

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

**GİNSENG (*PANAX QUINQUEFOLIUS*) EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE
HATTI ÜZERİNE ETKİSİ**
(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
H. Reşat GÜMÜŞSOY

Danışman
Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

Şubat 2022
KAYSERİ

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

GİNSENG (*PANAX QUINQUEFOLIUS*) EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE
HATTI ÜZERİNE ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
H. Reşat GÜMÜŞSOY

Danışman
Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

Şubat 2022
KAYSERİ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Mustafa NİSARİ danışmanlığında **H. Reşat GÜMÜŞSOY** tarafından hazırlanan “**Ginseng (*Panax quinquefolius*) Ekstresinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

08 / 03 / 2022

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Mustafa NİSARİ
(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi)

Üye : Doç. Dr. Mehtap NİSARİ
(Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Aslı Gizem ÇAPAR
(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi)

ONAY:

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

... / ... / 2022

Prof. Dr. Hülya UÇAR**Enstitü Müdürü**

ETİK BEYAN

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

Tezi Hazırlayan

H. Reşat GüMüşSOY

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazmamda yardımcı olan, güler yüz ve desteğini esirgemeyen, her zaman motive eden konuşmaları ile kıymetli danışmanım Doç. Dr. Mustafa NİSARİ' ye

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerimde değerleri bilgileri ile mesleki bilgilerimin oluşmasında katkısı olan Prof. Dr. Neriman İNANÇ, Prof. Dr. Mualla AYKUT ve Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümü öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarımda bana öncülük yapan, laboratuvar kapılarını sonuna kadar açan ve bilgisini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Doç. Dr. Mehtap NİSARİ' ye

Laboratuvar çalışmalarımda her an yanımda olan, her adımı sabır ve titizlikle gösteren, destek olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Arş. Gör. Sümeyye UÇAR' a

Ve hayatımın her anında, her zaman yanımda olan, maddi manevi sonsuz destekleri olan annem Sevinç GÜMÜŞSOY, babam Ahmet GÜMÜŞSOY, anneannem Süheyla KALELİOĞLU ve büyükbabam Vahap KALELİOĞLU' na

Samimi duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

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

H. Reşat GÜMÜŞSOY

Kayseri, 2022

ÖZET

Gümüşsoy, H. R., Ginseng (*Panax Quinquefolius*) Ekstresinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Üzerine Etkisi, Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 2022.

Kanser, insanlık için küresel bir tehdit haline gelmiştir. Kanser verilerine göre 2012 yılında 14,1 milyon civarında yeni kanser vakası ve 8,2 milyon civarında kanserden ölüm gerçekleşmiştir (Torre ve ark., 2015). Meme kanseri, kadınlarda bilinen ve görülen en yaygın kanser türüdür ve en başta gelişmiş batılı ülkelerden sonra tüm toplumlarda kanser ölümleri içinde en sık olarak görülmektedir (Demirci, 1995). Bitkisel kaynaklı biyolojik aktif olan bileşiklere fitokimyasallar denilmektedir. Oksidan radikallerini tutarak, detoksifikasyon (toksinlerden arınma) enzimlerini aktive ederek ve immün sistemi uyarak kansere karşı koruyucu etki sağlamaktadır. Bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyoaktif maddeler kanser konulu araştırmalarda incelenmiştir. Bu maddelerin etkileri epidemiyolojik verilerle desteklenmiştir. In vitro ve in vivo çalışmalar Ginseng'in kanser hücrelerinde apoptozisi uyarak ve hücre döngüsünü durdurarak bir çok basamağı etkilediğini göstermiştir (Din ve ark., 2012; Lee, Kang ve Kim, 2019). Yapılan bu çalışmada MDA-MB-231 hücre hatlarında Ginseng (*Panax quinquefolius*)'ın zaman ve doza bağlı etkisi incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Yapılan mevcut çalışmamızda Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresi 1mg/ml ve 2mg/ml dozlar ile ve 24, 48 saat olarak iki zaman üzerinde kıyaslandı sonuçlar alındı, canlı meme kanseri hücrelerini öldüren ve apoptoza götüren etkin dozun 24 ve 48 saat için 1mg/ml olduğu, ayrıca hücre döngüsünü G0/G1 fazında durduran grubunda 48 saat için, 1mg/ml olan grup olduğu görüldü. Bu durum kanser hücresinin proliferasyonunu durduracağını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ginseng, MDA-MB-231, *Panax quinquefolius*

ABSTRACT

Gümüşsoy, H. R., Effect of Ginseng (*Panax Quinquefolius*) Extract on MDA-MB-231 Cell Line, Nuh Naci Yazgan University Institute of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, MSc Thesis, Kayseri, 2022.

Cancer has become a global threat to humanity. According to cancer data, around 14.1 million new cancer cases and 8.2 million deaths from cancer occurred in 2012 (Torre et al., 2015). Breast cancer is the most common type of cancer known and seen in women, and it is the most common cancer death in all societies, especially in developed western countries (Demirci, 1995). The biologically active compounds of plant origin are called phytochemicals. It provides a protective effect against cancer by holding oxidant radicals, activating detoxification enzymes and stimulating the immune system. Bioactive substances obtained from various parts of plants have been studied in research on cancer. The effects of these substances are supported by epidemiological data. In vitro and in vivo studies have shown that Ginseng affects many steps by stimulating apoptosis in cancer cells and stopping the cell cycle (Din et al., 2012; Lee, Kang and Kim, 2019). In this study, the time and dose dependent effects of Ginseng (*Panax quinquefolius*) on MDA-MB-231 cell lines were examined and evaluated. In our current study, Ginseng (*Panax quinquefolius*) extract was compared with doses of 1mg/ml and 2mg/ml and over two times as 24, 48 hours. In addition, it was observed that the group that stopped the cell cycle in the G0/G1 phase was the group with 1mg/ml for 48 hours. This shows that it will stop the proliferation of cancer cells.

Keywords: Ginseng, MDA-MB-231, *Panax quinquefolius*

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

KABUL VE ONAY.....	i
ETİK BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser Tanımı.....	3
2.1.2. Meme Kanseri.....	4
2.2. Hücre Hattı Kültürü	5
2.2.1. Hücre Hattı Kültürü Tanımı.....	5
2.2.2. Hücre Kültür Ortamı ve Kültür Şartları.....	6
2.2.3. Deney İçin Uygun Hücre Hattının Seçilmesi	7
2.2.4. Kullanılabilir Hücre Hattı Türleri	8
2.3. Kanser ve Beslenme	9
2.4. Fitokimyasallar ve Kanser İlişkisi	9
2.5. Ginseng (Panax quinquefolius)	10
2.5.1. Ginseng (Panax quinquefolius) ve Kanser	13
2.6. Hücre Döngüsü.....	14

2.7. Apoptoz ve Annexin V	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	16
3.1. Kullanılan Demirbaş ve Sarf Malzemeler.....	16
3.1.1. Demirbaş Malzemeler.....	16
3.1.2. Sarf Malzemeler	17
3.2. Ginseng (Panax quinquefolius) Ekstresinin Elde Edilmesi Ve Hazırlanması.....	18
3.3. Kullanılan Hücre Hatları.....	18
3.4. Besiyerinin Hazırlanması.....	18
3.5. Hücre Sayımı.....	19
3.6. Hücrelerin Pasajlanması.....	19
3.7. Hücrelerin Dondurulması.....	20
3.8. Deney Grupları ve Dozun Belirlenmesi.....	20
3.8.1. 24 ve 48 Saatlik süre Annexin Testi için.....	20
3.8.2. 24 ve 48 saatlik süre Cell Cycle Testi için	21
3.9. Annexin V Testi	21
3.10. Hücre Döngüsü Testi (Cell Cycle Test).....	22
3.11. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Annexin V Bulguları.....	26
4.2. Hücre Döngüsü Bulguları	30
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR.....	38
EKLER	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AG	: Amerikan Ginseng
BRCA-1	: Meme Kanseri -1 (Breast Cancer-1)
BRCA-2	: Meme Kanseri -2 (Breast Cancer-2)
CHO	: Karbonhidrat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ER	: Östrojen Reseptör
ER+	: Östrojen Reseptör Pozitif
ER-	: Östrojen Reseptör Negatif
FBS	: Fetal Bovin Serum
GE	: Ginseng Estresi
HCO₃	: Bikarbonat
HEPES	: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazine-1-Ethanesulfonic Acid
KDM5A	: Lysine Demethylase 5A
MCF-7	: Hormon pozitif meme kanseri
MDA-MB-231	: Hormon negatif meme kanseri
MG	: Miligram
ML	: Mililitre
NOX4	: NADPH Oxidase 4
PR	: Progesteron Hormon Reseptörü
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (Phosphate-Buffered Saline)
YY	: Yüzyıl
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
μM	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 4. 1. Annexin V& Dead Cell testinde 24 ve 48 saat sonunda erken apoptotik hücre sonuçları.	27
Tablo 4. 2. Annexin V& Dead Cell testinde 24 ve 48 saat sonunda geç apoptotik hücre yüzdeleri.	28
Tablo 4. 3. Annexin V& Dead Cell testinde 24 ve 48 saat sonunda toplam apoptotik hücre sonuçları.	29
Tablo 4. 4. Annexin V& Dead Cell testinde 24 ve 48 saat sonunda canlı hücre sonuçları.	29
Tablo 4. 5. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda G0/G1 evresindeki değişim sonuçları.	31
Tablo 4.6. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda S evresindeki değişim sonuçları.	32
Tablo 4.7. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda G2/M evresindeki değişim oranları.	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. Ginseng'in ana grupları ve Ginseng'den izole edilen yeni bileşikler, farklı hücre hatlarına karşı biyolojik ve anti-kanseröz aktiviteleri.....	12
Şekil 3.1. Ginseng (Panaxquinquefolius) ekstre hazırlanması.	18
Şekil 3.2. MDA-MB-231'in thoma lamı üzerinde mikroskop görüntüsü.....	19
Şekil 3.3. Well plate'e ekilmiş MDA-MB-231 hücresi ile Ginseng (Panaxquinquefolius) ve besi yeri	21
Şekil 3.4. (A) Muse cihazı için kullanılan kit. (B) Muse cihazı	24
Şekil 4. 1. Annexin V test sonuçları.....	26
Şekil 4. 2. 24 saat hücre döngüsü test sonuçları	30
Şekil 4. 3. 48 saat hücre döngüsü test sonuçları	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, insanlık için küresel bir tehdit haline gelmiştir. Kanser verilerine göre 2012 senesinde 14,1 milyon civarında kişi kansere yakalanmış ve 8,2 milyon civarında kişide kanserden ölmüştür (Torre ve ark., 2015). Ayrıca, bu rakamlar artan nüfus ve çevre kirliliği ile artmıştır. Kanser, herhangi bir organizmadaki hücrelerin kontrol dışı olarak bölünmesi, artması ve birikmesidir. Kanser, çoklu genler, hücre içi ortam ve komşu dokular arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklanır. Temel tümörjenez teorisi, sürecin, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör durdurucu genlerin baskılanması yoluyla normal bir hücre ile başladığını öne sürer. Dönüşümden sonra hücre anormal bir hücre gibi davranır, yani kanser hücresinin özelliklerini göstermeye başlar. Bu değişmiş hücreler, büyüme sinyalleri ile kendi kendine kontrolsüz bir şekilde çoğalma yetisi kazanır ve büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsızlaşır (Aggarwal, Van Kuiken, Iyer, Harikumar ve Sung, 2009). Kanser türleri içerisinde meme kanseri, kadınlarda en fazla bilinen kanser türüdür ve en başta gelişmiş batı toplumu ülkelerden sonra tüm toplumlarda kanser ölümleri içinde en çok görülmektedir. Elli yaşındaki bir kadında geriye kalan hayatı boyunca meme kanseri saptanma ihtimali %10 civarındadır. Bir çok genetik sendromlarda meme kanseri ihtimalini arttırmaktadır. Yirmi yaşından önce meme kanseri çok seyrek görülmektedir. Yirmi yaş sonrasında ise teşhis sıklığı artar ve 45-55 yaşlar arasında plato yapar, 55 yaşını geçince teşhisde artma gözlenir (Demirci, 1995). Apoptoz veya apoptozis, programlanmış hücre imhasının temel çeşitlerinden biridir; genetik sistemde kodlanmış kendi kendini imha etme programını kapsayan prosedürün aktifleşmesiyle tetiklenir. Birçok hücrede bulunan “intihar” kodlamasının en önemli amacı, streslerden onarımı olanaksız zararlar almış, vücutta ihtiyaç olmayan veya anormalleşmiş, genetiği bozulmuş hücrelerden kurtulmanın, olması gereken yoludur. Böylece daha sonra ortaya çıkabilecek komplikasyonlar önlenir (Kumar, Abbas ve Aster, 2015). Bu hücreler apoptozdan kaçarak sonunda tümörün büyümesine sebep olur. Tümör büyümeye devam ettikçe, kendisine besin sağlayan ilave kan damarlarının gelişmesi durumu ortaya çıkar, böylece kendisinin süreklileşmesi ve diğer dokuları tutmasına ardından ölümcül olan metastaz ile sonuçlanmasına sebep olur

(Kumar ve Weaver 2009; Chanmee, Ontong, Konno ve Itano 2014; Noy ve Pollard, 2014). Kemoprevensiyon, kanserin ilerlemesini önlemek, baskılamak ve tersine çevirmek için doğal, sentetik veya biyolojik ajanların kullanılması olarak tanımlanır (Chanmee ve ark., 2014).

