antioksidan, antitümör, antimikrobiyal ve anti-androjenik özelliği olduğu bilinen *Epilobium parviflorum* bitkisi kullanılmıştır (Granica vd. 2014; Vitalone ve Allkanjari 2018). *Epilobium*'un prostat büyümesi üzerine iyileştirici özelliği olduğu daha önceden yapılmış olan birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Hiemann ve Bucar 1997; Piwowarski vd. 2017). Aynı zamanda *Epilobium*'da bulunan fenolik bileşiklerin, tanin ve flavonoidlerin kolon kanseri üzerinde antiproliferatif özellik gösterdikleri diğer birçok çalışma ile gösterilmiştir. (Kim vd. 2005; Yi vd. 2005) . Biz bu çalışmamızda *Epilobium*'u kolon kanseri ve fibroblast hücreleri üzerine uygulayarak apoptotik etkilerini inceledik. Uygulanan IC₅₀ konsantrasyonu kolon hücrelerinin çoğalmasını durdururken fibroblast hücrelerini etkilemedi. Bunun yanı sıra etanol, hekzan ve su ekstraktları kolon kanser hücresinde kaspazları aktive edip mitokondrial yolağı aktifleştirmiş ve apoptotoza götürmüştür. Apoptozun son evresi olan DNA fragmentasyonu, etanol ekstraktında diğerlerine göre daha fazla görülürken hekzanda hiç rastlanmadı. Hekzan ekstraktı HT29 hücrelerini öldürmeden hücrelerin çoğalmasını inhibe etmiş olabilir. Bizler yaptığımız çalışmada *Epilobium*'un kolon kanserine karşı etkili olduğunu gösterdik. Gelecek çalışmalarda

Epilobium'un kolon kanseri üzerinde hangi yolakları etkilediği daha ayrıntılı bir şekilde araştırılabilir.



6. SONUÇLAR

Bu tezde, HT29 ve BJ hücre hatlarına *Epilobium parviflorum*'un etanol, su ve hekzan ile hazırlanmış bitki ekstraktları uygulandıktan sonra bazı apoptotik genlerin ekspresyonlarındaki değişimler qRT-PCR yöntemi incelendi. Apoptoz son evresi olan DNA fragmentasyonu ise TUNEL testi değerlendirilmiştir. Bu tezde bulunan sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

1. HT29 kolon kanser hücrelerine uygulanan *Epilobium parviflorum* etanol, su ve hekzan ekstraktlarının IC₅₀ konsantrasyonları BJ hücrelerinin canlılığını anlamlı bir oranda azaltmıştır.
2. PBS içinde çözülen *Epilobium* toz ekstraktlarının IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.
3. Kanser hücrelerinin canlılığını etkili bir şekilde durdururken vücut hücresinin çoğalmasını etkilenmediği gözlenmiştir.
4. *Epilobium* etanol ekstraktının HT29 hücrelerinin uygulaması sonrası *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir. Bunun tam tersi şekilde BJ hücrelerinde *Caspase-8*, *Bax*, *Caspase-3* genlerin ekspresyonları azalmıştır.
5. *Epilobium* su ekstraktının HT29 hücrelerine uygulanması sonrası *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonu artmıştır. Aynı şekilde BJ hücrelerinin de *Caspase-8* ve *Bax* genlerinin ekspresyonu arttı. Buna ilave olarak *Caspase-3* genin ekspresyonunda da artış gözlenmiştir.
6. *Epilobium* hekzan ekstraktı HT29 hücrelerinin de *Caspase-8*, *Bax* ve *Caspase-3* genlerinin ekspresyonunda belirgin bir artış görülürken, BJ'deki genlerin ekspresyonunu etkilememiştir.
7. *Epilobium parviflorum*'un HT29 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.
8. TUNEL sonucuna göre *Epilobium*'un su ve etanol ekstraktında daha fazla DNA frangmentasyonu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda prostat kanserine iyi geldiği bilinen *Epilobium* bitkisinin diğer kanser türlerinde hangi apoptotik genleri etkilediğini bulunmaya çalıştık. *Epilobium parviflorum*'un kaspazları aktive ederek, mitokondrial yolak ile kolon kanseri hücrelerini apoptoza götürmüş olabilir. Bu sonuçları TUNEL testi bulguları ile desteklenmiştir. Apoptotik genlerin etkisini en çok değiştiren *Epilobium*'un hekzan ekstraktıdır. Diğer taraftan hekzan ekstraktının hücrelerde DNA fragmentasyonuna neden olmadığı gözlenmiştir. Bu konunun kolon kanseri hücrelerinin hekzan ekstraktı ile nasıl öldüğüne dair daha farklı deneyler yapılarak aydınlatılmaya ihtiyacı vardır. *Epilobium* su ve etanol gibi polar çözücüler ile olan ekstraktlarının etkili olduğu