Günümüzde çevresel faktörler, genetik yatkınlık ve yaşam tarzı ile kanser arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Tüm dünyada morbidite ve mortaliteyi etkileyen ciddi bir hastalıktır. Bu sebepten dolayı kanser tedavisinde veya önlemede etkili olan bileşenler araştırılmaya başlanmıştır. Bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyoaktif maddeler kanser konulu araştırmalarda incelenmiştir. Bu maddelerin etkileri epidemiyolojik verilerle desteklenmiştir. Ginseng bitkisi büyük kazık köklü, mevsimlik olmayan saçaklı bir bitkidir. 6-8 yıllık ginsenglerin köklerinin çapı 10 santimetreyi görmektedir, kırmızı ya da beyaz renklidir. Bitkinin yıllanmış dolgun, dallı saçakları, etken madde hazırlamada yararlanıldığından, Japonya, Kore, Çin, Amerika gibi ülkelerde doğada yabani yetişmesi ile birlikte, kültürü de yapılmaktadır. In vitro ve in vivo çalışmalar Ginseng'in kanser hücrelerinde apoptozu uyatarak ve hücre döngüsünü durdurarak bir çok basamağı etkilediğini göstermiştir (Din ve ark., 2012; Lee ve ark., 2019).

Binlerce yıldır kullanılan geleneksel bitkisel ilaçlar, dengeli bir sağlık durumunun korunmasında avantaj sağlamaktadır (Baeg ve So, 2013). Ayrıca, ginsengin kanser kemoprevansiyonunda koruyucu etkisi, kapsamlı laboratuvar ve prelinik çalışmalarla gösterilmiştir (Nag ve ark., 2012; Vanden Berghe, 2012).

Ginseng kemoprofilaktiktir ve genellikle çeşitli sinyal yolları aracılığıyla hücresel ve moleküler hedeflere etki eder, böylece hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz indüksiyonu, anjiyogenez ve proliferasyonun inhibisyonu yoluyla tümörü inhibe eder. Ginsengin antikanser etkilerinin, hücre proliferasyon araçlarının (sikline bağımlı kinazlar ve siklinler), büyüme faktörlerinin, tümör baskılayıcıların düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarının modülasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir. Son on yılda, bir dizi epidemiyolojik çalışma, ginseng tüketiminin kanser insidansını etkilediğini belirtmektedir (Nag ve ark., 2012; Vanden Berghe, 2012).

Bu çalışmada Ginseng (*Panax quinquefolius*) bitki ekstresinin MDA-MB-231 hücre hattına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanserin Tanımı

Kanser, hücrelerde genetik hasarların birikmesi sonucu, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla belirti veren hastalıklar grubuna verilen genel addır (Ruddon, 2007). Hücreler ışık mikroskobu ile izlenebilir çünkü küçük birimlerdir. Normal vücut hücreleri planlı olarak gelişir, çoğalır ve ölür. Doğduğumuz andan yetişkin oluncaya kadar normal hücreler daha hızlı çoğalır. Yetişkinlikten sonra, ölen hücreleri yenilemek ve iyileştirmek için çoğalmaya devam eder. Her hücrenin içinde var olan bir takım mekanizmalar, yeni hücre gerekmiyorsa, hücreye çoğalmasını sonlandırmasını sağlar. Buna rağmen kanser hücreleri, gelişmeye ve çoğalmaya devam ederek vücudun başka bölgelerine yayılır. Tümörler kanser hücrelerinin birikmesi ile oluşur. Tümörler sağlıklı dokuları sıkıştırabilir, içine girebilir veya hasar verebilir. Bununla birlikte kanser hücreleri gelişen tümörden ayrılırsa, lenf veya kan dolaşımı yolu ile vücudun başka yerlerine giderek, buralarda tümör yığınları oluşturarak çoğalmaya devam eder. Kanserin bu tarzda vücudun başka yerlerine ilerleme durumuna “metastaz” ismi verilir. Tümör vücudun diğer yerlerine ilerlemiş olsa dahi başladığı organın adı ile isimlendirilir (Chen ve ark., 2014).

Kanser sınıflandırılırken, oluşmaya başladığı organ ve mikroskop görüntüsündeki izlenimler dikkate alınır. Farklı tarzdaki kanserlerin büyüme hızları da farklıdır, bu nedenle farklı metastaz biçimleri göstererek farklı tedavilere cevap verir. Dolayısıyla hastalara, kanser çeşitlerine göre tedaviler uygulanır. Kanser verilerinin, diğer bir çok ülkeye göre daha düzgün tutulduğu Amerika'da, ortaya çıkan veriler kadınların üçte birinin, erkeklerin yarısının, ömürlerinin bir döneminde kansere yakalanma riski olacağını rapor etmişlerdir. Son zamanlarda, milyonlarca insan kanser hastası olarak ya da kanseri atlatmış bireyler olarak yaşamlarına devam etmektedir. Sağlıklı beslenme alışkanlıklarının kazanılması ile birlikte sigaranın bırakılması ve spor

aktiviteleriyle hayat tarzının güncellenmesi, birçok kanser türüne yakalanma olasılığını ciddi oranlarda düşürebilir. Kanser tedavisinde başarı oranının yüksek olması, erken teşhis ve dolayısı ile erken tedavi ile doğru orantılıdır (Din ve ark., 2012).

2.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda teşhis edilen ve izlenen, çok görülen kanser çeşididir. En sık görüldüğü gelişmiş batılı ülkelerden sonra tüm toplumlarda kanser ölümleri içinde en çok görülen kanser türüdür. Elli yaşındaki bir kadının daha sonraki hayatı boyunca, meme kanseri olma ihtimali ortalama %10'dur. Herediter bazı sendromların olması durumunda da meme kanserine yakalanma sıklığı yükselir. Bu sendromlara örnek şunlardır: Li-Fraumeri sendromu, Herediter meme-over kanseri sendromu, Cowden Sendromu, bölgeye spesifik herediter meme kanseri, Muir Sendromu. Yirmi yaş öncesinde meme kanseri çok seyrek görülmektedir. Yirmi yaş sonrasında ise teşhis sıklığı artar ve 45-55 yaşlar arasında plato yapar, 55 yaşını geçince teşhisde artma gözlenir (Demirci, 1995). Çoğunlukla anne veya kız kardeşlerinde meme kanseri görülmüş kadınlarda ihtimal daha yüksektir. Bu bireylerde kanser yaklaşık 10-12 yıl daha erken dönemde görülür. Meme kanseri olan vakalarda, diğer memede hastalık oluşması ihtimali de bariz olarak yükselmiştir. Meme kanserli hasta bulunan ailelerde bilateral meme kanseri riski de yükselmiştir. Ailede bilateral meme kanseri oluşumu, özellikle erken yaşta meme kanserine tutulma ihtimalini artırmaktadır. Daha önce uygulanan meme biyopsilerinde lobüler neoplazi, sellüler atipi, juvenil papillomatozis, atipik duktal hiperplazi görülen kadınlarda meme kanseri ihtimali yükselmiştir. Kan grubu 0 olanlarda erken yaşlarda meme kanseri, benign meme hastalıkları, over kistleri gözlenmektedir. Çok sayıda veride, gecikmiş olan menarşın, meme kanseri ihtimalini %30-50 oranında düşürdüğü görülmüştür. On iki yaşından önce menarş ise kanser ihtimalini 2 kat yükseltmektedir. Dolayısı ile erken menarş meme kanseri oluşumunda bir risk faktörüdür. Gebe olmayan kadınlarda insidansda yükseliş görülmüştür. İlk doğumu 30 yaşından sonra gerçekleşen kadınların meme kanseri olma ihtimali, ilk doğumu 18 yaşından sonra olanlara göre daha fazladır. Geç menopoza giren kadınlarda da görülme sıklığı artmaktadır. Postmenopozal hormon desteği ile meme kanseri insidans artışı tartışmalıdır ve araştırılmaktadır. Yapılan birtakım çalışmalarda postmenopozal hormon desteği alan kadınların mammografilerinde %25 kadar meme yoğunluğu yükselişi görülmüştür. “Hormon tedavisi; %36 kadar vakada memelerde

ağrıyı indükler, %17-32 vakada ise mammografik farklılıklara neden olur.” (Topuz ve ark., 1997).

Beslenme ile yağ ve kolesterol tüketimi ilişkilidir. Yağ tüketimi ile meme kanseri ilişkisinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Bu durum postmenopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara göre daha etkilidir. Postmenopozal obezitede ve kronik alkol tüketenlerde de risk yükselir. Meme kanserinde radyasyon da risk faktörüdür (Schairer ve ark., 2000; Bray, 2002).

Meme kanserlerindeki risk faktörleri, obesitesi olan postmenopozal kadınlar, geç menopo, erken menarş, alkol alımı, ileri yaş, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, geç yaşta ilk doğumunu yapmış kadınlar, pestisitlere maruz kalma, uzun dönem oral kontraseptif ilaç alımıdır. Ayrıca aile öyküsü, BRCA1 ve BRCA2 genlerini bulundurması, genetik olarak yatkınlık, daha önce geçirilen diğer benign meme hastalıklarıdır (Tuncel, 1998). Son zamanlarda çalışılan genetik uygulamalar, özellikle premenopozal meme kanserinin etiolojisinde genetik etmenlerin ön planda olduğu belirtilmiştir. Mutasyon gerçekleştirmiş BRCA1 ve BRCA2 genlerini bulunduranların meme kanseri riski bariz olarak yükselmiştir. Bu genler, 13. ve 17. kromozomlar üstünde yer almış ve bu genleri bulunduranlarda ortalama %85 oranında meme kanseri tespit edilmiştir. Bütün meme kanserlerinin %5'inde de BRCA1 ve BRCA2 genleri etkin olarak görülmüştür (Cardenosa ve Eklund, 1991). On üçüncü kromozomda var olan ressesif retinoblastoma geni bir tümör supressör gendir ve bu kromozomda heterojenitenin kaybı premenopozal meme kanserine sebep olmaktadır. Kolon kanserindeki gibi 17. kromozomdaki P53 supressör geni de meme kanseri oluşumunda önemli bir gen olup, bu genin kaybı ile meme kanseri arasında ilişki belirtilmiştir. Yine erb-B2 onkogeninin meme ve over kanseri prognozunu belirlemede önemli bilgiler verdiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 1997).

Meme kanserlerinin histopatolojisi araştırıldığında; %90'ının duktus epitelinden, % 10'unun lobül epitelinden köken aldığı tespit edilmiştir (Demirci, 1995).

2.2. Hücre Hattı Kültürü

2.2.1. Hücre Hattı Kültürü Tanımı

Hücre hattı, hücrelerin belirli kurallar ile büyütülmesi sürecidir. Uygulamada hücre hattı kültürü terimi, birden fazla hücreli ökaryotlardan, özellikle hayvan

dokularından elde edilen hücrelerin kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle çalışılan deneyler son zamanlarda güncel literatür konularında önemli yer tutmaktadır. Örneğin, kanser ve farklı patolojik durumlarda farklı preparatların işlevlerini veya bir hücre ve dokuda sentezlenen belirli bir maddenin işlevlerini göstermek sebebi ile hücre hatları çalışılmaktadır. Hücre kültüründe, istenen bir hücre hattından bölünmüş hücrelerde farklı denemeler ile canlı üzerinde uygulanamayan deneyler çalışılabilir ve bu çalışmalar ile bilgiler elde edilebilir. Hücre kültürü uygulamalarının gelişmesi ve yöntemleri, dokudan elde edilen hücre çalışmaları ile bağlıdır ve benzer özellikler barındırmaktadır. Doku ve hücre kültürü çalışmaları yüz yıldan fazla zamandır çalışılmaktadır. Hayvansal hücre kültürü yöntemleri 1900'lerin ortasından itibaren laboratuvarında düzenli bir şekilde çalışılmaya başlanmış ama ilk doku kaynaklarından ayırt edilen sürdürülebilir olarak hayatta kalan hücre hatları kavramı 19. yy. da oluşturulmuştur (Alberts ve ark., 2002).

Süspansiyon hücre kültürü; süspansiyon hücreler ortamda askıda kalmış olarak büyür. Bu hücreler, kültür kabına tutunmadan yaşayabilir ve çoğalabilir. Kemik iliği, dalak, kan ve yarı gelişmiş hücreler süspansiyon olarak gelişme eğilimindedir. Süspansiyon halinde ki hücreler bilyeye benzer şekilde izlenirler. Süspansiyon gelişmenin olumlu yanı sayıca fazla hücreyi çoğaltabilmek ve basit olarak kültürden alıp kullanabilmektir. Yapışkan hücre kültürü; bu hücreler tek katman olarak, yüzeye yapışarak gelişir. Endodermal, ektodermal embrionik hücre katmanlarından çoğalan hücreler tutunarak gelişme eğilimindedir. Bunlar, fibroblast ve epitel hücrelerini içermektedir. Tutunan hücreler farklı şekillerde olabilir, ama çoğunlukla düzdür. Süspansiyon halde gelişen aynı hücreler yuvarlak olabilir. Tutunarak büyümenin olumlu yanı, hücreleri düz yüzeylere tutturabilmektir. Bu özellikler, fonksiyonel testlerde, hibridizasyonda ve mikroskopta pratiklik oluşturur (Masters, 2002).

2.2.2. Hücre Kültür Ortamı ve Kültür Şartları

İhtiyaç olan besinleri, hormonları ,büyüme faktörlerini içerdikleri için kültür ortamı çoğaltılmak istenen hücre için en önemli bileşendir. İlk hücre hattı çalışmaları, doku içerikleri ve vücut mukozasından elde edilen kültür ortamı ile yapılmış olmasına karşın kültür ortamında standartlaşması gereklidir. Kültür ortamlarında olması gereken serum ihtiyacına göre serumsuz medium, serum-azaltılmış medium, temel medium olmak üzere üç gruba ayrılır. Serum; hormonlar, gelişme, lipidler, adezyon faktörleri,

ve mineral kaynağı olarak olağan besiyerindeki kültür hücreleri için çok önemlidir. Ayrıca serum hücre membranı sızdırmasını regüle ederek, mikrobeyinler, lipidler, eser elementler ve enzimlerin, ileticisi olarak iş yapar. Ayrıca serum tüketiminin yüksek ücret, standardizasyon sorunları, özellik farklılık ve gelişmenin ve/veya hücreyel özelliklerin indüklenmesi, inhibisyonu gibi olmaması gereken sonuçlara sebep olması gibi dezavantajları vardır (Masters, 2000).