literatürde belirtilmiştir. Bu çalışmada bu durum bir kez daha gösterildi ve *Epilobium* bitkisinin kolon kanserine karşı terapötik olarak etkili olabileceği gösterilmiştir.



7. KAYNAKLAR

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. et al. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal-cancer. *Science*, 260(5109): 812-816.
- Archana, M., Bastian, Yogesh, T.L. and Kumaraswamy, K.L. 2013. Various methods available for detection of apoptotic cells- A review. *Indian J. Cancer*, 50(3): 274-283.
- Banfalvi, G. 2017. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2): 306-323.
- Battinelli, L., Tita, B., Evandri, M.G. and Mazzanti, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. extracts. *Farmaco*, 56(5-7): 345-348.
- Bazylko, A., Kiss, A.K. and Kowalski, J. 2007. High-performance thin-layer chromatography method for quantitative determination of oenothien B and quercetin glucuronide in aqueous extract of *Epilobium angustifolium* herba. *J Chromatogr A*, 1173(1-2): 146-150.
- Berridge, M.V., Herst, P.M. and Tan, A.S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11: 127-152.
- Burt, R.W. 2000. Colon cancer screening. 119(3): 837-853.
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H.J., Lynch, H.T., Minsky, B., Nordlinger, B. and Starling, N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375(9719): 1030-1047.
- Declercq, W., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. 2009. RIP Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival. *Cell*, 138(2): 229-232.
- Ducrey, B., Marston, A., Gohring, S., Hartmann, R.W. and Hostettmann, K. 1997. Inhibition of 5 alpha-reductase and aromatase by the ellagitannins oenothien A and oenothien B from *epilobium* species. *Planta Medica*, 63(2): 111-114.
- Durauto, F., Liccardo, R., Cavallo, A., Rosa, M.D., Grosso, M. and Izzo, P. 2011. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: Probability of synergistic effects. 129(7): 1643-1650.
- Edwards, M.S., Chadda, S.D., Zhao, Z., Barber, B.L. and Sykes, D.P. 2012. A systematic review of treatment guidelines for metastatic colorectal cancer. *Colorectal Dis.*, 14(2): e31-e47.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495-516.
- Ewing, I., Hurley, J.J., Josephides, E. and Millar, A. 2014. The molecular genetics of colorectal cancer. 5(1): 26-30.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S. and Orlandini, S.Z. 2000. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell. Physiol.*, 182(1): 41-49.
- Goel, A., Nagasaka, T., Arnold, C.N., Inoue, T., Hamilton, C., Niedzwiecki, D., Compton, C., Mayer, R.J., Goldberg, R., Bertagnolli, M.M. et al. 2007. The CpG

- island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132(1): 127-138.
- Granica, S., Piwowarski, J.P., Czerwinska, M.E. and Kiss, A.K. 2014. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 156: 316-346.
- Graslraupp, B., Ruttkaynedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W. and Schultehermann, R. 1995. In-situ detection of fragmented dna (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell-death - a cautionary note. *Hepatology*, 21(5): 1465-1468.
- Green, D.R. 2006. At the gates of death. *Cancer Cell*, 9(5): 328-330.
- Gregoire, M. and Lieubeau, B. 1995. The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer Metastasis Rev.*, 14(4): 339-350.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. and Kromhout, D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the netherlands. *Nutr. Cancer*, 20(1): 21-29.
- Hevesi, B.T., Houghton, P.J., Habtemariam, S. and Kery, A. 2009. Antioxidant and antiinflammatory effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytother Res*, 23(5): 719-724.
- Hiermann, A. and Bucar, F. 1997. Studies of *Epilobium angustifolium* extracts on growth of accessory sexual organs in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(3): 179-183.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E. and Swanson, P.E. 2009. Cell death. *The New England journal of medicine*, 361(16): 1570-1583.
- Jagtap, P. and Szabo, C. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4(5): 421-440.
- Jaspersion, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W. and Burt, R.W. 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. 138(6): 2044-2058.
- Jaworska, D., Król, W. and Szliszka, E. 2015. Prostate Cancer Stem Cells: Research Advances. *International journal of molecular sciences*, 16(11): 27433-27449.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J. and Thun, M.J. 2005. Cancer statistics, 2005. *CA-Cancer J. Clin.*, 55(1): 10-30.
- Juan, H., Sametz, W. and Hiermann, A. 1988. Anti-inflammatory effects of a substance extracted from *epilobium angustifolium*. *Agents Actions*, 23(1-2): 106-107.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4): 239-257.
- Kim, W.K., Bang, M.H., Kim, E.S., Kang, N.E., Jung, K.C., Cho, H.J. and Park, J.H.Y. 2005. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J. Nutr. Biochem.*, 16(3): 155-162.
- Kosinski, C., Li, V.S.W., Chan, A.S.Y., Zhang, J., Ho, C., Tsui, W.Y., Chan, T.L., Mifflin, R.C., Powell, D.W., Yuen, S.T. et al. 2007. Gene expression patterns of

- human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *104*(39): 15418-15423.
- Lesuisse, D., Berjonneau, J., Ciot, C., Devaux, P., Doucet, B., Gourvest, J.F., Khemis, B., Lang, C., Legrand, R., Lowinski, M. et al. 1996. Determination of oenothien B as the active 5-alpha-reductase-inhibiting principle of the folk medicine *Epilobium parviflorum*. *J. Nat. Prod.*, 59(5): 490-492.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X.D. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4): 481-490.
- Markowitz, S.D. and Bertagnolli, M.M. 2009. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25): 2449-2460.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B. and Recio, I. 2015. HT29 Cell Line. In: Verhoeckx, K. and Cotter, P. and López-Expósito, I. and Kleiveland, C. and Lea, T. and Mackie, A. and Requena, T. and Swiatecka, D. and Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer International Publishing, Cham, pp. 113-124.
- Martinez, M.M., Reif, R.D. and Pappas, D. 2010. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal. Methods*, 2(8): 996-1004.
- Martinou, J.C., Desagher, S. and Antonsson, B. 2000. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat. Cell Biol.*, 2(3): E41-E43.
- Medema, J.P. and Vermeulen, L. 2011. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, 474(7351): 318-326.
- Pancione, M., Remo, A. and Colantuoni, V. 2012. Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. 2012: 1-11.
- Pei, X., Xiao, J.S., Wei, G.J., Zhang, Y.M., Lin, F., Xiong, Z.C., Lu, L., Wang, X.L., Pang, G.F., Jiang, Y. et al. 2019. Oenothien B inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation by ROS-mediated PI3K/Akt/NF-kB signaling pathway. *Chem.-Biol. Interact.*, 298: 112-120.
- Pereira, W.O. and Amarante-Mendes, G.P. 2011. Apoptosis: A Programme of Cell Death or Cell Disposal? *Scand. J. Immunol.*, 73(5): 401-407.
- Pino, M.S. and Chung, D.C. 2010. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *138*(6): 2059-2072.
- Piowowski, J.P., Bobrowska-Korczak, B., Stanislawski, I., Bielecki, W., Wrzesien, R., Granica, S., Krupa, K. and Kiss, A.K. 2017. Evaluation of the Effect of *Epilobium angustifolium* Aqueous Extract on LNCaP Cell Proliferation in In Vitro and In Vivo Models. *Planta Medica*, 83(14-15): 1159-1168.
- Rustgi, A.K. 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.*, 21(20): 2525-2538.
- Savill, J. and Fadok, V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805): 784-788.
- Sayers, T.J. 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(8): 1173-1180.