Memeli hücre hatlarının tamamına yakını pH 7,4'te verimli büyürler ve değişik hücre soylarında çok az farklılık görülebilir. Aynı zamanda transforme hücre hatları düşük pH ortamda daha iyi gelişirler ve normal fibroblast hücre hatları yüksek pH şartı tercih eder. Büyüme medium'u pH'ı ayarlar ve kültürdeki pH değişikliklerine göre hücrelere tampon oluşturur. Çoğunlukla CO₂-bikarbonat yada organik tamponlar tercih edilir. Medium'un pH'ı homojen bikarbonat (HCO₃⁻) ve karbondioksit (CO₂) dengesine bağlıdır ve atmosferdeki CO₂ farklılaşması medium pH'ını değiştirebilir. Ayrıca CO₂-bikarbonat tamponlar tercih edilirken dışarıdan CO₂ desteği ihtiyaçtır. Hücre kültürü gerekli sıcaklığı, hücreleri izole edildiği konakçının büyük miktarda vücut sıcaklığı ile ilişkilidir ve anatomik değişikliklere kıyasla düşük derecede farklılıklar olabilir (örneğin epidermis sıcaklığı iskelet kası sıcaklığına kıyasla daha az olabilir). Hücre kültürünü çok ısıtmak az ısıtmaya kıyasla daha önemli bir sorundur, bu nedenden inkübatör sıcaklığı olması gereken sıcaklığın az miktarda altına ayarlanabilir. Çoğu memeli ve insan hücre kültürleri olması gereken gelişme için 36-37°C sıcaklığa ihtiyaç duyar (Coecke ve ark., 2005).

2.2.3. Deney İçin Uygun Hücre Hattının Seçilmesi

Çalışmalar için gerekli hücre hattı belirlenirken aşağıdaki şartlar göz önünde bulundurulmalıdır;

Tür: Primat ve insan hücresi olmayan hücre hatlarının çoğunlukla daha düşük biyogüvenlik önlemleri vardır ancak deneylerdeki pilot çalışmalar belirli tür kültürünü alınıp alınmayacağını belirleyecektir.

Fonksiyonel karakteristik: Deneylerin amacına göre belirlenir. Örneğin, böbrekten ve karaciğerden alınmış hücre hatları toksisite çalışmaları için daha elverişlidir.

Sınırlı veya sürekli: Sınırlı hücre hatlarını belirlemek doğru özelliklerin ortaya çıkması için daha çok seçenek verir, sürekli hücre hatlarını büyütmek ve sürdürmek çoğunlukla daha uygulanabilir olduğu gösterilmiştir.

Normal veya transforme olmuş: Transforme hücre hatları çoğunlukla artmış gelişme oranı ve yükselmiş yayılma durumu vardır, sürdürülebilirdir ve daha az medium kullanılması gerekir, ancak genetik değişim yoluyla fenotipte kalıcı farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Büyüme şartları ve karakteristik: Yüksek miktarda rekombinant protein ekspresyonu için hızlı gelişme yüzdesine sahip ve süspansiyonda gelişme yetisine sahip hücre hattı seçilir (Stacey ve MacDonald, 2001; Kaur ve Dufour, 2012).

2.2.4. Kullanılabilir Hücre Hattı Türleri

Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu ve Avrupa Hücre Kültür Koleksiyonu hücreler için temel kaynaklardır ve 80 çeşide ait 4000'den çok hücre kültürünü içerisinde bulundurmaktadır (Masters, 2002). Hücre hatları alındıkları doku tipi (deri, kan vb.), hastalık modeli (kanser hücre hatları, genetik hastalıklar vb.), hücre çeşidi (fibroblast, epitelial vb.), gibi durumlar belirlendiğinde çok farklı şekillerde sınıflandırılabilir (Bian, Yang, Feng, Sun ve Liu, 2017).

MDA-MB-231 Hücre Hattı

Meme kanseri çok görülen ve farklı alt çeşitleri barındıran son derece homojen olmayan bir hastalıktır. Meme kanserlerinin alt çeşitlerinin iyileşme durumları değişik olabileceğinden, alt çeşitlerinin içinden seçim yapabilmek çok önemlidir. Patolojik sonuçlar ve invaziv özelliklerine göre, yaygın meme kanserleri üç ana gruba ayrılabilir: invaziv olmayan, invaziv ve metastatik meme kanserleri (Ghoncheh, Pournamdar ve Salehiniya, 2016). Üçlü negatif meme kanseri, östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'den yoksun, oldukça agresif bir meme kanseri çeşididir. MDA-MB-231 hücresi ilk kez 51 yaşında bir kadından plevral efüzyonla izole edilmiştir. Adını izole edildiği merkez olan MD Anderson'dan aldı oldukça agresif östrojen reseptör negatif ve zayıf farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri hücre dizisidir (Polyak, 2007; Zeng, Li ve Chen, 2020).

2.3. Kanser ve Beslenme

Kanserlerin üçte birinin beslenme sonucu orta çıktığı gösterilmiştir. Sigara tüketimi, fazla dozda kimyasal ve pestisit maruz kalma, fazla alkol alımı, yağlı besinlerin fazla alımı, az miktarda meyve, sebze tüketimi, düşük lif tüketimi, nitrat, nitrit tuzu ilave edilmiş besinler, alev temas ederek ısıtılmış gıdalar, dumanlanmış, tuzlanmış ve tütsülenmiş besinlerin aşırı alımı, kanser ihtimalini yükselten faktörlerdendir. Kanser ihtimali, planlı, dengeli ve sağlıklı gıdalar ile, spor ve vücut ağırlığı yönetimi ile %30-40 oranında düşürülebilmektedir. Kanser beslenmesinde doğru tekniklerle beslenmek oldukça önemlidir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Karbonhidrat (CHO) Alımı: Günlük kaloringin %55-60'ı CHO lardan gelmelidir. Sükroz, reçel, bal gibi basit CHO ların tüketimi düşürülmeli; Tam tahıl, kuru baklagil gibi gıdalarda bulunan kompleks CHO lar arttırılmalıdır. (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Protein Alımı: Günlük kaloringin ortalama %12-15' i proteinlerden gelmeli ve kaliteli protein kaynakları arttırılmalıdır. (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Yağ Alımı: Günlük kaloringin %25-30'u yağlardan gelmelidir. Yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E, K) vücutta kullanımının mümkün olması için toplam kaloringin yağdan gelen oranı %20'nin altına inmemelidir. Balık yağı ve zeytin gibi tekli doymamış yağların beslenmedeki yağın %10-15'ini oluşturması tavsiye edilir. Kanola, mısır özü gibi yağlar çoklu doymamış yağlardır ve önerilen miktarı diyetdeki yağın %7-8' ini oluşturması tavsiye edilir. Tereyağı, et, peynir, yumurta, süt vb. besinlerde bulunan doymuş yağlar ve tavsiye edilen tüketim miktarı ise diyetle alınan toplam yağın yüzde 10'udur (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

2.4. Fitokimyasallar Ve Kanser İlişkisi

Bitkisel içerikli biyoaktif bileşiklere fitokimyasal adı verilir. Serbest radikalleri durdurarak, detoksifikasyon (toksinlerden arınma) enzim fonksiyonlarını indükleyerek ve bağışıklık sistemini indükleyerek kansere karşı kalkan etkisi göstermektedir (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Likopen: İnsanlar karoten üretmediklerinden dışarıdan besin olarak almaları gerekmektedir. İlk kaynağı domates olup likopen; kuşburnu, papaya, greyfurt ve

papayada bulunur. Likopenler hücre düzeyinde strese karşı koruma özelliğinden dolayı kanser riskini düşürmektedir.

Polifenol: Çoğunlukla tüm meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Oksijen radikalleri tutma kapasitesi ve demiri indirgeme performansına göre güçlü antioksidanlardır. Bu yüzden kansere karşı koruma etkisi vardır. Fenolik asit ve flavonoid olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Fenolik Asit: Greyfurt, portakal, üzüm, elma fenolik asit kaynakları olarak bilinir ve kanserin önemli sebebi olan serbest radikallere ve diğer oksijen radikalleri çeşitlerine karşı yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir. Hücrel strese karşı yüksek baskılama kapasitesine sahiptir. Ayrıca fenolik asitin immün sistemi indükleyici etkisi vardır (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Flavonoid: İnsan vücudunda üretilmeyen flavonoid; çay, meyve, kakao, sebze gibi gıdalarda mevcuttur. Hem antioksidan olarak hemde oksijen radikalleri tutucusu olarak kansere karşı koruyucu etki gösterirler (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

Allilik Sülfid: Soğan ve sarımsakta bulunmaktadır. Bağışıklık sistemini uyarak, radikallerin yıkımını indükleyerek ve kanser hücresi çoğalmasını inhibe ederek enzimleri aktive ederek kansere karşı koruyucu etki gösterir (Yıldız ve Demir, 2004; Yıldız, 2012; Kasnak ve Palamutoğlu, 2015).

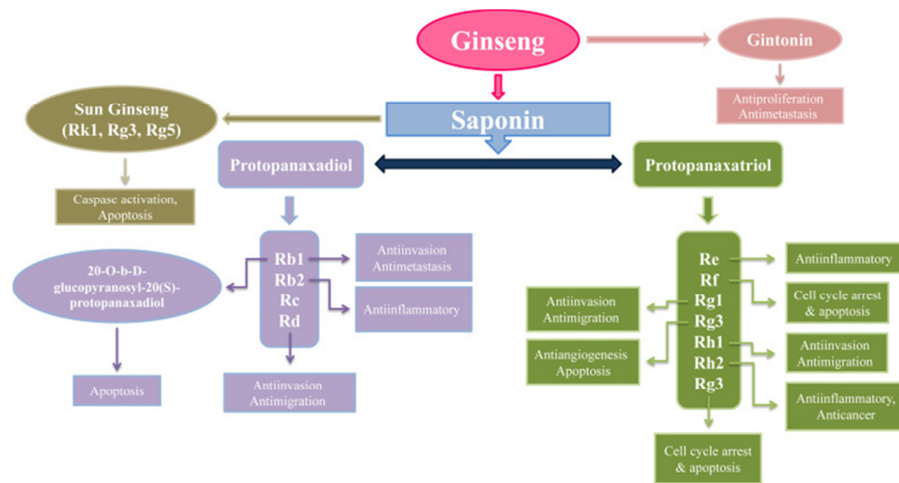
2.5. Ginseng (*Panax quinquefolius*)

Tarihte ilk olarak, mucizevi etkilerinden dolayı sadece Çin imparatoru ve yakın çevresi tarafından kullanımına izin verilmiştir. Zamanla askerlerin dayanıklılığını artırması ve mücadele ruhunu güçlendirmesi nedeniyle tüm ordu tarafından kullanılmıştır. Dokuzuncu yy'da Araplar Çin'e gidip Ginseng ile tanışmışlardır. On üçüncü yy'da ise Marco Polo Çin'e gidip Ginseng'in etkilerini gözlemlemiştir. Bu gelişmelerden sonra diğer ülkelerde de kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. 1952 yılında Alman botanist C.A. Meyer'in kendi Avrupa botanik yayınında bitkiyi tanımlamasıyla Avrupa ülkelerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Ginseng, sarmaşıkgiller familyasına ait çok yıllık bir bitki çeşidini oluşturuyor. Latince adı "tam iyileşme" anlamındaki "panax" olan bu bitki, ağırlıklı olarak Doğu Asya'da yetişiyor.

Ancak Kuzey Yarımküre'nin uygun iklim koşullarına sahip farklı bölgelerinde de görülebiliyor. Olgunlaşması ve hasadı dört ila on yılı bulan ginseng, kök bitki olması bakımından görünüm itibarıyla zencefile benziyor. Ginseng bitkisi, yetiştiği bölgelere göre “Asya-Kore ginsengi”, “Amerikan ginsengi” ve “Sibirya ginsengi” olmak üzere üç temel türe ayrılıyor. Bunun yanı sıra hasat zamanına göre türleri “beyaz ginseng” ve “kırmızı ginseng” olarak da adlandırılabilir (Carpenter ve Cottam, 1982; Polczinski, 1982).

Ginsengin kimyasal bileşimi saponin ve saponin olmayan iki ana tipe ayrılır. Ginseng bileşenlerinin çoğu saponin değildir. Karbonhidratları, nitrojen içeren bileşikler, mineralleri ve vitaminleri içerir. Ginseng'deki karbonhidratlar arasında polisakkaritler, oligosakkaritler, şeker, lif ve pektin bulunur; en büyük ve aktif karbonhidratlar polisakkaritler olup, ginseng bileşenlerinin %50-60'ını içerir (Lee ve ark., 2019). Ginseng'deki sonraki ana bileşenler, nitrojen içeren bileşiklerdir protein, peptitler, amino asitler, nükleik asitler ve alkaloidler, fitosterol, organik asitler, fenolikler ve poliasetilenlerden oluşur. Bununla birlikte, saponinler, ginsengin en çok çalışılan biyoaktif bileşenleridir. Çoğunlukla ginsenosidler olarak bilinen saponinler, 2,3-oksidoskualenden türetilir. İlgili enzime bağlı olarak, daha sonra sırasıyla tetrasiklik dammaran tipi ve pentasiklik oleanan tipi saponinlere dönüştürülen dammarenediol-II ve β -amirin olmak üzere farklı ginsenosid öncülleri üretilir (Hong, Baatar ve Hwang, 2021). Ayrıca, dammaran tipi saponinler, hidroksil gruplarının konumuna ve genlerinin çift bağına bağlı olarak iki farklı kategoridedir (Shin, Kwon ve Park, 2015). 66 protopanaksadiol, 50 protopanaksatriol ve 19 oleanan tipi ginsenosid dahil olmak üzere 100'den fazla ginsenosid belgelenmiştir. Ginsenosidlerin çeşitliliği, stereoizomerleri ve yapısal izomerleri ile ilgilidir. Rg2, Rg3, Rh1 ve Rh2 gibi bazı ginsenosidler, C-20'deki hidroksil grubunun konumuna bağlı olarak farklı stereoizomerik formlarda, 20-(S) ve 20-(R) bulunur. Rb2, Rb3, Rc, aglikon, Rg1 ve F11 dahil olmak üzere diğer ginsenosidler, farklı sakkarit ikame edicileri içerir (Hong, Baatar ve Hwang, 2021). Ancak, tüm ginsenositler ginseng'de doğal olarak oluşmaz. Ginsengin ginsenosid bileşenlerini etkileyen birkaç faktör vardır; Yetiştirme yöntemi, hasat yaşı ve hazırlık tedavisi (Yu ve ark., 2019). Genel olarak, yabancı ginsengin ekili olana kıyasla daha iyi farmakolojik etkilere sahip olduğuna inanılmaktadır. Ancak, artan talep ve yabancı ginsengin aşırı toplanması nedeniyle, ormanlarda yetiştirilen yabancı simüle edilmiş ginseng ve tarlalarda yetiştirilen ginseng artık daha çok kullanılmaktadır. Ormanda

yetiştirilen vahşi simüle edilmiş ginseng, tarlada yetiştirilen ginseng'den daha fazla Rb1 ve Re içeriğine sahiptir (Bing ve Chengwei, 2021). Bir diğer önemli faktör ise hasat zamanıdır. Ginsenosidler çoğunlukla genç bitkilerde (1-2 yaş) yapraklarda ve daha sonraki yaşlarda (yaklaşık 5 yaş) köklerde toplanır; bu nedenle, ekili ginsengler çoğunlukla 4-6 yaşlarında hasat edilir. Ayrıca, ilkbaharda hasat edilen ginseng, diğer mevsimlere göre en fazla toplam saponin içeriğine sahiptir ve Re içerikleri ilkbahar sonlarında daha yüksek ve sonbaharda Rg1 içeriklerinden daha düşüktür (Yujin, Diem, Thuy, Hyesu ve Kyung-Sun, 2020). Hasat edilen ginseng taze halde veya kurutulduktan sonra tüketilebilir. Kurutulmuş ginseng, genellikle beyaz ginseng olarak adlandırılırken, kırmızı ginseng, ginseng'in taze kökünün buharda pişirilmesiyle hazırlanır. Buharlama, ginsengin kimyasal bileşimini, beyaz ve kırmızı ginseng farklı miktarlarda veya çeşitlerde ginsenosid içerecek şekilde değiştirir (Kim ve ark., 2021). Doğal olarak oluşan ginsenosidler, hasat edilmiş taze ginseng'den ekstre edilebilir, ancak çoğu ginsenosid, orijinal formlarından fiziksel, kimyasal veya biyotransformasyon yöntemleriyle dönüştürülür (Hong ve ark., 2021). Örneğin, majör ginsenosidler (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re ve Rg1) minör ginsenosidlere (F2, Rh2, Rg2, Rg3 ve CK) deglikozile edilebilir (Lee ve ark., 2020). Kore ginsengi (*P. ginseng*) Çin (*P. notoginseng*) veya Amerikan (*P. quinquefolius*) türlerinden daha fazla majör ginsenosid içerdiğinden, genetik de ginsenosid içeriğinde rol oynar (Hong ve ark., 2021). (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1. Ginseng'in ana grupları ve Ginseng'den izole edilen yeni bileşikler, farklı hücre hatlarına karşı biyolojik ve anti-kanseröz aktiviteleri (Hong ve ark., 2021)

2.5.1. Ginseng (*Panax quinquefolius*) ve Kanser

Kanser insidansı son yıllarda önemli ölçüde artmaktadır. Birçok kanser tedavi yönteminden biri kemoterapidir. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi biçimindeki geleneksel tıp, kanseri tedavi etmek için aktif olarak kullanılmaktadır ve bu tür tedavilerin birçok şifalı bitkisi ve aktif bileşeni, bunları modern tıbbı entegre etmek için yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Ginseng geleneksel olarak Asya ülkelerinde besleyici bir tonik olarak ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Modern tıpta ginseng'in terapötik potansiyeli kapsamlı bir şekilde incelenmiştir; ginsengin ana biyoaktif bileşeni, özellikle kanser gibi ölümcül hastalıkların tedavisindeki beklentileri nedeniyle dikkat çeken ginsenosidlerdir. Ginsenosidler antikanser ve antimetastatik özelliklerini sadece kanser hücresi proliferasyonunu, canlılığını, invazyon ve göçün yanı sıra meme, beyin, karaciğer, mide ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde apoptoz, hücre döngüsü durması ve otofajiyi teşvik ederek gösterirler. Ek olarak, ginsenosidler, kanser tedavileriyle sinerjik olarak çalışabilir. Bu nedenle, ginsenosidler, kanser için yeni terapötik stratejilerde tek başına veya diğer farmasötik maddelerle kombinasyon halinde kullanılabilir (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019).

Meme kanseri kadınlarda çok görülen kanser çeşididir ve geç evrede tespit edildiğinde ölüm oranı yüksektir. Bununla birlikte, erken tespit edilen meme kanseri, yüksek tedavi olasılığı nedeniyle insidans oranına kıyasla daha düşük bir ölüm oranına sahiptir (Momenimovahed ve Salehiniya, 2019). En çok çalışılan ginsenosidlerden biri olan Rg3, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Akt aracılı kendi kendini yenileme sinyalini inhibe etmek gibi hücre bölünmesi ve protein sentezi ile ilgili iç içe geçmiş birkaç biyolojik yolla meme kanserini baskıladı. Ek olarak, Rg3, epigenetik metilasyonu değiştirerek NOX4'ü aşağı regüle ederek ve KDM5A'yı yukarı regüle ederek meme kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebilir. Benzer şekilde, immün yanıtla ilişkili genlerin Rh2 modülasyonlu epigenetik metilasyonu kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir. Rd ayrıca miR-18a aracılı Smad2 ekspresyonunu aşağı regüle ederek ve MDA MB-231 ve 4T1 hücrelerinin kültürlü veya fare ksenograft modelinde anjiyogenez ile ilişkili vasküler endotelial büyüme faktörü kaynaklı Akt aktivasyonunu inhibe ederek metastazı bastırdı (Kim ve ark., 2020). Rg3 ve Rd tarafından Akt ile aktive olan hücre proliferasyonunu durdurarak meme kanseri metastazının bloke edilmesine benzer şekilde, CK ginsenosid, SKBR3 hücrelerinde apoptozu teşvik etmek için Akt1 sinyalini bastırdı (Kim ve ark., 2021). Ayrıca, CK, Rg5 ve Rk1, sırasıyla

siklin D1, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Akt ve reaktif oksijen türleri (ROS)/PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe ederek fare ksenograft modellerinde tümör büyümesini baskılamıştır. Hayatta kalmanın kilit bir düzenleyicisi olan PI3K/Akt yolunun aktivasyonu, hücre büyümesi ve hayatta kalmasının kontrolünün çıkarımı ile sonuçlanır ve sonuçta metastatik yeterlilik, anjiyogenez ve tedavi direncine yol açar (Porta, Paglino ve Mosca, 2014). Ayrıca, Rg2, Rg5 ve CK ginsenosid türevleri, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde p53 ekspresyonunu düzenleyerek otofaji, apoptoz ve hücre döngüsü durmasını indüklemiştir (Hong ve ark., 2021). PPT ile birleştirilen Rh2, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'de hücre proliferasyonunu geciktirmede sinerjik bir etkiye sahipti. İlginç bir şekilde, stereoizomerizm, ginsenosidlerin gücünde de rol oynar; örneğin, Rg3'ün iki izomerinden 20-(R), MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde metastazı (göç ve istila) engellemede daha etkiliydi. Birlikte ele alındığında, ginsenosidler farklılaşma, çoğalma ve metastazı inhibe ederek antikanser etkilerini sergiler ve meme kanseri hücre dizilerinde karsinogenez ile ilgili yolları değiştirerek otofaji, apoptoz ve hücre döngüsü durmasını indükler (Nakhjavani ve ark., 2021).

2.6. Hücre Döngüsü

Ökaryotik hücrelerde bölünmenin sadece tek aşamasında (S fazında) DNA sentezi oluşur. S fazından önce ve sonra tek zaman aralığı vardır. Bu yüzden hücre döngüsü G1 (ilk aralık), S (sentez), G2 (ikinci aralık) ve M (mitoz) ile dört aşamada oluşur. G1, G2 ve S aşamalarının tamamı İnterfaz şeklinde adlandırılır ve mitozun hazırlık aşaması olarak kabul edilir (Cooper, 1994).

G1 Evresi: Bu evre en uzun evreyi oluşturur. Sitokinezin ardından yeni oluşan hücre boyutu olağan hücre boyutunun yarısıdır. Bundan dolayı G1 kısmındaki hücre en uygun boyuta gelene kadar devamlı olarak büyür. Bu noktadan sonra hücre S evresini sürdürüp bölünmeye gider veya G0 evresine geçer (Cooper, 1994).

G0 Evresi: Memeli hücresinde işlevsel olarak farklılaşma görülür. Bu hücreler G0 kısmında yer alırlar. Bu noktada hücre, protein sentezlemesi ile sekresyon yapar. Bundan dolayı işlevseldir. G0 aşaması kalıcı olmamaktadır, uygun sinyal alındığında S fazına geçer ve bölünür (Cooper, 1994).

S Evresi: Bütün DNA replikasyonunun iki katına geçtiği evredir. Bu kısımda oluşmakta olan DNA molekülleri kardeş kromatitler şeklinde isimlendirilmektedir. Her iki kohesin ismi verilen proteinlere bağlanmaktadır (Cooper, 1994).

G2 Evresi: Mitoz için enzimlerin sentezlenmesi yapılır. Bunun yanında tamamlanması eksik kalmış ya da hatalı DNA sentezi kontrolü yapılarak hatalı DNA'nın mitoz alanına girişı önlenir (Cooper, 1994).

M kontrol noktası kromozomların mitotik içcik üzerinde düzenli bir şekilde yer almalarını kontrol eder. Bölünen kromozom yavru hücelere tam bir kromozom seti halinde geçer (Cooper, 1994).

2.7. Apopitoz ve Annexin V

Anneksin V, anneksin grubundaki bir hücrel proteindir . Akış sitometrisinde, anneksin V, plazma zarının dış yaprağındayken apoptozun bir belirteci olan fosfatidilserine bağlanma yeteneğı ile apoptotik hüceleri saptamak için yaygın olarak kullanılır. Hücrel apoptoz çalışmaları, akış sitometrisi tabanlı yöntemlerin tanıtılmasından bu yana önemli ölçüde etkilenmiştir. Propidium iyodür de, hücelerin canlı, apoptotik veya nekrotik olup olmadığını belirlemek için Annexin V ile birlikte, plazma membran bütünlüğü ve geçirgenliğı farklılıkları aracılığıyla kullanılır (Rieger, Nelson, Konowalchuk ve Barreda, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Demirbaş Ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Demirbaş Malzemeler

- Hava Kabini (Clean Air)
- Buzdolabı +4°C (Siemens, no. KG57NVW20N)
- Derin Dondurucu (-20°C)
- Derin Dondurucu (-80°C)
- Sıvı Azot Tankı -196°C (MVE/Chart)
- İnvert Mikroskop (Nikon Eclipse TS100)
- Santrifüj (Gyrozen 1580)
- Hassas Terazî (Radwag)
- Pipet Tabancası (Gilson)
- Mikropipet seti (Gilson)
- Vorteks (Ika)
- CO² inkübatör (Sanyo, MCO-19 A/C(UV))
- Flow sitometri cihazı (Invitrogen™ Attune™ CytPix™)
- Muse™ Analyzer Cihazı (Guava)
- Otoklav (Alp, CL-40M)

➤ Mikrosantrifüj

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest)
- L-Glutamin (Capricorn Scientific)
- Penisilin-streptomisin (Sigma Life Science 046M4846V)
- Trypsin-EDTA (%0,05) (Sigma Life Science SLCH8830)
- Pipet (Serolojik) 5 mL, 10 mL, 25 mL (Sarstedt)
- Steril 24 Kuyucuklu Plaklar (Corning)
- Pipet ucu 0,1-10 µL, 5-200 µL, 200-1000 µL (Gilson)
- Santrifüj (Falkon) Tüpleri (Greiner Bio one)
- 0.22µm filtre (Isolab 000H02092)
- Hücre kültür plakları 25 cm² (Greiner Bio one)
- Hücre kültür plakları 75 cm² (Greiner Bio one)
- Thoma Lami (Marienfeld-Superior)
- Annexin V and Dead Cell Assay Kit (MCH100105)
- Muse Cell Cycle Kit (MCH100106)
- Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (Biochrom, kat.no. L 1825)
- Etanol (Merck)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (BioChemica)
- Tween-20 (BIO-RAD)
- 4x Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD)
- DMEM (Capricorn Scientific CP21-4310)
- Ginseng (Panax quinquefolius) (Gnc Herbal Plus®)

3.2. Ginseng (*Panax Quinquefolius*) Ekstresinin Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Ginseng (*Panax quinquefolius*), sertifikalı satıcıdan temin edildi. , 100ml su da 3gr olacak şekilde 85 santigrat derece de 5 dakika suda demlenerek sulu ekstre elde edildi ardından santrifüj edildi ve süpernatant 0.22µm filtre ile steril edilerek hücrelerde kullanılmak üzere falkonlara alındı. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. (A) ,(B) Toz Ginseng (*Panax quinquefolius*) (C). Demleme Anı (D). Steril olarak falkonlara alınmış hali

3.3. Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresinin meme kanseri üzerine olası etkileri analiz edilirken, meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231 hücresi kullanıldı. Çalışmada kullanılan hücreler Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök hücre Merkezi (Gen-Kök) Laboratuvar stoklarından temin edildi.

3.4. Besiyerinin Hazırlanması

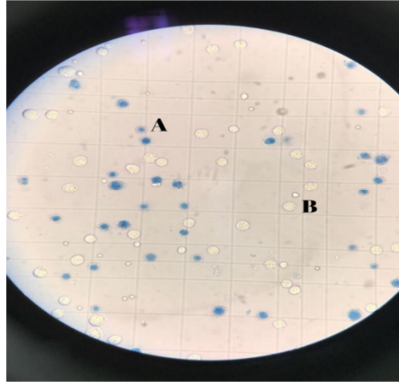
Besiyeri hazırlama işlemi steril biyogüvenlik hava akım kabini içerisinde yapıldı. Besiyerinin saklanacağı tüpler 50 ml'lik falkonlar olarak belirlendi. 100 ml'lik kültür besiyeri için %84 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %15 Fetal

Bovine Serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin kullanıldı. Besiyeri hazırlanırken kontaminasyonu engellemek için maddeler 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Oluşturulan besiyeri +4 °C'de bekletildi.

3.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı trypan mavi boyaması yöntemiyle yapıldı. Hücreler negatif yüklü olan trypan mavisi ile muamele edildiğinde, membran bütünlüğünü koruyan canlı hücreler boyayı hücre içine almayıp parlak renkli görülürken membran bütünlüğünü kaybeden ölü hücreler ise mavi renkte görülürler. Hücre sayımı için falkon tüp içerisinde 20µl hücre süspansiyonu 0,5ml bir ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine 20µl %0.4 (w/v) trypan mavisi eklendi. Pipetaj yapılarak boya ile hücrelerin karışması sağlandı. Daha sonra Thoma lamı üzerine lameli yerleştirildi. Lam üzerinde yer alan iki alana 10µl bu karışımdan konuldu. Lam invert ışık mikroskobu altında incelendi (Şekil 3.2). Her iki alanda 40× büyütme oranında 16 büyük karede var olan canlı hücreler sayıldı ve ortalaması alındı. Süspansiyondaki hücre sayısının belirlenmesi aşağıdaki hesaplama göre yapıldı:

$$1\text{ml'deki hücre sayısı} = \text{görülen bölgelerin ortalama sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$



Şekil 3.2. MDA-MB-231'in mikroskop görüntüsü: (A) ölü hücre, (B) canlı hücre

3.6. Hücrelerin Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre hatları flask tabanını tamamen kapladıklarında (konfluense ulaşmak) flask içerisindeki ölü hücreleri ve hücre artıklarını içeren besiyeri dikkatlice aspire edildi. Hücrelerin tamamen eski besiyerinden arındırılması için flask içerisine 1ml 1X steril DPBS eklendi ve hücrelerin yüzeyi yıkandı. Daha sonra PBS

uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Daha sonra adherent hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için 1ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Flask 37 °C’de, %5 CO²’li inkübatörde 1dk tripsin ile muamele edildi. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Tamamı yuvarlak görülen hücreler artık yüzeyden ayrılmış kabul edildi. Tripsin inhibisyonu için 5 ml taze besiyeri eklendi. Hücreler falkon tüpe aktarılıp 1500 rpm’de 5 dk santrifüj uygulandı. Santrifüj sonrası süpernatant ayrıldı. Hücre pelleti içine 5 ml besiyeri koyuldu. 5ml’lik hücre süspansiyonu 25 cm² lik flaska alınarak, hücre kültür flaskları içerisine pasaj sayısı ve tarih yazılarak, 37°C’de, %5 CO² inkübatöre kaldırıldı. Bu şekilde sonraki deneylerde kullanmaya yetecek kadar hücrelerin çoğalmaları sağlandı.

3.7. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler pasajlanırken, bir takım hücrelerin pasajına devam edilirken, bir kısım hücre ileri çalışmalarda tekrar kullanılması amacıyla dondurup saklandı. Hücreler konfluense ulaştıktan sonra flasttaki besiyeri ayrıldı. Hücreler steril 1X DPBS ile temizlendi. Devamında %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler flask tabanından serbest bırakıldı. Hücre süspansiyonu içine 5ml besiyeri koyuldu ve falkon tüpüne aktarıldı. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrıldı. Pellet 900 µl besiyeri ile süspanse edildi. Kriyovial tüpe hücre süspansiyonu geçirildi. İçerisine 100µl DMSO ilave edildi. Kriyovial önce -20°C’de bir saat bekletildi. Daha sonra -80°C’lik dondurucuya yerleştirildi. 1-2 gün sonra -196 °C’lik sıvı azot tüplerine taşınarak daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

3.8. Deney Grupları Ve Dozun Belirlenmesi

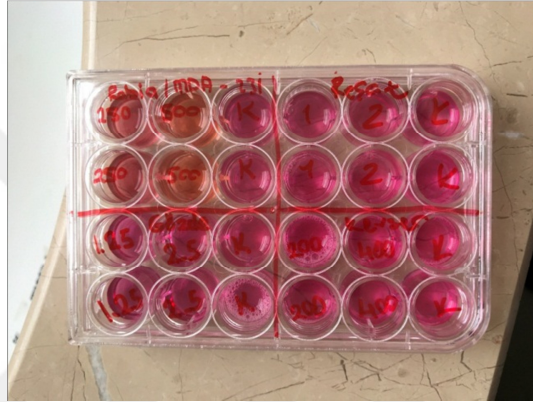
Bu çalışmada MDA-MB-231 hücreleri üzerinde Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresinin 1 ve 2 mg/ml dozları 24, 48 saat süre ile kültüre edildi (Şekil 3.3.).

3.8.1. 24 ve 48 saat süre ile Annexin Test Grupları:

- 1- Kontrol Grubu: 1 x 10⁴ MDA-MB-231 hücresi + Besiyeri
- 2- Ginseng (*Panax quinquefolius*) Grubu: 1 x 10⁴ MDA-MB-231 hücresi + 1 mg/ml Ginseng (*Panax quinquefolius*) + Besiyeri
- 3- Ginseng (*Panax quinquefolius*) Grubu: 1 x 10⁴ MDA-MB-231 hücresi + 2 mg/ml Ginseng (*Panax quinquefolius*)

3.8.2. 24 ve 48 saatlik süre ile Hücre Döngüsü Test Grupları :

- 1- Kontrol Grubu: 1×10^4 MDA-MB-231 hücresi + Besiyeri
- 2- Ginseng (Panax quinquefolius) Grubu: 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 1 mg/ml Ginseng (Panax quinquefolius) + Besiyeri
- 3- Ginseng (Panax quinquefolius) Grubu: 1×10^6 MDA-MB-231 hücresi + 2 mg/ml Ginseng (Panax quinquefolius)



Şekil 3.3. Kuyucuklara ekilmiş MDA-MB-231 hücresi ile Ginseng (Panax quinquefolius) muamelesi

3.9. Annexin V Testi

Testin yapılması için Muse Cell Analyzer (Millipore, ABD) aleti ve alete uyumlu Muse Annexin V ve Ölü Hücre kitinden yararlanıldı. Muse Annexin V ve Ölü hücre kiti, apoptotik hücrelerin dış zarındaki PS'yi saptamak için Annexin V den yararlanıldı. Bu test ile erken apoptotik fazdaki ve geç apoptotik fazdaki hücrelerin ve toplam apoptotik hücrelerin oranları belirlendi. Deney 24 ve 48 saatlik olmak üzere iki farklı periyodu içine alacak şekilde ayarlandı. Hücrelerin kültürlenebilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kapları kullanıldı. Bu kapları kapaklarının üstüne grupların adları asetatlı kalemle yazılarak hücrelerin ve maddelerin nereye yerleştirileceği belirlendi. Her grup için sekiz kuyucuk ayrıldı. Her bir kuyucuğa içinde 10.000 MDA-MB-231 hücresi olan 1 ml steril besiyeri ilave edildi.

Kontrol grubu için kuyulara standart besi yeri ilave edilirken ginseng grubunda herbir kuyucuğa, içinde ginseng bulunan 1 ml besi yeri; 1 ve 2 mg/ml ginseng gruplarında da 1 ve 2 mg/ml ginseng olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her bir kuyucuk

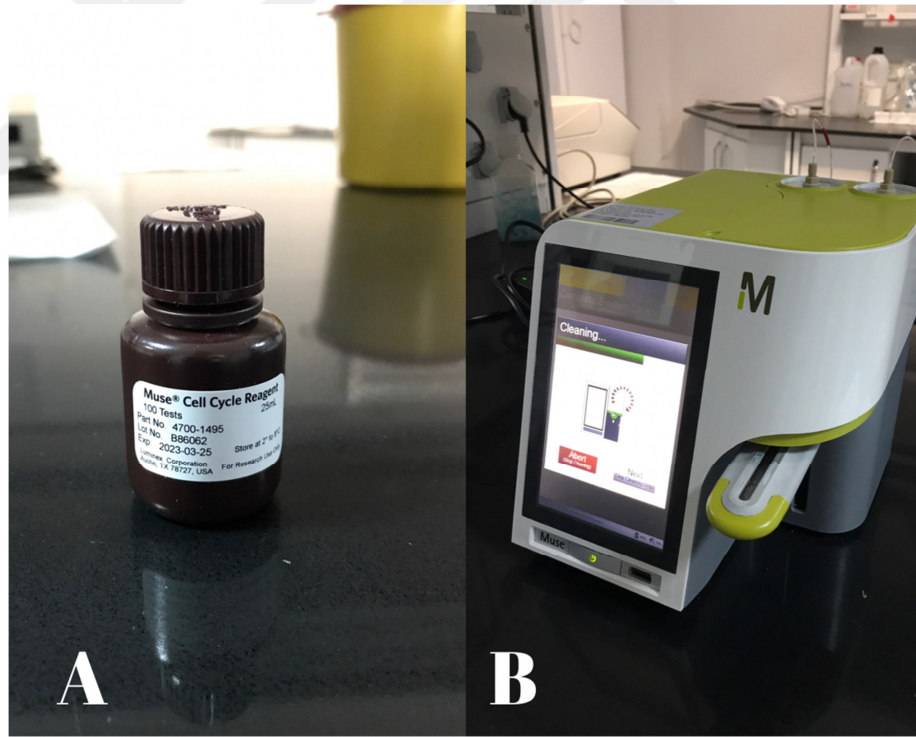
ayrı tek kullanımlık steril pipet ucuyla pipetaj yapılarak hücre ve besi yerinin karışması sağlandı. Ekim işlemi bittikten sonra kültür kapları 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde saklandı. Ayrıca ekim yapılmış olan her bir kuyucuk için bir adet 1,5 ml’lik standart tüp gruplara göre belirlendi. Yirmi dört saat sonra inkübatörden alınan kültür kaplarının kuyucukları pipet ve steril pipet uçları yardımı ile kendilerine ait olan ependorf tüplerine bırakıldı. Ayrıca Annexin V ve ölü hücre kiti buzdolabından alınarak oda sıcaklığına gelmesi için beklendi. Kuyucuklar boşaltılırken kültür kabı ortalama 45 derecelik bir açıyla sabitlendi ve hücrelerin çökme durumuna karşı sıvı pipetaj yapılarak alındı ve tüplere bırakıldı. Tüpler, belirli açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g’de 5 dk santrifüj uygulandı. Santrifüj den sonra tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet aracılığı ile uzaklaştırıldıktan sonra tüplere birer ml steril fosfat tamponlu tuzlu su ilave edildi. Fosfat tamponlu tuzlu su ilave edildikten sonra vortekslenen tüpler tekrar sabit açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g’de 5 dk santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki supernatant atıldıktan sonra tüplerin herbirine 100 µl %1’lik Fetal Bovine Serum ve 100 µl Annexin V kit sıvısı eklendi. Tüpler vortekslendi ve 20 dk 24 0C’de karanlık ortamda inkübe edildi. Bu esnada Muse Cell Analyzer aleti standart sıvılar ile ön yıkama yapılarak alet örnek okumak için hazır duruma getirildi. 20. dakikanın sonunda tüpler tek tek aletin örnek haznesine koyularak analiz yapıldı. Analiz işlemine, kontrol grubundan başlandı ve birinci örnek analiz edilirken hücrelerin yoğunluğuna göre bulunduğu bölge aletin ekranından belirlenerek değerlerin bu bölgeden alınması sağlandı, sulandırma yüzdesi belirlendikten sonra diğer örneklerin analizine devam edildi. Her bir grup ardından alete hızlı yıkama uygulandı. Tüm veriler aletin hafızasına kaydedildikten sonra USB bellek ile alındı. Aynı prosedür 24 ve 48 saatlik periyotlar sonrasında uygulanmış oldu ve sonuçlar kaydedildi.

3.10. Hücre Döngüsü Testi (Cell Cycle Test)

Muse hücre döngüsü kiti, tüm hücre döngüsü fazlarındaki (G0 / G1, S ve G2 / M) hücre yüzdesini birbirinden ayırmak ve ölçmek için DNA içeriğinin propidyum iyodür temelli boyama usulüne göre kullanıldı. Testin gerçekleştirilebilmesi için Muse Cell Analyzer aleti ve alete uyumlu Muse Cell Cycle kiti kullanıldı. Bu test ile, Muse Cell Analyzer’da hücre döngüsünün G0 / G1, S ve G2 / M fazlarındaki hücre oranlarının kolay ve hızlı kantitatif ölçümleri sağlandı. Deney başlangıcından bir gün önce deney için ihtiyaç olan besi yerleri ve gerekli solüsyonlar ve malzemeler

hazırlandı. Test için ihtiyaç olan %70'lik etil alkol, %100'lük absöüt alkol ve distile su ile; 70 ml alkol, 30 ml distile su yüzdesine göre hazırlandıktan sonra kapağı kapalı bir şişede -20°C'lik yerde saklandı. Deney 24 ve 48 saatlik olmak üzere iki farklı periyodu içine alacak şekilde planlandı. Hücrelerin kültüre edilmesi için 24 kuyucuklu steril tek kullanımlık kültür kapları hazırlandı. Kültür kaplarının kapaklarının üst yüzlerine grupların adları asetatlı kalemle yazılarak hangi grubun, hücrenin ve maddenin nereye yerleştirileceği belirlendi. Her grup için 8 kuyucuk ayrıldı. Her kuyucuğa 1.000.000 MDA- MB-231 hücresi ilave edildi. Bunun üzerine 1 ml besiyeri ilave edildi. Kontrol grubu için kuyucuklara standart besi yeri ilave edilirken ginseng grubunda her bir kuyucuğa içinde ginseng bulunan 1 ml besi yeri; 1mg/ml ve 2mg/ml ginseng gruplarında da her 1 ml besi yerinde 1mg/ml ve 2mg/ml ginseng bulunacak şekilde ekimler yapıldı. Her kuyucuk ayrı tek kullanımlık steril pipet ucuyla pipetaj yapılarak hücre ve besi yerinin karışması sağlandı. Bu işlemlerin tamamı kabin içerisinde yapıldı. Ekim işlemi bittikten sonra kültür kapları 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde saklandı. Ayrıca ekim yapılmış olan her kuyucuk için bir adet 1,5 ml'lik standart ependorf tüpü gruplara göre belirlendi. Yirmi dört saat sonra inkübatörden çıkarılan kültür kaplarının kuyucukları pipet ve steril pipet uçları yardımı ile kendilerine ait olan ependorf tüplerine bırakıldı. Kuyucukların içerikleri alınırken kültür kabı ortalama 45 derecelik bir açıyla sabitlendi ve hücrelerin çökme durumuna karşı sıvı pipetaj yapılarak alındı ve etiketlenmiş tüplere bırakıldı. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra belirli açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj den sonra tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet ile atıldıktan sonra tüplere birer ml steril fosfat tamponlu tuzlu su ilave edildi. Tüplere fosfat tamponlu tuzlu su ilave edildikten sonra 3-5 saniye orta hızda vortekslenerek tekrar belirli açılı rotorda oda sıcaklığında 300 g'de 5 dk santrifüj yapıldı. Tüplerin içerisindeki supernatant mikropipet yardımıyla atıldıktan sonra tüplerin her birine 50 µl DPBS ilavesinden sonra düşük hızlı vorteks uygulandı ve karışmaya devam ederken içine -20°C'den çıkarılan 1 ml %70'lik etanol yavaşça ilave edildikten sonra tüplerin kapakları kapatılarak vortekslendi. Tüplerin hepsi bir spora yerleştirilerek -20°C'de bir gece bekletildi. Daha sonra dondurucudan alınan tüpler vortekslendikten sonra içlerinden 200'er µl işaretlenmiş yeni ependorf tüplerine bırakılarak kapakları kapatıldı ve belirli açılı rotorda 300 g'de 5 dk santrifüj uygulandı. Tüplerin üzerindeki supernatant mikropipet ile atıldıktan sonra tüplerin her birine 250 µl DPBS ilave edildi ve tüpler 3- 5 saniye vortekslendi, ve tüpler yeniden belirli açılı rotorda 300 g'de 5 dk santrifüj uygulandı, tüplerin içerisindeki supernatant mikropipet

ile atıldıktan sonra tüplerin hepsine 200 µl Muse hücre döngüsü kiti ilave edildi ve tüpler 3-5 saniye orta hızda vortexlendi. 30 dk oda sıcaklığında karanlık yerde bekletildi. Bu bekleme süresinde Muse Cell Analyzer aleti açıldı ve aletin standart sıvılar ile ön yıkama uygulanarak cihaz örnek analiz etmeye hazır duruma getirildi (Şekil 3.4). Otuzuncu dakikadan sonra tüpler tek tek aletin örnek bölmesine koyularak aletin hücre döngüsü ile ilgili sonuçları analiz etmesi sağlandı. Analiz işlemine kontrol grubundan başlandı ve birinci örnek analiz edilirken hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bölge cihazın ekranından belirlenerek analizin bu bölgeden yapılması sağlandı ve diğer örneklerin analizine devam edildi. Her grup bitiminde alete hızlı yıkama uygulandı. Tüm sonuçlar cihazın hafızasına kaydedildikten sonra taşınabilir disk yardımıyla alındı. 24 ve 48 saatlik periyotlar sonrasında aynı prosedür tekrarlandı ve sonuçlar alındı. İşlemlerin sonrasında Muse Cell Analyzer aleti gerekli yıkamalar uygulandıktan sonra kapatıldı.



Şekil 3.4. (A) Muse cihazı için kullanılan kit. (B) Muse cihazı.

3.11. İstatistiksel Analiz

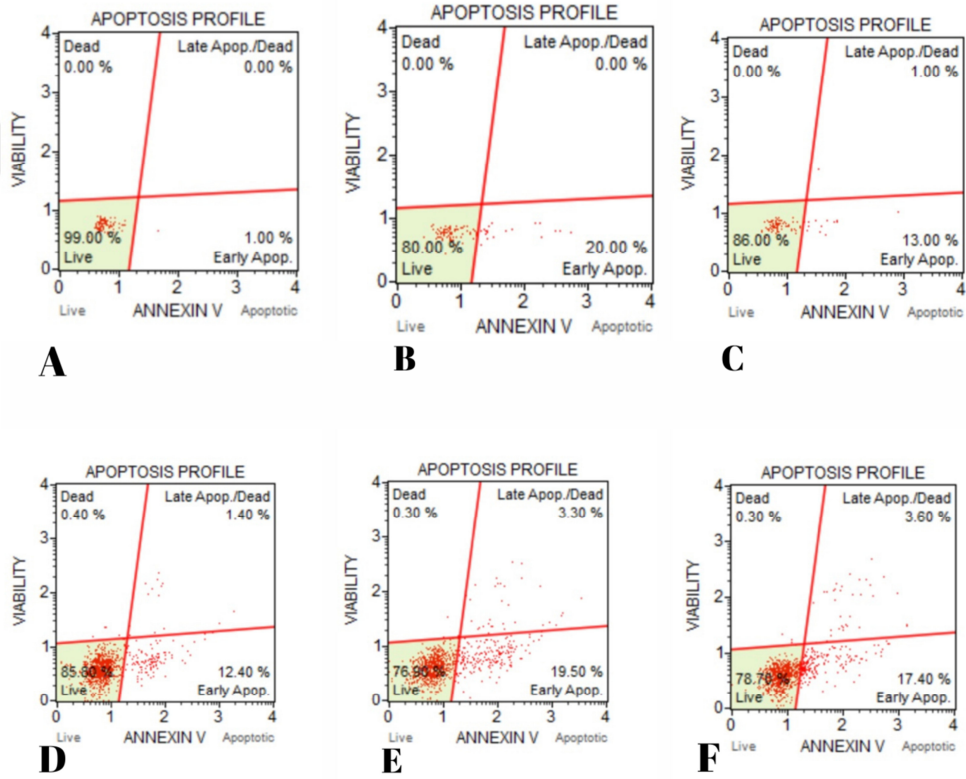
Çalışmadaki verilerin dağılımı ShapiroWilk's test istatistiği, histogram, q-q grafiği ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Varyans homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey kullanıldı. Her bir grup için, 24 saat ve 48 saat ölçümler arasındaki farklılıklar paired t testi uygulandı. Verilerin analizi TURCOSA (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) veri yazılımında analiz edildi. $P<0,05$ anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

4.1. Annexin V Bulguları

Bu test, MDA-MB-231 hücrelerinin 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu canlı, erken apoptik, geç apoptik ve toplam apoptotik yüzdelik oranlarını göstermektedir. MDA-MB-231 hücre hattına ait Annexin V bulguları Şekil 4.1. ve Tablo 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 de gösterildi.



Şekil 4.1. Annexin V test sonuçları (A) 24 saat kontrol. (B) 24 saat 1 mg/ml ginseng. (C) 24 saat 2 mg/ml ginseng. (D) 48 saat kontrol. (E) 48 saat 1mg/ml ginseng. (F) 48 saat 2 mg/ml ginseng.

Tablo 4. 1. Annexin V & Ölü hücre testinde 24 ve 48 saat sonunda erken apoptotik hücre sonuçları.

Gruplar	Erken Apoptotik Hücre 24 Saat	Erken Apoptotik Hücre 48 Saat	P*
Kontrol	1,00±0.30 ^a	12,40±1.60	0,004
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	20,00±5.10 ^b	19,50±2.80	0,743
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	13,00±2,30 ^b	17,40±4,20	0,362
P [#]	0,001	0,070	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol grubunda erken apoptotik hücre 24 ve 48 saat ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,004$), 1 mg/ml Ginseng ekstresi ve 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,050$) (Tablo 4.1.) .

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi ve 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının erken apoptotik hücre 24 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0,004$), 48 saat ölçümünde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,070$). Çoklu karşılaştırma testine göre erken apoptotik hücre 24 saat ölçümünde kontrol grubu, 2 mg/ml ginseng ekstresi grubu, ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,050$) (Tablo 4.1.).

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

^p Gruplar	Geç Apoptotik Hücre 24 Saat	Geç Apoptotik Hücre 48 Saat	P*
Kontrol	0,0±0,0a	1,40±0,40	0,026
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	0,0±0,0a	3,30±1,30	0,048
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	1,0±0,5b	3,60±0,90	0,085
P[#]	0,008	0,057	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol ve 1 mg/ml Ginseng ekstresi grubunda geç apoptotik hücre 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,004$), 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,050$) (Tablo 4.2.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının geç apoptotik hücre 24 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p=0,008$), 48 saat ölçümünde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,057$). Çoklu karşılaştırma testine göre geç apoptotik hücre 24 saat ölçümünde 2 mg/ml ginseng ekstresi grubu, Kontrol ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,050$) (Tablo 4.2.).

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

Gruplar	Toplam Apoptotik Hücre 24 Saat	Toplam Apoptotik Hücre 48 Saat	P*
Kontrol	1,0±0,10a	13,8±2,8a	0,015
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	20,0±5,0b	22,8±2,5b	0,548
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	14,0±1,20b	21,0±1,8b	0,002
P [#]	0,001	0,008	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol ve 2 mg/ml ginseng ekstresi grubunda toplam apoptotik hücre 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,050$), 1 mg/ml ginseng ekstresi grubunda anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,050$) (Tablo4.3.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının toplam apoptotik hücre 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,050$). Çoklu karşılaştırma testine göre toplam apoptotik hücre 24 ve 48 saat ölçümünde Kontrol grubu, 2 mg/ml ginseng ekstresi grubu ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,050$) (Tablo 4.3.).

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

Gruplar	Canlı Hücre 24 Saat	Canlı Hücre 48 Saat	P*
Kontrol	99,0±0,10a	85,8±2,6	0,012
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	80,0±4,0b	76,9±8,10	0,321
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	86,0±2,8b	78,7±9,4	0,195
P [#]	<0,001	0,354	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

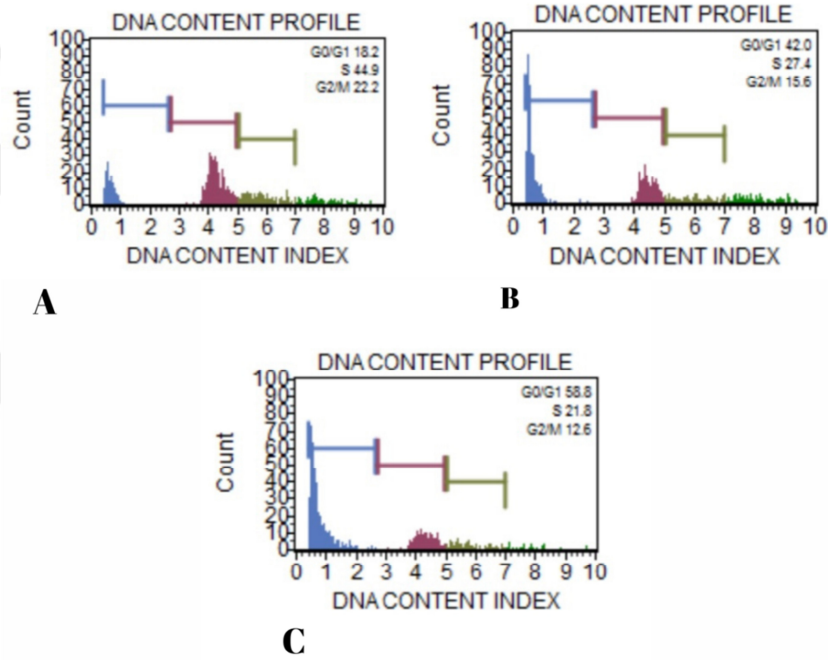
Kontrol grubunda canlı hücre 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,012$), 2 mg/ml ginseng ekstresi ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,050$) (Tablo4.4.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının canlı hücre 24 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,001$), 48 saat ölçümünde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,354$). Çoklu karşılaştırma

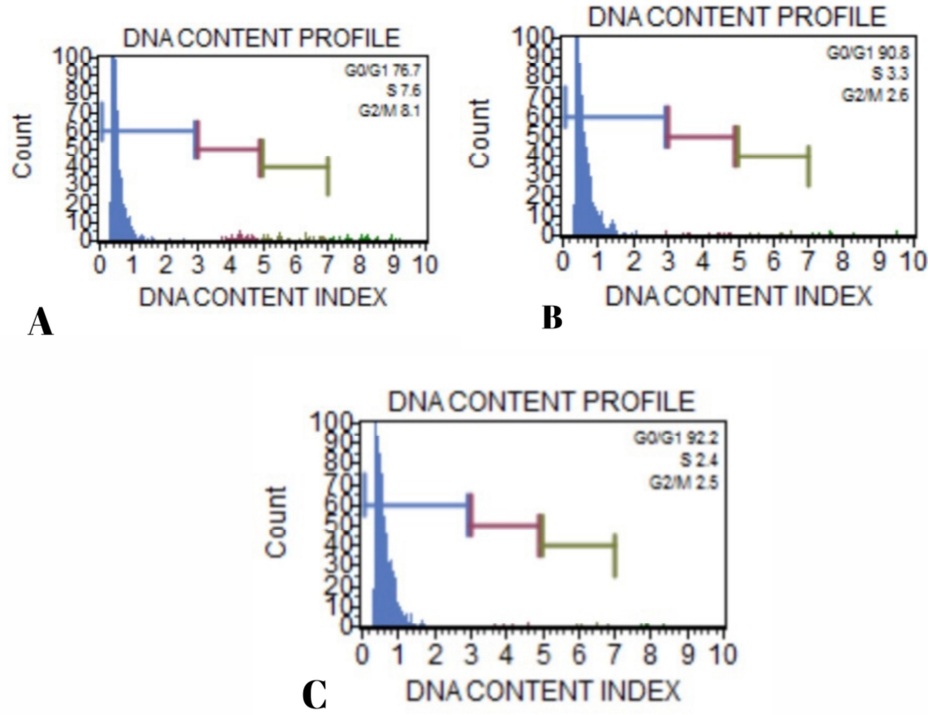
testine göre canlı hücre 24 saat ölçümünde Kontrol grubu 2 mg/ml ginseng ekstresi grubu ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,050$) (Tablo4.4).

4.2. Hücre Döngüsü Bulguları

Bu testle, MDA-MB-231 hücrelerinin 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu hücre döngüsü bulguları Şekil 4.2, 4.3 ve Tablo 4.5, 4.6, 4.7 de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2. Cell Cycle test sonuçları (A) 24 saat kontrol. (B) 24 saat 1 mg/ml doz. (C) 24 saat 2 mg/ml doz.



Şekil 4. 3. Cell Cycle test sonuçları (A) 48 saat kontrol. (B) 48 saat 1 mg/ml doz. (C) 48 saat 2 mg/ml.

Tablo 4. 5. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda G0/G1 evresindeki değişim sonuçları.

Gruplar	G0/G1 24 Saat	G0/G1 48 Saat	
Kontrol	18,27±0,70a	76,7±12,4	0,016
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	42,0±6,0b	90,8±3,50	0,001
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	58,8±1,40c	92,2±6,40	0,007
P [#]	<0,001	0,113	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol, 2 mg/ml ginseng ekstresi ve 1 mg/ml Ginseng ekstresi grubunda G0/G1 ölçümü 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,050) (Tablo 4.5.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının G0/G1 ölçümü 24 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken (p<0,001), 48 saat ölçümünde anlamlı fark bulunmadı (p=0,113). Çoklu karşılaştırma testine göre G0/G1 ölçümü 24 saat ölçümünde Kontrol grubu 2 mg/ml ginseng ekstresi

grubu ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,050$) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.6. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda S evresindeki değişim sonuçları.

Gruplar	S 24 Saat	S 48 Saat	P*
Kontrol	44,9±10,4	7,6±2,2a	0,036
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	27,4±5,2	3,3±1,2b	0,023
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	21,8±12,8	2,4±0,4b	0,113
P#	0,067	0,010	

p#; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol ve 1 mg/ml Ginseng ekstresi grubunda S ölçümünün 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,050$), 2 mg/ml ginseng ekstresi ve gruplarında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,050$) (Tablo 4.6.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının S ölçümünün 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunurken ($p<0,010$), 24 saat ölçümünde anlamlı fark bulunmadı ($p=0,067$). Çoklu karşılaştırma testine göre S ölçümü 48 saat ölçümünde kontrol grubu 2 mg/ml ginseng ekstresi grubu ve 1 mg/ml ginseng ekstresi gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,050$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.7. Hücre döngüsü testinde 24 ve 48 saat sonunda G2/M evresindeki değişim oranları.

Gruplar	G2/M 24 Saat	G2/M 48 Saat	P*
Kontrol	22,20±15,6a	8,10±0,2a	0,003
1 mg/ml Ginseng Ekstresi	15,6±4,4ab	2,60±1,30b	0,018
2 mg/ml Ginseng Ekstresi	12,6±2,3b	2,5±0,40b	0,012
P#	0,019	<0,001	

p[#]; Tekönlü varyan analizi, P*; Paired t testi, Çoklu karşılaştırma testine göre (Tukey) alfabetik üst simgelerin aynı harfi içermesi gruplar arasında farkın anlamlı olmadığını ifade eder iken farklı olan istatistiksel olarak anlamlılığı ifade eder. Veriler aritmetik ortalama ile birlikte standart sapma olarak ifade edildi.

Kontrol, 1 mg/ml Ginseng ekstresi ve 2 mg/ml ginseng ekstresi grubunda G2/M ölçümü 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,050) (Tablo 4.7.).

Kontrol, 1 mg/ml ginseng ekstresi, 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının G2/M ölçümü 24 ve 48 saat ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,050). Çoklu karşılaştırma testine göre G2/M ölçümü 24 saat ölçümünde kontrol grubu 2 mg/ml ginseng ekstresi grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,050). Çoklu karşılaştırma testine göre G2/M ölçümü 48 saatinde kontrol grubu 1 mg/ml ginseng ekstresi ve 2 mg/ml ginseng ekstresi gruplarının anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,05) (Tablo 4.7.).

5. TARTIŞMA

Kanser, insanlık için küresel bir tehdit haline gelmiştir. Kanser verilerine göre 2012 yılında 14,1 milyon civarında yeni kanser vakası ve 8,2 milyon civarında kanserden ölüm gerçekleşmiştir (Torre ve ark., 2015). Ayrıca, bu rakamlar artan nüfus ve çevre kirliliği ile artmıştır. Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesidir. Kanser, çoklu genler, hücre içi ortam ve komşu dokular arasındaki karmaşık etkileşimlerden kaynaklanır. Temel tümörjenez teorisi, sürecin, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör durdurucu genlerin baskılanması yoluyla normal bir hücre ile başladığını öne sürer. Dönüşümden sonra hücre anormal bir hücre gibi davranır, yani kanser hücresinin özelliklerini göstermeye başlar. Bu değişmiş hücreler, büyüme sinyalleri ile kendi kendine kontrolsüz bir şekilde çoğalma yetisi kazanır ve büyüme karşıtı sinyallere karşı duyarsızlaşır (Aggarwal ve ark., 2009). Amerikan ginsengi ve ginsenosid bileşenlerinin, etki mekanizması belirsiz kalmasına rağmen, kanser önleyici etkiler gösterdiği düşünülmektedir. Anti-kanser ajanlarının ana hedefi, kanser apoptozunu tetikleme yetenekleridir. Apoptoz ile ilişkili çeşitli mekanizmalar açıklanmıştır, ancak özellikle kanser hücrelerinde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Chiarugi, Magnelli ve Ruggiero, 1994). Kanserde önemli bir aşama, hücrelerin G0'dan itibaren hücre döngüsüne girme hareketidir (Nurse, Masui ve Hartwell, 1998; Szallasi ve Liang, 1998). GE' nin, onko genlerin aktivitesini inhibe eden Raf-1 kinaz inhibitör proteini ekspresyonunu artırarak meme kanseri hücre proliferasyonunu engellediğini göstermektedir. Bu yeni mekanizmanın meme kanserinin potansiyel tedavisinde etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (King ve Murphy, 2005). Ginseng 0,5 mg/ml' doz da uygulandığında MCF-7 hücre proliferasyonunda doza bağımlı önemli bir inhibisyon oluşturdu. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ginseng ile tedavisi, kontrole göre hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttı, hücre döngüsü G0/G1 fazında durduruldu (Corbit, Ebbs, King ve Murphy, 2006). Ginseng ve estradiol, apoptozu sağlayan genlerin RNA ekspresyonunu eşdeğer şekilde indükledi. Ginseng, östradiolün aksine, hücre proliferasyonunda 2,000 µg/ml doza bağlı bir azalmaya neden olmuştur. Ginseng'in hücre döngüsü üzerinde olumsuz bir etkisi yoktu, östradiol ise proliferatif fazı önemli ölçüde arttırdı ve dinlenme fazını.

Ginseng ve meme kanseri terapötik ajanlarının eşzamanlı kullanımı, değerlendirilen çoğu ilaç için hücre büyümesinin önemli ölçüde baskılanmasıyla sonuçlandı. Ginseng ve meme kanseri terapötiklerinin kullanımı, kanser hücresi büyümesini sinerjistik olarak inhibe etti (Duda ve ark., 1999). GE, meme kanseri hücrelerinin canlılığını azalttı ve MDA-MB-231 hücrelerinde GE tedavisi, 1 ve 2.5 mg/mL doz aralığında MCF-7 hücrelerinin ilgili geni ekspresyonunu hafifleterek hücre proliferasyonunu inhibe etti. Meme kanseri kök hücre benzeri özelliklerin tezahürünün GE tarafından bastırılmasına, Akt aracılı kendi kendini yenileme sinyalinin blokajı aracılık etti (Oh, Yoon, Jang, Kim ve Surh, 2019). Bu veriler, ginseng'in, sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin transkripsiyonel yukarı regülasyonu yoluyla meme kanseri hücre büyümesi üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir. Prostat hücreleri, 48 saat boyunca 250 μ M ginsenosid varlığında inkübasyondan sonra yapışma özelliğini kaybetti. Prostat spesifik antijen, androjen reseptörü ve 5 α -redüktaz dahil olmak üzere biyobelirteç genlerinin ekspresyonu ve çoğalan hücre nükleer antijeninin ekspresyonu baskılandı. Ginsenoside, klasik apoptotik morfolojiyi indükledi ve floresan mikroskobu ile gösterildiği gibi, prostat hücrelerinde apoptozla ilişkili genlerin, ekspresyonuna müdahale etti. Sonuç olarak prostat hücrelerini G1 fazında durdurduğunu ve ardından kaspaz-3 aracılı apoptoz mekanizması yoluyla hücre büyümesini inhibe ettiğini öne sürdük (Liu, Xu ve Che, 2000). Ginseng (Panax quinquefolius) hepatoselüler karsinom hücrelerinde 0,64 $\pm$ 0,02 mg/mL doza bağlı olarak tek başına uygulandığında (bağımsız olarak) hücre canlılığını azalttı (Popovich, Yeo ve Zhang, 2011). MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki ginseng (Panax quinquefolius) ekstresinin 0,5 mg/ml doz ile antiproliferatif aktivitelerine bakıldı. Buğulanmış ekstre, antiproliferatif aktiviteyi önemli ölçüde arttırdı ve canlı hücre sayısını önemli ölçüde azalttı. Hücre döngüsü tahlili, buğulanmış ekstre G fazındaki kanser hücrelerini tutukladığını gösterdi. Buğulanmış Amerikan Ginsengi kökünün, antiproliferatif aktiviteyi önemli ölçüde arttırdığı ve hücre döngüsü profilini etkilediği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2008). HCT116 insan kolon karsinomu hücrelerindeki proliferasyon, 1,0 mg/ml doz ile GE tarafından inhibe edildi. GE ile tedavi edilen agresif tip hücreler, hücre döngüsünün G0/G1 fazında durduruldu ve p53 ve p21 proteinlerinin ekspresyonu artarken kanser enzim seviyeleri azaldı. GE'nin anti-proliferatif ve proapoptotik etkilerinden ginsenosidlerin neden olduğu görünmektedir. Bu çalışma, p21'in, GE ile tedavi edilen HCT116 agresif tip hücrelerini durdurma işlevi görürken, p21 eksikliği olan hücreler, ginseng bileşenine bağlı bir şekilde hücre ölümüne maruz kalır (King ve Murphy,

2010). Diğer bir çalışma da *Panax ginseng* köklerinin bileşenleri tarafından insan renal hücreli karsinom hücrelerinin G1'den S fazına geçişte hücre döngüsü ilerlemesini bloke ederek inhibe edildiğini gösterilmiştir (Sohn ve ark., 1998). Lösemi hücrelerinde (K562) yapılan bir çalışmada, K562 hücrelerinin aşağıdaki deneylerinde 48 saat boyunca 400 mg/l ginseng polisakkariti uygulandı. G0/G1 fazının önemli ölçüde arttığı, hücre döngüsünün G2+M ve S fazlarının önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, ginseng polisakkaritinin K562 hücre çoğalmasını engelleyebileceğini ve G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurabileceği belirtilmiştir (Xiong ve ark., 2017). Farklı konsantrasyonlarda (0, 25, 50 ve 100 μ M) Rg5 (ginseng etken maddesi), meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin düzenlenmesi yoluyla G0/G1 fazında hücre döngüsü durmasını indüklediği bildirilmiştir (Kim ve Kim, 2015). GE tedavisi, 5 uM Rh2 varlığında konsantrasyona bağlı bir şekilde her MCF-7 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde inhibe etti ayrıca bu hücrelerinde GE ile hücre döngüsü durmasına, G1-S fazına özgü enzim aktivitelerinin inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Choi, Kim ve Singh, 2009).

Çalışmadaki sınırlılıklar: Literatürdeki birçok çalışmada Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresi elde edilirken içerisindeki biyoaktif maddeler izole edilerek kullanılmıştır. Çalışmamızda Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresinin elde edilmesinde, içerisindeki biyoaktif maddeleri izole edemediğimizden Ginseng (*Panax quinquefolius*)'in kök olarak bir bütün halinde ekstresi elde edilmiştir. Bu sebepten dolayı çalışmamızda kullanılan doz literatürdeki diğer çalışmalarla sınırlı ilişkilendirilmiştir.

Literatürdeki bu sonuçlar, yapılmış olan çalışmamızdaki MDA-MB-231 hücrelerinin Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresi ile inkübasyonu sonucu apoptoza götürmesi ve hücre döngüsünde G0/G1 fazında durdurduğunu gösterdiğimiz sonuçları desteklemektedir. Ancak daha fazla çalışma ile bu sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmamızda Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresi 1 mg/ml ve 2 mg/ml dozlar ile ve 24, 48 saat olarak iki zaman üzerinde sonuçlar alındı, meme kanseri hücrelerini öldüren ve apoptoza götüren etkin dozun 24 ve 48 saat için 1mg/ml olduğu, ayrıca G0/G1 fazında durduran grubunda 48 saat için, 1mg/ml olan grup olduğu görüldü. Diğer çalışmalar ile ortak noktalarının olması, literatürde henüz tam olarak netliğe kavuşmamış Ginseng (*Panax quinquefolius*) bitkisinin meme kanseri hücrelerini erken apoptoza götürebileceği ve toplam apoptozu artırabileceği görülmüştür. Bununla birlikte Ginseng (*Panax quinquefolius*) ekstresi meme kanseri hücrelerini G0/G1 fazında durduran, 48 saat, 1mg/ml olan gruptur ayrıca hem 24 hemde 48 saat gruplarında S ve G2/M fazlarında yükseliş görülmemesinin nedeni hücrelerin döngüsünün beklendiği gibi S fazından önceki G0/G1 de durmuş olmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Bu durum kanser hücresinin proliferasyonunu durdurabileceğini göstermektedir. Ancak çalışılan Annexin V ve Hücre Döngüsü testlerinde net olarak etkinliğin belirlenmesi için daha fazla kanıt ve çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu çalışmaların sayısı artırılarak ve in vivo çalışmalarında ilave olarak yapılması ile Ginseng (*Panax quinquefolius*) bitkisinin gıda takviyesi (supplament) olarak kullanımı ile ilgili literatürde daha fazla veri oluşturulabilir. Yaptığımız mevcut çalışma yeni yapılacak olan çalışmalara ışık tutabilir.

7. KAYNAKLAR

- Aggarwal, B. B., Van Kuiken, M. E., Iyer, L. H., Harikumar, K. B., & Sung, B. (2009). Molecular targets of nutraceuticals derived from dietary spices: potential role in suppression of inflammation and tumorigenesis. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 234(8)825–849.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Isolating cells and growing them in culture. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- Baeg, I. H., & So, S. H. (2013). The world ginseng market and the ginseng (Korea). *Journal of ginseng research*, 37(1), 1–7.
- Bian, X., Yang, Z., Feng, H., Sun, H., & Liu, Y. (2017). A Combination of Species Identification and STR Profiling Identifies Cross-contaminated Cells from 482 Human Tumor Cell Lines. *Scientific reports*, 7(1), 9774.
- Bing Han, Chengwei He. (2021) Targeting autophagy using saponins as a therapeutic and preventive strategy against human diseases. *Pharmacological Research* 166, pages 105428.
- Bray G. A. (2002). The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *The Journal of nutrition*, 132(11 Suppl), 3451S–3455S.
- Cardenosa, G., & Eklund, G. W. (1991). Benign papillary neoplasms of the breast: mammographic findings. *Radiology*, 181(3), 751–755.
- Carpenter, S. G., & Cottam, G. (1982). Growth and reproduction of American ginseng (*Panax quinquefolius*) in Wisconsin, USA. *Canadian Journal of Botany*, 60(12), 2692–2696.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., & Itano, N. (2014). Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers*, 6(3), 1670–1690.
- Chen, H., Fu, J., Chen, H., Hu, Y., Soroka, D. N., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., Yan, F., Major, M. B., Chen, X., & Sang, S. (2014). Ginger compound [6]-shogaol and its cysteine-conjugated metabolite (M2) activate Nrf2 in colon epithelial cells in vitro and in vivo. *Chemical research in toxicology*, 27(9), 1575–1585.
- Chiarugi, V., Magnelli, L., & Ruggiero, M. (1994). Apoptosis, senescence, immortalization and cancer. *Pharmacological research*, 30(4), 301–315.
- Choi, S., Kim, T. W., & Singh, S. V. (2009). Ginsenoside Rh2-mediated G1 phase cell cycle arrest in human breast cancer cells is caused by p15 Ink4B and p27 Kip1-dependent inhibition of cyclin-dependent kinases. *Pharmaceutical research*, 26(10), 2280–2288.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.-W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., & Stokes, W. (2005).

- Guidance on Good Cell Culture Practice: A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33(3), 261–287.
- Cooper GM. Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM (ed) Chapter 14. Washington: ASM Press 1994; 592: 6.
- Corbit, R., Ebbs, S., King, M. L., & Murphy, L. L. (2006). The influence of lead and arsenite on the inhibition of human breast cancer MCF-7 cell proliferation by American ginseng root (*Panax quinquefolius* L.). *Life Sciences*, 78(12), 1336–1340.
- Çetin R, Demirci.(1995). Memeinin malign hastalıkları, derleme, 3:1-8.
- Din, F. V., Valanciute, A., Houde, V. P., Zibrova, D., Green, K. A., Sakamoto, K., Alessi, D. R., & Dunlop, M. G. (2012). Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 142(7), 1504–15.e3.
- Duda, R. B., Zhong, Y., Navas, V., Li, M. Z., Toy, B. R., & Alavarez, J. G. (1999). American ginseng and breast cancer therapeutic agents synergistically inhibit MCF-7 breast cancer cell growth. *Journal of surgical oncology*, 72(4), 230–239.
- Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., & Salehiniya, H. (2016). Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 17(sup3), 43–46.
- Hong, H., Baatar, D., & Hwang, S. G. (2021). Anticancer Activities of Ginsenosides, the Main Active Components of Ginseng. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2021, 8858006.
- Kasnak, C., & Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226–234
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5.
- Kim, J. W., Han, S. W., Cho, J. Y., Chung, I. J., Kim, J. G., Lee, K. H., Park, K. U., Baek, S. K., Oh, S. C., Lee, M. A., Oh, D., Shim, B., Ahn, J. B., Shin, D., Lee, J. W., & Kim, Y. H. (2020). Korean red ginseng for cancer-related fatigue in colorectal cancer patients with chemotherapy: A randomised phase III trial. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 130, 51–62.
- Kim, S. J., & Kim, A. K. (2015). Anti-breast cancer activity of Fine Black ginseng (*Panax ginseng* Meyer) and ginsenoside Rg5. *Journal of ginseng research*, 39(2), 125–134.
- Kim, T. H., Kim, J. Y., Bae, J., Kim, Y. M., Won, M. H., Ha, K. S., Kwon, Y. G., & Kim, Y. M. (2021). Korean Red ginseng prevents endothelial senescence by downregulating the HO-1/NF- κ B/miRNA-155-5p/eNOS pathway. *Journal of ginseng research*, 45(2), 344–353.
- King, M. L., & Murphy, L. L. (2005). American ginseng extract alters Raf-MEK-ERK cell signaling and inhibits proliferation of MCF-7 cells.
- King, M. L., & Murphy, L. L. (2010). Role of cyclin inhibitor protein p21 in the inhibition of HCT116 human colon cancer cell proliferation by American

- ginseng (*Panax quinquefolius*) and its constituents. *Phytomedicine*, 17(3-4), 261-268.
- Kumar, S., & Weaver, V. M. (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 113–127.
- Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C. (2015) Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th Edition, Elsevier, Philadelphia.
- Lee, G., Nguyen, T., Lim, T. Y., Lim, J., Park, B., Lee, S., Mok, I. K., Pal, K., Lim, S., & Kim, D. (2020). Fermented Wild Ginseng by *Rhizopus oligosporus* Improved l-Carnitine and Ginsenoside Contents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(9), 2111.
- Lee, I. S., Kang, K. S., & Kim, S. Y. (2019). *Panax ginseng* Pharmacopuncture: Current Status of the Research and Future Challenges. *Biomolecules*, 10(1), 33.
- Lee, N. A., Rusinek, H., Weinreb, J., Chandra, R., Toth, H., Singer, C., & Newstead, G. (1997). Fatty and fibroglandular tissue volumes in the breasts of women 20-83 years old: comparison of X-ray mammography and computer-assisted MR imaging. *AJR. American journal of roentgenology*, 168(2), 501–506.
- Liu, W. K., Xu, S. X., & Che, C. T. (2000). Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life sciences*, 67(11), 1297-1306.
- Masters J. R. (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(3), 233–236.
- Masters J. R. (2002). False cell lines: The problem and a solution. *Cytotechnology*, 39(2), 69–74.
- Masters J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews. Cancer*, 2(4), 315–319.
- Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 11, 151–164.
- Nag, S. A., Qin, J. J., Wang, W., Wang, M. H., Wang, H., & Zhang, R. (2012). Ginsenosides as Anticancer Agents: In vitro and in vivo Activities, Structure-Activity Relationships, and Molecular Mechanisms of Action. *Frontiers in pharmacology*, 3, 25.
- Nakhjavani, M., Smith, E., Palethorpe, H. M., Tomita, Y., Yeo, K., Price, T. J., Townsend, A. R., & Hardingham, J. E. (2021). Anti-Cancer Effects of an Optimised Combination of Ginsenoside Rg3 Epimers on Triple Negative Breast Cancer Models. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(7), 633.
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1), 49–61.
- Nurse, P., Masui, Y., & Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Nature medicine*, 4(10), 1103-1106.
- Oh, J., Yoon, HJ., Jang, JH., Kim, DH., and Surh, YJ., (2019). Standardized Korean Ginseng extract in vein ginsenoside Rg3, modulation of self-healing without manifestation of stem cell properties from breast cancer. *Journal of Ginseng magazine*, 43 (3), 421–430.

- Polczinski, L. C. (1982). Ginseng (*Panax quinquefolius* L.) culture in Marathon County, Wisconsin: Historical growth, distribution, and soils inventory (Doctoral dissertation, University of Wisconsin-Stevens Point, College of Natural Resources).
- Polyak K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3155–3163.
- Popovich, D. G., Yeo, S. Y., & Zhang, W. (2011). Ginseng (*Panax quinquefolius*) and Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root extract combinations increase hepatocarcinoma cell (Hep-G2) viability. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 64.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (50), e2597.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology*. Oxford University Press.
- Schairer, C., Lubin, J., Troisi, R., Sturgeon, S., Brinton, L., & Hoover, R. (2000). Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA*, 283(4), 485–491.
- Shin, B. K., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2015). Chemical diversity of ginseng saponins from *Panax ginseng*. *Journal of ginseng research*, 39(4), 287–298.
- Sohn, J., Lee, C. H., Chung, D. J., Park, S. H., Kim, I., & Hwang, W. I. (1998). Effect of petroleum ether extract of *Panax ginseng* roots on proliferation and cell cycle progression of human renal cell carcinoma cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 30(1), 47-51.
- Stacey, G., & MacDonald, C. (2001). Immortalisation of primary cells. *Cell biology and toxicology*, 17(4-5), 231–246.
- Szallasi, Z., & Liang, S. (1998, January). Modeling the normal and neoplastic cell cycle with ‘realistic Boolean genetic networks’: Their application for understanding carcinogenesis and assessing therapeutic strategies. In Pacific Symposium on Biocomputing (Vol. 3, pp. 66-76). Hawaii: World Scientific.
- Topuz, Erkan ve ark. (1997), *Meme Kanseri. Biyoloji Tanı, Evreleme, Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2:12-17.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87–108.
- Tuncel, E. (1998), *Klinik Radyoloji*, Güne & Nobel Tıp Kitabevleri, 29-47.
- Vanden Berghe W. (2012). Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological research*, 65(6), 565–576.
- Wang, C. Z., Aung, H. H., Zhang, B., Sun, S., Li, X. L., He, H., ... & Yuan, C. S. (2008). Chemopreventive effects of heat-processed *Panax quinquefolius* root on human breast cancer cells. *Anticancer research*, 28(5A), 2545-2551.

- Xiong, W., Li, J., Jiang, R., Li, D., Liu, Z., & Chen, D. (2017). Research on the effect of ginseng polysaccharide on apoptosis and cell cycle of human leukemia cell line K562 and its molecular mechanisms. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(3), 924-934.
- Yıldız, E. A (2012) Kanser ve Beslenme. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimler Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara Baysal, A., Aksoy, M., Besler, H. T., Bozkurt, N., Keçecioğlu, S., Merdol, T. K., ... & Yıldız, E. (2013). Diyet El Kitabı. 7. baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.
- Yıldız, Ö ve Demir, G. (2004) *Kanser ve Beslenme. Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme Sempozyum Dizisi* 41, 45-57.
- Yu, H., Zhao, J., You, J., Li, J., Ma, H., & Chen, X. (2019). Factors influencing cultivated ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) bioactive compounds. *PloS one*, 14(10), e0223763.
- Yujin Jin, Diem Thi Ngoc Huynh, Thuy Le Lam Nguyen, Hyesu Jeon, Kyung-Sun Heo. (2020) Therapeutic effects of ginsenosides on breast cancer growth and metastasis. *Archives of Pharmacal Research* 43:8, pages 773-787.
- Zeng, L., Li, W., & Chen, C. S. (2020). Breast cancer animal models and applications. *Zoological research*, 41(5), 477–494.

GİNSENG (PANAX QUINQUEFOLIUS) EKSTRESİNİN MDA-MB-231 HÜCRE HATTI ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNAL LİK RAPORU

% 22	% 22	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr	%12
2	evrimagaci.org	%2
3	istanbulsaglik.gov.tr	%1
4	www.hurriyet.com.tr	%1
5	www.fusabil.org	%1
6	cocukservisi.blogspot.com	%1
7	www.acarindex.com	%1
8	www.erdis.org	%1
9	www.yeditepehastanesi.com.tr	<%1