- Shikov, A.N., Poltanov, E.A., Dorman, H.J., Makarov, V.G., Tikhonov, V.P. and Hiltunen, R. 2006. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extracts. *J Agric Food Chem*, 54(10): 3617-3624.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Ahnen, D.J., Meester, R.G.S., Barzi, A. and Jemal, A. 2017. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA-Cancer J. Clin.*, 67(3): 177-193.
- Silzle, T., Randolph, G.J., Kreutz, M. and Kunz-Schughart, L.A. 2004. The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int. J. Cancer*, 108(2): 173-180.
- Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M. and Phipps, R.P. 1997. Fibroblasts as sentinel cells - Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.*, 151(2): 317-322.
- Steenkamp, V., Gouws, M.C., Gulumian, M., Elgorashi, E.E. and van Staden, J. 2006. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1): 71-75.
- Stolarczyk, M., Naruszewicz, M. and Kiss, A.K. 2013. Extracts from *Epilobium* sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. *J Pharm Pharmacol*, 65(7): 1044-1054.
- Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, 3(10): 768-780.
- Tanner, M.A., Shoskes, D., Shahed, A. and Pace, N.R. 1999. Prevalence of corynebacterial 16S rRNA sequences in patients with bacterial and "nonbacterial" prostatitis. *Journal of clinical microbiology*, 37(6): 1863-1870.
- Tóth, B.H., Balázs, A., Vukics, V., Szőke, É. and Kéry, Á. 2006. Identification of *Epilobium* Species and Willow-herbs (Onagraceae) by HPLC Analysis of Flavonoids as Chemotaxonomic Markers. *Chromatographia*, 63(S13): S119-S123.
- Treben, M. 1984. Health through God's Pharmacy. Steyr, Wilhem Ennsthaler.
- Tsuda, N., Watari, H. and Ushijima, K. 2016. Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. *Chin. J. Cancer Res.*, 28(2): 241-253.
- Van Cutsem, E., Lenz, H.J., Kohne, C.H., Heinemann, V., Tejpar, S., Melezinek, I., Beier, F., Stroh, C., Rougier, P., van Krieken, J.H. et al. 2015. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 33(7): 692-700.
- Vitalone, A. and Allkanjari, O. 2018. *Epilobium* spp: Pharmacology and Phytochemistry. *Phytotherapy Research*, 32(7): 1229-1240.
- Vitalone, A., Guizzetti, M., Costa, L.G. and Tita, B. 2003a. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55(5): 683-690.

- Vitalone, A., McColl, J., Thome, D., Costa, L.G. and Tita, B. 2003b. Characterization of the effect of Epilobium extracts on human cell proliferation. *Pharmacology*, 69(2): 79-87.
- Vitalone, A., Bordini, F., Baldazzi, C., Mazzanti, G., Saso, L. and Tita, B. 2001. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by Epilobium angustifolium L. *Farmaco*, 56(5-7): 483-489.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J. et al. 2013. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine-An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3): 750-771.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E. and Kluck, R.M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, 1813(4): 521-531.
- Wilson, N.S., Dixit, V. and Ashkenazi, A. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.*, 10(4): 348-355.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756): 555-556.
- Yi, W.G., Fischer, J., Krewer, G. and Akoh, C.C. 2005. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18): 7320-7329.
- Yoshimura, M., Akiyama, H., Kondo, K., Sakata, K., Matsuoka, H., Amakura, Y., Teshima, R. and Yoshida, T. 2013. Immunological Effects of Oenothien B, an Ellagitannin Dimer, on Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1): 46-56.
- Zong, W.X. and Thompson, C.B. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, 20(1): 1-15.

ÖZGEÇMİŞ

Tevhide SÜT
tevhide.sut@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016 - 2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2011-2016	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum