

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KENEVİR TOHUMU YAĞININ ESANSİYEL YAĞ ASİTLERİNİN
BELİRLENMESİ VE AKCİĞER KANSER HÜCRESİ ÜZERİNDE *İN VİTRO*
OLARAK ANTİKANSEROJENİK ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI



YÜKSEK LİSANS

ZEYNEP YAMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi SONGÜL AYDEMİR

HAZİRAN 2022

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KENEVİR TOHUMU YAĞININ ESANSİYEL YAĞ ASİTLERİNİN
BELİRLENMESİ VE AKCİĞER KANSER HÜCRESİ ÜZERİNDE *İN VİTRO*
OLARAK ANTİKANSEROJENİK ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS

ZEYNEP YAMAN
36193611023

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi SONGÜL AYDEMİR

HAZİRAN 2022

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgmeden beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Songül AYDEMİR'e,

Deney aşamalarında laboratuvarlarının tüm imkanlarını bana sunarak çalışmamda katkıda bulunan ve çalışmamda bana yarar sağlayacak fikirlerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Emine ŞALVA ve Prof. Dr. Selim ERDOĞAN hocalarıma,

Tezin uygulama aşamasında FYL-2021-2546 nolu projeye vermiş oldukları maddi ve manevi desteklerden dolayı İnönü Üniversitesi BAP birimine,

Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi bu çalışmam süresince de benden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen başta annem Sevgül YAMAN ve babam Yunus YAMAN olmak üzere 3 kız kardeşime ve biricik dedeme,

teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Kenevir Tohumu Yağının Esansiyel Yağ Asitlerinin Belirlenmesi ve Akciğer Kanseri Hücreleri Üzerine *In Vitro* Olarak Antikanserojenik Özelliğinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığıma bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Zeynep YAMAN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kenevir (<i>Cannabis</i>)	4
2.1.1 Kenevir bitkisinin gövdesi.....	6
2.1.2 Kenevir bitkisinin kökü	7
2.1.3 Kenevir tohumu (<i>cannabis seminibus</i>).....	7
2.1.3.1 Kenevir tohumu proteini.....	9
2.1.3.2 Kenevir tohumu yağı (<i>Cannabis semen oleum</i>)	10
2.2 Kanser	11
2.2.1 Hücre siklusu (döngüsü).....	12
2.2.2 Apoptoz	14
2.2.3 Anjiyogenez.....	16
2.2.4 Metastaz.....	17
2.2.5 Kanser tedavi yöntemler	18
2.2.6 Kanser oluşum nedenleri	19
2.2.7 Kanser epidemiyolojisi	20
2.3 Akciğer Kanseri	20
2.3.1 Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)	21
2.3.2 Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK).....	21
2.3.3 Akciğer kanserinin epidemiyolojisi.....	22
3. MATERYAL-METOT.....	23
3.1 Kullanılan Materyaller.....	23
3.1.1 Aletler ve cihazlar.....	23
3.1.2 Kimyasal maddeler	24
3.1.3 Hücre hatları	24
3.1.4 Besiyerler ve solüsyonları	25
3.2 Metotlar.....	26
3.2.1 Hücre kültürü çalışmaları	26
3.2.2 Hücre proliferasyon analizi	28
3.3 <i>In Vitro</i> Çalışmada Kullanılan Testler	31
3.3.1 MTS testi	31
3.3.2 Flow sitometri (akan ölçer) ile apoptozis yöntemi	31
3.4 İstatistiksel Değerlendirme	32
3.5 Kenevir Tohumu Yağın Yağ Asitlerinin Belirlenmesi	33
4. BULGULAR	37
4.1 Hücre Proliferasyon Bulguları	37
4.1.1 A549 hücre proliferasyonundaki değişimler	37
4.1.2 BEAS-2B hücre proliferasyonundaki değişimler	40
4.2 Flow Sitometri (Akan Ölçer) ile Apoptozis Bulguları	43
4.3 Kenevir Tohumu Yağının Esansiyel Yağ Asitleri Bulguları	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49

KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	68



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1: Kenevir tohumunun (<i>cannabis seminibus</i>) besin içeriği (%).....	9
Çizelge 3. 1: Çalışmada kullanılan ekipmanlar.....	23
Çizelge 3. 2: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	24
Çizelge 3. 3: Hücre kültüründe kullanılan hücre hatları	25
Çizelge 3. 4: 100 mg/ml konsantrasyonun hazırlanması için kullanılan değerler	26
Çizelge 3. 5: μ -Plate 96 Well Black plakların da, A594 hücre hatları üzerinde kullanılan konsantrasyonlar	29
Çizelge 3. 6: μ -Plate 96 Well Black plakların da, BAES-2B hücre hattı üzerinde kullanılan konsantrasyonlar	30
Çizelge 3. 7: Gaz Kromatografi sisteminin çalışma koşulları.....	34
Çizelge 3. 8: GC-2010 Plus Enstrümental sistemin sıcaklık programları.....	34
Çizelge 3. 9: ‘Supelco Fame mix 37’ standart karışımında bulunan yağ asitleri, alıkonma zamanları ve miktarları	36
Çizelge 4. 1: Kenevir yağı örneğimizdeki yağ asitleri, alıkonma zamanları ve miktarları.	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Kenevir bitkisinin ait türler.....	5
Şekil 2. 2: Kenevir bitkisinin gövde (sap) kısmı ve lifli yapısı.....	6
Şekil 2. 3: (A) az su ve yumuşak toprakta yetişen kök. (B) çok su ve sert toprakta yetişen kök. (C) hafif yapılı toprakta yetişen kök.....	7
Şekil 2. 4: Kenevir tohumu (<i>cannabis seminibus</i>)	8
Şekil 2. 5: Kenevir tohumu yağı	10
Şekil 2. 6: Hücre döngüsü fazları.....	13
Şekil 2. 7: (A) Mutasyon sonucu normal hücrelerin izlediği yol. (B) Mutasyon sonucu kanserli hücrelerin izlediği yol	15
Şekil 2. 8: Metastaz oluşum mekanizması	18
Şekil 3. 1: Soğuk pres yöntemiyle elde edilen kenevir tohumu yağı.....	25
Şekil 3. 2: ‘Supelco Fame mix 37’ standart karışımı için elde edilen GC-FID kromatogramı	35
Şekil 4. 1: Normal kontrol (A), pozitif kontrol (B), 1 mg/ml (C), 5 mg/ml (D), 10 mg/ml (E), 25 mg/ml (F), 50 mg/ml (G) plaklarının inverted mikroskopunda görünümü.....	38
Şekil 4. 2: Kenevir tohumu yağı ekstresinin A549 hücrelerin proliferasyon etkisi (% büyüme inhibisyonu).....	39
Şekil 4. 3: A549 hücre hattına uygulanan konsantrasyonların kontrol grubuna bakılarak student t testine göre anlamlılık istatistiği (* $p<0.05$, ** $p<0,001$ olarak kabul edilmektedir).....	40
Şekil 4. 4: Kenevir tohumu yağı ekstresinin BEAS-2B hücrelerin proliferasyon etkisi (% büyüme inhibisyonu).....	41
Şekil 4. 5: BEAS-2B hücre hattına uygulanan konsantrasyonların kontrol grubuna bakılarak student t testine göre anlamlılık istatistiği (* $p<0.05$ ve ** $p<0,001$ olarak kabul edilmektedir.).....	42
Şekil 4. 6: A549 hücre hattı için denen tedavi konsantrasyonlarının apoptozun yüzdelik sonucu.....	43
Şekil 4. 7: Annexin V-FITC/PI boyaları ile boyanma şekline göre akan ölçek değerlendirilmesi.	44
Şekil 4. 8: Kenevir tohumu yağı ile muamele edilmiş A549 hücre hattın akan ölçek grafiği	45
Şekil 4. 9: Kenevir yağı örneğimizdeki yağ asitlerine ait GC-FID kromatogramı	46
Şekil 4. 10: Analiz edilen yağ asitlerinin kenevir tohumu yağında içerik yüzdeleri	48

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

AIDS	: Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ALA	: α -Linolenik Asit
A549	: Akciğer Kanseri hücresi
BEAS-2B	: Sağlıklı İnsan Hücresi
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
CBD	: Kannabidiol
CB1/2	: Kannabinoid Reseptörlerine
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfosit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FA	: Yağ Asitleri
FBS	: Fetal Bovin Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
EFA	: Esansiyel Yağ Asitleri
GLA	: Gama-Linolenik Asit
GLOBOCAN	: Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı
Gr	: Gram
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
LA	: Linoleik asit
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
Mg	: Miligram
ml	: Millitre
MS	: Multipl Skleroz
PBS	: Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
p53	: Tümör Protein 53
Rb	: Retinoblastom
SDA	: Stearidonik Asit
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
ω	: Omega
TAG	: Triaçilgliserit
THC	: Tetrahidrokannabinol
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KENEVİR TOHUMU YAĞININ ESANSİYEL YAĞ ASİTLERİNİN BELİRLENMESİ VE AKCİĞER KANSER HÜCRESİ ÜZERİNDE *İN VİTRO* OLARAK ANTİKANSEROJENİK ÖZELLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ZEYNEP YAMAN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

68+ XI sayfa

2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Songül AYDEMİR

Kenevir (*Cannabis*), ana vatanı Orta Asya olarak bilinen ilk kültüre edilmiş bitkidir. Bitkinin tüm kısımları kullanım kolaylığı sağladığından endüstriyel bir bitki olarak tanınmaktadır. Kenevirin meyvesi olarak bilinen tohum kısmı ise “süper gıda” olarak kabul edilir. İçerisinde yüksek oranda yağ (% 35,5), karbonhidrat (% 27,6) ve protein (% 24,8) bulunmaktadır. Oranı % 35,5 olan yağlar çoğunlukla presleme yöntemiyle elde edilmektedir. Kenevir tohumu yağı içeriğinde yağ asitler (FA), esansiyel amino asitlerce zengin proteinler, karbonhidratlar, vitaminler (E, C, B1, B2, B3, B6) ve mineraller (P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn) bulunmaktadır. Kenevir tohumu yağı, esansiyel yağ asitleri ve amino asit içeriği bakımından çok değerlidir. Tohum yağındaki esansiyel yağ asitlerinden (EFA) ise çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinen linoleik asit (omega (ω) 3) ve α -linolenik asit (omega (ω) 6) ideal oranda (3:1) bulunmaktadır. Kenevir tohumu yağı içeriğindeki yağ asidi sayesinde, çeşitli metabolik hastalığın (kanser, nörolojik bozukluk, göz fonksiyonları, kardiyoloji vb.) tedavisi için olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada, kenevir tohumundan soğuk presleme yöntemiyle kenevir tohumu yağı eldesi yapılmıştır. Elde edilen saf yağ, 10 ml n-hekzan ve 0.5 ml 2 N metanol içeren KOH çözeltisi ile muamele edilerek elde ettiğimiz metil ester türevli yağın GC-kromatogramı ile içeriğindeki esansiyel yağ asitleri tespit edilmiştir. Elimizde bulunan kenevir tohumu yağı örneğinin sonucunu “Supelco Fame mix 37” standardında belirtilen referans noktali karşılaştırıldığında 19 adet yağ asidi belirlenmiştir. Analizde elde edilen sonuçlarda ise en yüksek yağ asitleri oranları sırasıyla; linoleik asit (LA) % 55,70, α -linolenik asit (ALA) % 18,19, oleik asit % 14,12, palmitik asit % 6,49 ve stearik asit % 2,79 olmuş diğer yağ asitler ise % 0,75’in altında kalmıştır. Bu yağ asitlerden LA ve ALA’nın hücre büyümesini düzenlediği, lipid peroksidasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptoza sürüklenme gibi antikanser etkileri olduğu ve oleik asidin ise kanser insidansını azaltmasıyla bilinmektedir.

Ayrıca çalışmada, kenevir tohumu yağının akciğer kanser hücresi (A549) ve sağlıklı akciğer hücresi (BEAS-2B) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. A549 ve BEAS-2B hücreleri kültür şişelerinde besiyer ortamında uygun yoğunluğa gelene kadar inkübatörde bekletildi. Kültür şişesindeki hücreler uygun yoğunluğuna ulaştıktan sonra 96 kuyucuklu plaklarda farklı yağ konsantrasyonlarına (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) maruz bırakılarak sonuçlar incelenmiştir. Plak okuyucuda okunan plaklar kontrol grupları ile karşılaştırmaları yapıldığında A549 ve BEAS-2B hücrelerinin proliferasyonunda ciddi bir düşüş görülmüştür. Bu düşüş anlamlı bir düşüş olduğunu belirlemek için yapılan istatistik testi sonucunda A549 hücrelerine uygulanan tüm konsantrasyonlarda $p < 0,05$ olduğu saptanmış ve anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca hücre proliferasyonundaki düşüşün apoptoz inüklenmesini analiz etmek için ise Flow sitometri (akan ölçer) yönteminde A549 hücre hattına 10 mg/ml ve 25 mg/ml yağ konsantrasyonu uygulandı ve hücre canlılığın oranının en düşük olduğu konsantrasyon 25 mg/ml (% 60,65) olmuştur. Analiz sonucunda akan sitometrik grafiği sonuçlarına bakıldığında kenevir tohumu yağı kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak kenevir tohumu yağının içeriğinde 19 esansiyel yağ asidi içeriği belirlenmiş ve kenevir tohumu yağının, akciğer kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunu düşürdüğü ve hücre hatlarını apoptoza sürüklediği yani antikanserojenik etki yaptığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kenevir tohumu yağı, Esansiyel yağ asitleri, Akciğer kanseri, Antikanser

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF ESSENTIAL FATTY ACIDS OF HEMP SEED OIL AND INVESTIGATION OF ITS ANTICARCINOGENIC PROPERTY ON LUNG CANCER CELL *IN VITRO*

ZEYNEP YAMAN

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of biology

68+XI sayfa

2022

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Songül AYDEMİR

Hemp (*Cannabis*) is the first cultivated plant, the homeland of which is known as Central Asia. It is recognized as an industrial plant, as all parts of the plant provide ease of use. The seed part, known as the fruit of hemp, is considered a “superfood”. It has a high content of fats (35.5%), carbohydrates (27.6%) and proteins (24.8%). Oils with a ratio of 35.5% are most often obtained by pressing. The content of hemp seed oil includes fatty acids (FA), proteins rich in essential amino acids, carbohydrates, vitamins (E, C, B1, B2, B3, B6) and minerals (P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn). Hemp seed oil is very valuable for its content of essential fatty acids and amino acids. Seed oil, essential fatty acids (EFA) are known as polyunsaturated fatty acids, linoleic acid (omega (ω) 3) and α -linolenic acid (omega (ω) 6) the ratio (3:1) are there. Thanks to the fatty acid contained in hemp seed oil, it is possible to treat various metabolic diseases (cancer, neurological disorder, eye functions, cardiology, etc.) provides facilities for treatment.

In this study, hemp seed oil was obtained from hemp seed by cold pressing method. The obtained pure oil was treated with 10 ml of n-hexane and 0.5 ml of 2 N methanol-containing KOH solution, and the essential fatty acids in its content were determined by GC-chromatogram of the methyl ester-derived oil we obtained. As a result of the hemp seed oil sample we have, 19 fatty acids have been determined compared to the reference points specified in the “Supelco Fame mix 37” standard. In the results obtained in the analysis, the highest ratios of fatty acids, respectively; linoleic acid (LA) was 55.70%, α -linolenic acid (ALA) was 18.19%, oleic acid was 14.12%, palmitic acid was 6.49% and stearic acid was 2.79%, while other fatty acids remained below 0.75%. Of these fatty acids, LA and ALA are known to regulate cell growth, have anticancer effects such as lipid peroxidation, cell proliferation, and drift to apoptosis, and oleic acid is known to reduce the incidence of cancer.

In addition, the effect of hemp seed oil on lung cancer cells (A549) and healthy lung cells (BEAS-2B) was investigated in the study. A549 and BEAS-2B cells were kept in culture bottles in the incubator until they reached the appropriate density in the medium. After the cells in the culture bottle reached their proper density, the results were examined

by exposing them to different oil concentrations (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) in 96-well plates. A significant decrease in the proliferation of A549 and BEAS-2B cells was observed when the plaques read in the plaque reader were compared with the control groups. As a result of the statistical test conducted to determine that there was a significant decrease in this value, it was found that $p < 0.05$ was found at all concentrations applied to A549 cells and was considered significant. The decrease in cell proliferation, apoptosis inuklenme also for analyzing flow cytometry (flow meter) cell line A549 in the method 10 mg/mL and 25 mg/mL to the concentration of oil was applied, and the cell viability ratio is the lowest concentration of 25 mg/ml (% 60,65) has been. As a result of the analysis, when looking at the results of the flow cytometric graph, it was found that hemp seed oil leads cancer cells to apoptosis. Based on these results, the content of 19 essential fatty acids in the hemp seed oil was determined and it was found that hemp seed oil reduces the cell proliferation of lung cancer cells and causes cell lines to apoptosis, that is, has an anticarcinogenic effect.

Keywords: Hemp seed oil, Essential fatty acids, Lung cancer, Anticancer

1. GİRİŞ

Kenevir (*Cannabis*) ilk kültüre edilmiş bitkilerden biri olarak bilinmektedir. Ekimi ve kullanımı uzun yıllara dayandığından tam olarak kökeni belirlenememiştir. Ancak filogenetik ve arkeobotanik çalışmalar sonucunda elde edilen eski DNA (deoksiribo nükleik asit) dizilimleri ve günümüzdeki modern DNA dizilimleri karşılaştırıldığında kökeni Orta Asya ve Hindistan'da M.Ö. 850 yılına kadar dayandığı kabul edilmektedir. Kenevir, tıbbi tedavi, lif, kağıt, dini ritüeller, ilaç gibi kullanım alanları olan endüstriyel bir bitkidir. Bu bitki biyoaktif metabolitler olan kannabinoidler, terpenler ve flavonoidler adında fazlaca kimyasal bileşikler içermektedir. Kimyasal içeriğinde psikoaktif maddeler bulunmasından dolayı yetiştiriciliği denetim altındadır (Amaducci et al., 2015; Başer & Bozoğlu, 2020; Farinon et al., 2020).

Kenevir bitkisi psikoaktif maddeler içerse de, 400'den fazla kimyasal yapısı ve 19.yy sonlarında belirlenilen farmakolojik özelliği sayesinde araştırmacılar arasındaki ilgisini korumaktadır. Farmakolojik özelliği için yapılan çalışmalar çoğunlukla bitkinin yaprak, çiçek ve tohumlarından elde edilen bir kimyasal olan kannabinoidler dikkate alınmış olsa da bitkinin meyvesi olarak bilinen tohumlar üzerinde yapılan detaylı çalışmalar sonucunda besin değerinin yüksek olması ve içerdiği bileşenler sayesinde tüm ilginin tohum da toplanmasına olanak sağlamıştır. Sağlıklı bir kişinin yaşamını devam ettirebilecek tüm besin değerlerini taşıdığından zengin bir gıda kaynağı olduğu iddia edilmektedir. Tohumun içeriği incelendiğinde ise içerisinde bulundurduğu kimyasallara ek olarak, yağ (% 35,5), karbonhidrat (% 27,6) ve protein (% 24,8) bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Tohumda içerik olarak en fazla bulunan yağlar da, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve düşük oranda doymuş yağ asitleri (SFA) bulunduğu karakteristik özellikleri sayesinde keşfedilmiştir (Atakan, 2012; Farinon et al., 2020; Gündüz et al., 2020).

Kenevir tohumu yağı, esansiyel yağ asitleri (EFA) ve aminoasit içeriği bakımından çok değerlidir. Tohum yağındaki esansiyel yağ asitlerinden ise çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinen linoleik asit (omega (ω) 3) ve α -linoleik asit (omega (ω) 6) ideal oranda (3:1) bulunmaktadır. Bu yağ asitlerini vücut da üretilmediği için belirli oranlarda dışarıdan

alınması gerekir, aksi takdirde bazı rahatsızlıklara neden olabilir. Hastalık tedavilerinde ω -3/ ω -6 yağ asitleri ise hastalık türüne göre alınan oranları değişim gösterir ve doğru oranlarda alınan yağ asitleri, kullanılan ilacın dozunu düşürür. Bu nedenle ω -3/ ω -6 yağ asitlerinin oranı, hastalığın gelişimi ve sağlık belirleyicisi olarak oldukça önemlidir. Ek olarak ω -3 yağ asitlerinin ise antikanser, antiosteoporotik, kalp-damar sağlığını korunması, sinir sistemini korunması vb. faydası olduğu bilinmektedir (Turan et al., 2013; Yıldırım & Koca Çalışkan, 2020). Ayrıca kanser hastaları ω -3 yağ asitlerini kemoterapi ve radyoterapi sırasında kullandığında tedavinin hızını artırdığı ve hastalarda görülen halsizlik, zayıflama, kas kaybı gibi belirtilerini de yok ettiği çalışmalar sonucu keşfedilmiştir (Arı et al., 2017).

Modern tıbbın gelişmesi ile birlikte kanser hastaları için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemleri yerine yardımcı alternatif tedavi yöntemlerine yönelim başlamıştır (Baykara, 2016). Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri de dikkatleri üzerine çeken kenevir bitkisidir. Kenevir bitkisinin, kanser hücrelerinde *in vitro* çalışmalarda bazı sonuçlara varılmıştır. Bu sonuçlardan bazıları; (1) kannabinoidler göğüs kanser hücreleri üzerindeki kannabinoid reseptörlerine (CB1/2) bağlanarak antiproliferatif etki göstermiştir, (2) kannabinoidlerin, beyin kanseri hücrelerinin migrasyon ile yayılmasını engellediğini ve antiproliferatif etki yaptığı tespit edilmiştir ve (3) akciğer kanser hücrelerinin kenevir tohumu yağında bulunan ω -3 ve gama-linolenik asit (GLA) yağ asitleri sayesinde kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatmaktadır (Balpınar & Aytaç, 2021; Ünal, 2019). Kannabinoidler kullanarak farklı kanser türleri ile hem *in vitro* hem de *in vivo* birçok çalışma yapılmış, kannabinoidlerin kanser türlerine (akciğer, deri, meme, prostat, beyin vb.) karşı antiproliferatif ve proapoptotik etkiler sağladığı gösterilmiştir. Ek olarak kannabinoidler; anjiogenez, metastaz, invazyon, ve hücre göçünü engelleme yetenekleri keşfedilmiştir (Massi et al., 2013). Kannabinoidler ile yapılan umut verici çalışmalar sonucunda, agresif kanser hücrelerine karşı antikanser aktivitesi varlığından söz edilmeye başlanmıştır. Bazı *in vitro* çalışmalar da, kannabinoid çeşidi olan tetrahidrocannabinol (THC) ve diğer kannabinoidlerin meme kanseri, akciğer kanseri, prostat kanserli, glimolar, cilt kanseri vb. kanser türlerine karşı antineoplastik etki etme yeteneğinin varlığından da söz edilmektedir (Nasir et al., 2017).

Dünyada kanser tanılarının % 12,8'i ve kanserden ölenlerin % 17,8'ine akciğer kanseri neden olmaktadır (Subak et al., 2020). Akciğer kanserine, % 94 oranıyla sigara, % 6 oranında da yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, genetik, radyasyon gibi farklı etkenler sebep olmaktadır (Alar & Şahin, 2012). Akciğer kanserinin iki tipi bulunmaktadır.

Bunlar küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) dir. Bu kanser türüne cerrahi yöntemler, kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilse de hastalarının sağkalımı oldukça düşük olmaktadır. Bu neden ile akciğer kanserinin genetik gelişimleri incelenmeli ve yeni tedavi yöntemleri araştırılması zorunlu hale gelmiştir (Zamani & Zamani, 2013). Akciğer kanser tedavisi için araştırılan yeni alternatif yöntemlerden biri ise kenevirdir. Bu yeni tedavi yöntemi ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlardan biri ise A549 ve H460 akciğer kanser hücreleri bir kannabinoid çeşidi olan kannabidiolün (CBD) bir *in vivo* çalışma sonucunda, CBD hücrelerin canlılığını azaltmış ve akciğer kanser hücrelerinin metastaz yapmasını engelleyerek antimetastatik özellik göstermiştir (Kis et al., 2019). Bunlara ek olarak kenevir tohumu yağı içeriğindeki antikanser özelliği bulunan linoleik asit ve α -linolenik asitin kanserli hücrelere etki etmesidir (Leizer et al., 2000).

Bu araştırmada kenevir tohumu yağın içindeki esansiyel yağ asitlerinin belirlenmesi ve akciğer kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkisi *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda narkotikle ilişkilendirilen kenevir bitkisinin aslında tıbbi bir ilaç olarak kullanımındaki yararlarından bahsetmek, ayrıca kanser hastaları için yeni bir alternatif tedavi yöntemlerine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

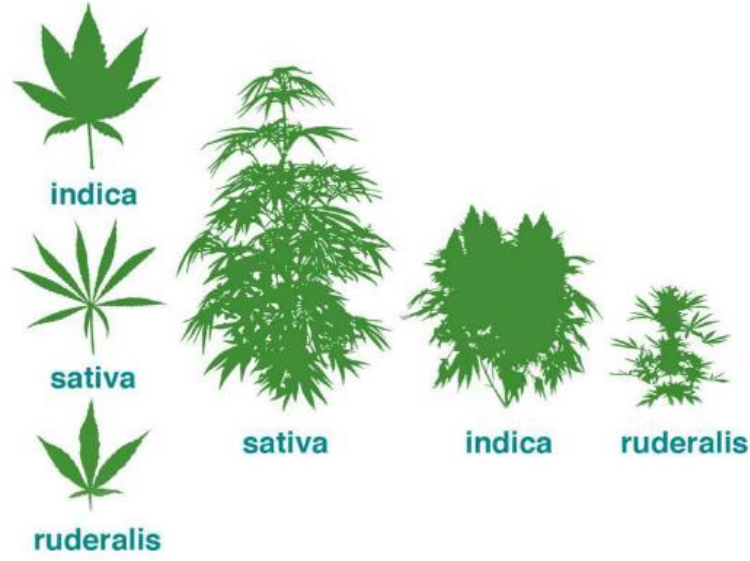
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kenevir (*Cannabis*)

Ülkemizde ‘kenevir’, ‘kendir’ ve ‘esrar’ olarak tanınan, İngilizcede ‘hemp’ olarak isimlendirilen bir bitki olan kenevir, *Cannabaceae* familyasına ait; tohumlu, tek yıllık, otsu, çiçekli ve dioikdir. Bitki 0.5-4 m arası boy uzunluğuna ulaşabilmek de ve genellikle üst ile orta kısım arasında dallanmaktadır. Çiçekleri çift evcikli olduğundan erkek ve dişi çiçekler farklı bireylerde görülür. (Arslan, 2018; Göre & Kurt, 2021).

Kenevirin anavatanı Orta Asya olarak kabul edilmektedir. İlk olarak lif üretimi için ekimi yapılmış, daha sonradan çay, merhem eldesi içinde kullanılmıştır. Kenevirin Orta Asya’dan Avrupa’ya göçü M.Ö. 1500 ve M.S. 500 kapsamaktadır. M.Ö 1500 yılında Hindistan’da tarımı yapıldığı bilinmek ile beraber ilk olarak narkotik amaçlı kullanılmıştır (Akgül, 2014; Gönen, 2009).

Bilim insanları arasında, kenevir cinsinin tür sayısı ve sınıflandırılması tartışma konusu olsa da bilim insanların büyük çoğunluğu keneviri üç ana türe ayırmışlardır. Bu üç tür ise *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* ve *Cannabis ruderalis* (Şekil 2.1) olarak bilinmektedir (Göre & Kurt, 2021). Kenevir türlerini morfolojik, kimyasal, genetik gibi özelliklerini inceleyen bazı botanikçiler ise *C. indica* ve *C. rawralis*’in bir tür olmadığını, *C. sativa* türünün çeşitleri olduklarını savunmaktadır (Thomas & ElSohly, 2016). *C. sativa* türü kültür bitkisi olarak, *C. indica* içeriğindeki tetrahidro kannabinoid (THC) oranının fazlalığından dolayı narkotik amaçla kullanılmaktadır. *C. ruderalis* ise yabani bir tür olup doğada kendiliğinden yetişmektedir. Temelde farklılıkları birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilen bu türler kendi aralarında melezlenmesi sonucunda ara formlar oluşturabilirler (Pashı, 2021).



Şekil 2. 1: Kenevir bitkisinin ait türler (Göre & Kurt, 2021)

Kenevir bitkisinin ekimi sırasında gübre ve böcek ilaçları kullanılmasına gereksinim olmaması, kök sisteminin oldukça güçlü olması ve kuraklığa karşı dirençli olmasından dolayı birçok ortamda üretim kolaylığı sunmaktadır (Chang et al., 2021; Yıldırım & Koca Çalışkan, 2020).

Kenevir, ender bir bitki olarak oldukça çoklu kullanım alanlarına sahip endüstriyel bir bitkidir. Gövde kısmından lif, tohumlarından yağ, yaprak ve çiçeklerinden narkotik için üretimi yapılmaktadır. Tıp alanında da çok fazla kullanım sağlamasına ek olarak doğal yaşam malzemelerinde (çatı, duvar, kağıt, karton vb.) de kullanılmaktadır (Gönen, 2009). Ayrıca bu özellikleri dışında antibakteriyel özelliği sayesinde kullanımı için oldukça çekici bir hal almaktadır (Andradas et al., 2021).

Kenevir bitkisi Cannabinoid (kannabinoid) adında kimyasal maddeler içerir. Doğal olarak üretilen bu kimyasal madde kenevirin hem negatif hem de pozitif etkilerinden sorumludur (Aldemir et al., 2020). Kenevir bitkisinden izole edilen kimyasalların çoğunun psiko-aktif bileşen olmasa da FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından psikoaktif bir madde olarak sınıflandırıldığından, 5000 yıldan beri terapötik etkisi bilinmesine rağmen araştırmacılar tarafından üzerine çalışılması çok güç olmuştur (Borgelt et al., 2013). Kenevir, 1990 yılından bu yana epilepsi, MS, HIV/AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıklara alternatif terapötik bir ürün olarak kullanıldığı bilinmektedir (Singh et al., 2021).

C. Sativa bitkisi, kannabinoid, terpen ve flavonoid dahil 500'den fazla sekonder metabolit içerir (Singh et al., 2021). 21. yüzyılın ilacı olarak da kabul edilen kannabinoidler içeriğinde tıbbi bileşiklere sahiptir. Üzerinde birçok araştırma yapılmış kannabinoidlerin insan vücudunda bazı çalışma mekanizmaları keşfedilmiş ve tedavi için ilaç olarak kullanılabileceği kesinleşmiştir (Atlı et al., 2020)

Günümüzde kenevirin evcilleştirilmiş formu olan *Cannabis Sativa L.* sadece Asya ülkeleri ile sınırlı olmayıp Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Afrika ülkelerinde de yaygın olarak tarımı yapılmaktadır (Farinon et al., 2020). Kenevir ülkemizde pamuktan sonra en fazla tarımı yapılan lifli bir bitkidir (Gürel et al., 2000). Ülkemizde, kenevirin kontrollü bir şekilde farklı iklim koşullarında 19 ilde tarımının yapılmasına izin verilmiştir (GTHB, 2016).

2.1.1 Kenevir bitkisinin gövdesi

Gövde kısmı, 1-5 m arası uzunluğa ve 1-6 cm arası çapa sahiptir. Ayrıca düz ve iç kısmı oyuklu bir gövde yapısı olduğu bilinmektedir (Şekil 2.2) (Tutuş et al., 2020).



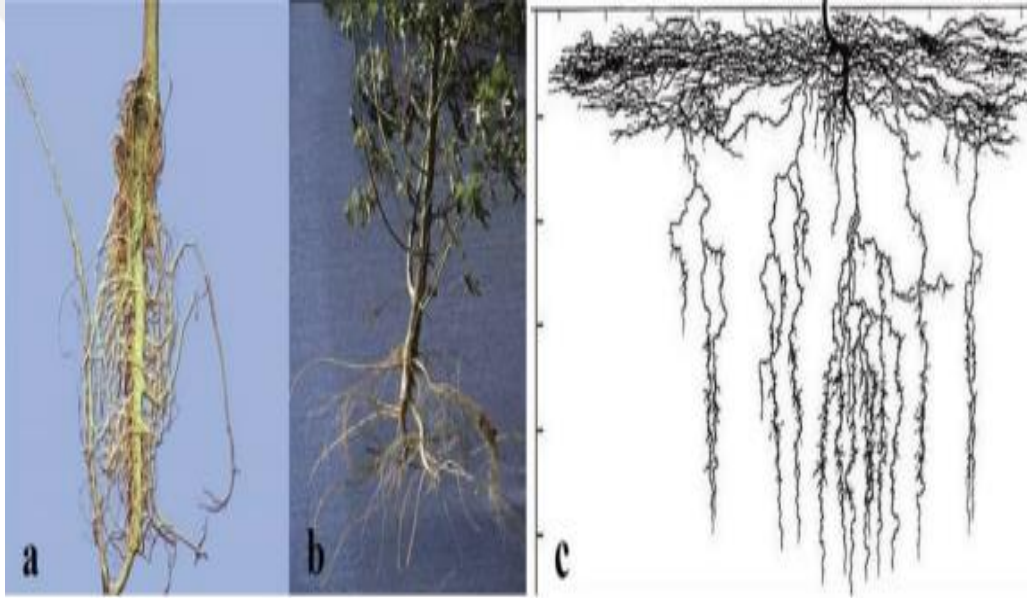
Şekil 2. 2: Kenevir bitkisinin gövde (sap) kısmı ve lifli yapısı (Tutuş et al., 2020)

Kenevirin sapı, endüstriyel lif yapımı olarak kullanım sağlamaktadır. Lif miktarı sapın miktarından daha fazladır. Bu özellik sayesinde kenevir ekimine teşvik için sap kısmındaki liflerin varlığı dikkat çekici olabilmektedir. Kenevir sapının verimliliğini

araştırmak için liflerin şekil özellikleri mikroskop altında detaylı bir şekilde bakmak gerekir. Ek olarak metan ve alkol eldesi için de kullanılmaktadır (Li et al., 2013).

2.1.2 Kenevir bitkisinin kökü

Kenevirin kökü toprağın yapısı ve nemine göre farklılık gösterebilmektedir (Şekil 2.3). Gözenekli ve kuru topraklar kökü primer şekilde aşağıya doğru büyürken, sert ve nemli topraklarda ise aşağıya doğru bir büyüme görülmez. Primer kökler 3 m, sekonder kökler ise 80 cm derinliğine kadar uzama görülmektedir (Başbag & Ekinci, 2020). Genel olarak oluşan kök uzunluğu 140 cm'dir. Kenevir kökleri fazla suya maruz kalmamalıdır. Aksi takdirde gelişimi durabilmektedir (Ekinci et al., 2020).



Şekil 2. 3: (A) az su ve yumuşak toprakta yetişen kök. (B) çok su ve sert toprakta yetişen kök. (C) hafif yapılı toprakta yetişen kök (Small, 2016).

2.1.3 Kenevir tohumu (*cannabis seminibus*)

Kenevir tohumu, yaklaşık 3000 yıldır insanlar ve hayvanlar tarafından gıda olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antik Çin'de beş tahıldan biri olarak sınıflandırıldığı bilinmektedir. Çin'de birkaç kenevir türü, atıştırılabilir yiyecek olarak büyük olan tohumlar seçilmesi, insan tüketimi için kenevir tohumları evcilleştirildiğine dair bir kanıt sunmaktadır. Son yirmi yılda özellikle kenevir tohumlarına olan ilgi artmıştır. Kabuklu

tohumlar, konserve olarak veya vakumlanmış şekilde rağbet görmektedir (Cherney & Small, 2016).

Kenevir tohumları yaklaşık olarak, 3-6 mm uzunluğunda, 2-4 mm eninde ve türlerine göre gri, siyah veya yeşilimsi renkleri olup ince kabuklu bir yapısı vardır (Şekil 2.4) (Yıldırım & Koca Çalışkan, 2020).



Şekil 2. 4: Kenevir tohumu (*cannabis seminibus*) (Url-1, n.d.)

Kenevir tohumunun, yüksek besin değeri nedeni ile eksiksiz bir besin olduğu savunulmaktadır. Kenevir tohumu, kabuğu soyularak yağ, un ve protein tozu olarak tüketilmesi mümkün olmaktadır. Tohumun genotipi ile yapılan çalışmalar ve çevresel faktörler ile değişikliğe uğramış olsa da, yağ asitleri (FA), esansiyel amino asitlerce zengin proteinleri, karbonhidratları, vitaminleri (E, C, B₁, B₂, B₃, B₆) ve mineralleri (P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn) bakımından bir eksilme olmamıştır (Çizelge 2.1). Ayrıca kenevir tohumu, içeriğinde besin değerlerine zarar verecek bazı anti-besin bileşiklerinde bulundurmaktadır. Bunlar, çevresel faktörlerden etkilenen biyoaktif peptitler, fenol bileşikler, karotenoidler, fitosteroller gibi antioksidanlar ve biyoaktif bileşenler dir (Farinon et al., 2020; Karcier, 2021).

Çizelge 2. 1: Kenevir tohumunun (*cannabis seminibus*) besin içeriği (%) (Callaway, 2004)

	Tohumda
Yağ (%)	35.5
Protein (%)	24.8
Karbonhidrat (%)	27.6
Islaklık (%)	6.5
Enerji (kJ/100 g)	2200
Lif (%)	27.6

Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) incelemelerine göre, 28 gr kenevir tohumunda, 161 kalori, 3.3 gr karbonhidrat, 9.2 gr protein, 12.3 gr yağ, 2 gr lif, 15.4 mg E vitamini, 405 mg fosfor, 3.9 mg demir içeriği olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden kenevir tohumu süper gıda olarak kabul edilir (Chauhan, 2021).

2.1.3.1 Kenevir tohumu proteini

Kenevir tohumu proteinleri kolaylıkla sindirilmekte ve emilimi yapılmaktadır. Kenevir tohumu proteinleri, yüksek oranda benzersiz seçilmiş depolama proteinleri olan edestin ve albumin içerir. Bu proteinler esansiyel amino asitlerden oluşmaktadır. Edestin proteini, tohum protein içeriğinin yaklaşık % 60-80'nin oluşturmaktadır. Bu depolama proteini yüksek oranda arginin ve glutamik asitleri taşır ayrıca sindirimi oldukça kolay ve temel tüm amino asitleri içerir (Galasso et al., 2016; Lan et al., 2019).

Kenevir tohumu proteinlerin içerdiği besin kalitesi birçok faktörden etkilenmektedir. Bunlar, amino asit bileşikleri, genotipteki değişimler, toprak verimliliği, tohumlara hasat sonrası uygulanan işlemlerdir. Ayrıca kenevir tohumu protein yapısında bulunan proteinler, işlem sırasında antibesin bileşiklerden ve yüksek ısı kullanılmasından etkilenmektedir (Galasso et al., 2016)

2.1.3.2 Kenevir tohumu yağı (*Cannabis semen oleum*)

Kenevir tohumu içerisinde yağlar küçük küresel yapılar halinde bulunur. Bu tohum yağlarının kütlesi 0.5-2.5 μM arasında yer alır. Yağlar proteine gömülü tekli fosfolipit tabakasından oluşan hidrofobik bir triaçilgliserit (TAG) zarla çevrili çekirdekten oluşmaktadır (Garcia et al., 2021).

Tohumdan elde edilen yağlar, gıda, biyoyakıt, besin takviyesi ve çeşitli endüstriyel uygulamalar için kullanılmaktadır. Kenevir tohumları, vidalı veya hidrolik presler kullanılarak kenevir tohumu yağı elde edilebilir. (Cherney & Small, 2016).

Kenevir tohumu yağı, oda sıcaklığında sıvı halde, sarı renğinde ve yumuşak bir tatta sahiptir (Şekil 2.5). Yağı organoleptik özelliği, bitkinin yetiştiği yer, yağın çıkarılma metotları ve tohumun olgunlaşmasına bağlı olarak değişim göstermektedir. Kenevir tohumu yağının, ticari yağlara oranla düşük erime ve kaynama noktası vardır (Dunford, 2020).



Şekil 2. 5: Kenevir tohumu yağı (Url-2, n.d.)

Cannabis sativa L.'nin tohumundan elde edilen tohum yağı, besleyici, terapötik ve biyoaktivitesi ile bilinir. Kenevir tohumu yağının % 80'ni PUFA (çoklu doymamış yağ asitleri) oluşturur ve yüksek oranda önemli ω -3/ ω -6 yağ asitlerini olan linoleik asit (LA) ve α -linolenik asit (ALA) bulunmakta ve içeriğindeki FA sayesinde, çeşitli metabolik hastalık

(kanser, nörolojik bozukluk, göz fonksiyonları, kardiyoloji vb.) tedavileri için sayısız potansiyel uygulama alanı sunmaktadır. Kenevir tohumu yağı, yağ asitlerine (FA) ek olarak içeriğinde mineraller, fosfolipitler, karotenler vb. bazı bileşiklerce de zengindir (Lan et al., 2019; Mikulcova et al., 2017). Ayrıca esansiyel amino asitin metabolitleri olarak kabul edilen gamma-linolenik asit (GLA) ve stearidonik asit (SDA) tohum yağının içeriğinde bulunmaktadır (Doğan & Doğan, 2021). GLA ve SDA atopik dermatit (egzama) ve bazı cilt hastalıklarında semptomları azaltmaktadır (Leson, 2003).

Kenevir tohumu yağında fazla miktarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve esansiyel yağ asitleri (EFA) insan vücudunda sentezlenmediğinden günlük olarak ideal oranda besinler ile birlikte kullanıldığında sağlık açısından gelişmeler ve iyileştirme (kanın pıhtılaşması, tansiyon, ağrı, ödem, sindirim sistemi, bazı hormonların yapılması ve vücut sıcaklığının korunmasını) sağlamaktadır. Kenevir tohumu yağı besin değerinin yüksek olması nedeniyle gıda bileşeni olarak da büyük bir potansiyel oluşturmaktadır (Çelebi et al., 2017; Garcia et al., 2021).

Kenevir tohumu yağı taşıdığı fenol ve flavonoid içeriği sayesinde yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir (Cerino et al., 2021). Antioksidanların, bağışıklığı güçlendirme ve kanser, kalp hastalığı gibi hastalıkları önleme yetenekleri mevcuttur (Cadenas & Davies, 2000).

Yağ içeriğinde eser miktarda da olsa kannabidiol (CBD) ve tetrahidro kannabinoid (THC) kannabinoidleri bulunmuştur. CBD oranı lif ve yağlarda THC oranında daha yüksektir. CBD'nin varlığı önemsenmekte çünkü antikonvülsif, antimikrobiyal ve antiepileptik olduğu kanıtlanmış bir kimyasal bileşiktir. Yağ içindeki CBD az olsa da sağlık alanında birçok yarar elde edilebilir (Leizer et al., 2000).

2.2 Kanser

Kanser; klonalite, anaplazi ve metastaz yapma özellikleri ile tanımlanan bir hastalık grubudur. Kanser tek bir mutant hücreden gelişir (klonalite), çevre faktörlerinden bağımsız ve kontrolsüz çoğalır (otonomi), diferansiye hücre özellikleri kaybolmuştur (anaplazi) ve biyolojik davranışlarına göre farklı zamanlarda metastaz yapan türler oluşturur. Kanser, tüm dünyada tarih boyunca insanlar ve hayvanların sağlığını sıklıkla tehdit etmektedir. Kanser ilk teşhisi M.Ö. 3000 yılına kadar dayandırılmaktadır. Kelime olarak kanser, Latince “canker” ve “carcinoma” kelimelerinden türemiştir (Baykara, 2016).

Günümüzde kanser vakaların artışının nedeni olarak, sanayileşmenin çoğalması ve yaşama süresinin uzaması olarak görülmektedir (Gencer et al., 2021). Ayrıca kanser hastalığı olan bireyler, kanser nedeni ile fiziksel, psikolojik ve sosyo-ekonomik sıkıntılar yaşamaktadır (Kavradım & Özer, 2014).

Bütün kanserler, DNA dizisinde oluşan birkaç anormallik sonucunda oluşmaktadır. Kanser, % 10-15'in kalıtsal olarak genler ile aktarıldığı, % 85-90'nın ise çevresel faktörler sonucunda DNA'nın mutajenler ile karşılaşması, replikasyon sonucunda oluşan değişimler gibi nedenlerden dolayı ortaya çıkan bilen bir hastalıktır. Kalıttan daha çok çevresel faktörlerin kansere yatkınlığı arttırdığı bilinmektedir. Örneğin, tümör baskılayıcı genlerde oluşabilecek herhangi bir deformasyon, karşılaştığı herhangi bir karsinojenik (sigara vb.) etki bireylerde kansere yatkınlık artırmaya neden olur (Yokuş & Çakır, 2012).

Kanser hücrelerinin, kontrolsüz çoğalma, farklılaşma yeteneğinin yok olması, apoptoz yeteneğini azalması, doku yapısının bozulması gibi karakteristik özellikleri düzenleyen üç biyolojik (hücre siklusu, apoptosis ve diferansiyasyon (farklılaşma)) mekanizmaları bulunmaktadır. Bu özellikler kanser tipine göre sahip oldukları yollar farklı etkiler göstermektedir. Sahip olunan bu farklılıklarda kanser hastalığı için bireysel farklılığı oluşturur (Corn & El-Deiry, 2002).

2.2.1 Hücre siklusu (döngüsü)

Hücre siklusu (döngüsü), hücre büyümesi ve çoğalması için programlanmış bir döngüdür. Hücre döngüsünün süresi hücreler arasında farklılık (1 dakika ile 1 sene arası değişmekte) gösterebilmektedir. Hücre döngüsünün kontrol noktaları ve düzenlemesinde oluşan herhangi bir anormallik kanser oluşmasını etkileyebilmektedir. Hücre döngüsü sırasında oluşan mutasyonların insanda çeşitli kanserlere neden olmaktadır (Yokuş & Çakır, 2012).

Kanser ve normal hücreler çoğalırken bazı fazlardan geçer. Her hücrenin çoğalma süresi ve hızı farklılık gösterir. Bu farklılığında G_0 fazı belirler. Hücre döngüsünün 5 kontrol noktası bulunmaktadır. Fazların genel özellikleri (Şekil 2.6) ise;

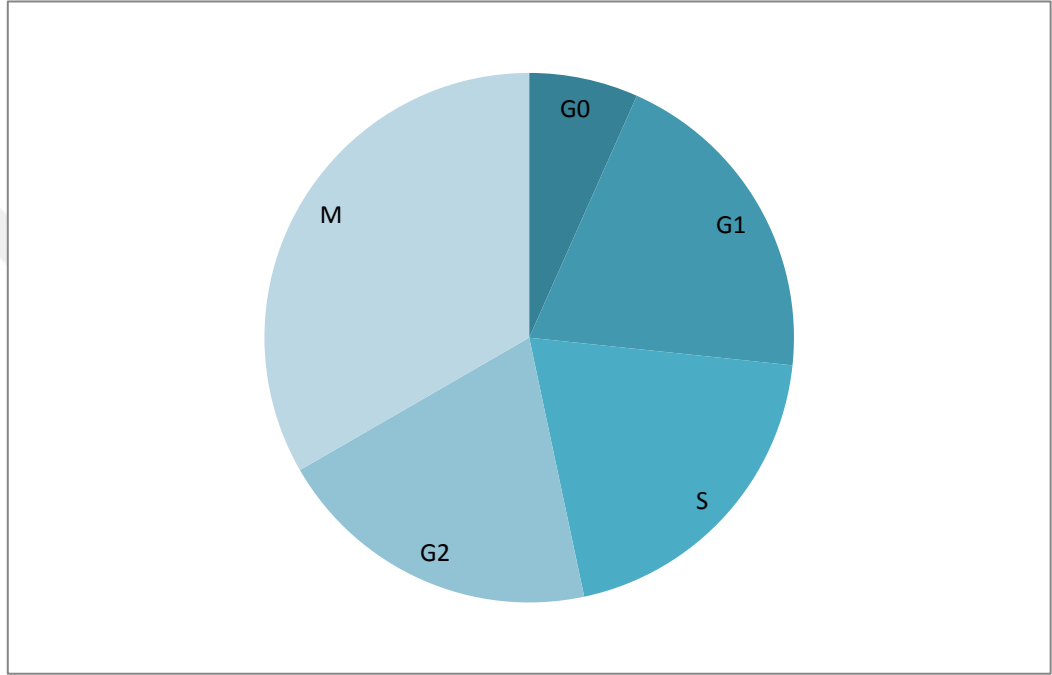
G_0 (Gap 0), bu faz hücrelerin dinlenme, durma, uyku süresinin belirlendiği yerdir. Hücre yıllarca bu fazda bekleyebilir.

G_1 (Gap 1), bu fazda DNA sentezine hazırlık için amino asitlerin, proteinlerin ve RNA sentezi yapılmaktadır.

S (sentez), bu faz ise DNA sentezinin yapıldığı yerdir.

G₂ (Gap 2), bu fazda da mitoz evresine ve bölünmeye hazırlık yapılır. Protein ve RNA sentezi devam etmektedir.

M (Mitoz), bu faz son fazdır. Anafaz, telofaz, profaz, metafaz aşamalarından geçer ve sitoplazmik bölünme ile iki hücre oluşur. Hücre bu fazdan sonra tekrar G₀ fazına geçer (Kurtman, 2018).



Şekil 2. 6: Hücre döngüsü fazları (Kurtman, 2018)

Hücre siklusunda bir faz bitmeden diğerine geçilmez geçildiği takdirde hücrede hasar meydana gelmektedir. Bu olay ile karşılaşılmasa için fazlar arasında kontrol noktaları bulunmaktadır. G₁-S ve G₂-M fazları arasında bulunan kontrol noktaları, hücrenin döngüye devam edip edemeyeceğini belirler. Kontrol gruplarını doğrudan etkileyen iki gen grubu vardır (Cabadak, 2008). Bunlar;

1. Onkogenler, hücrelerin kanserleşme sürecinde önemli rol oynayan genlerdir. Bu genler, genellikle hücre proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenleyen proto-onkogenlerin endojen veya eksojen mutasyonları sonucu tümör oluşması yönünde değişime uğrarlar. Onkogenler, hücre proliferasyonunu ve apoptoz sürecini düzenleyen proteini kodlamak ile görevlidirler. Aktif hale geldiklerinde

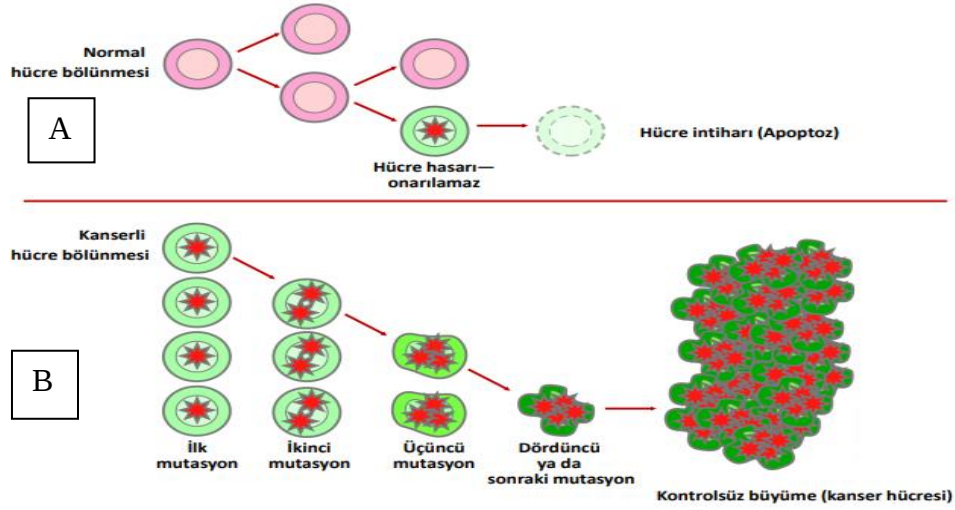
metabolizma işleyişi üzerindeki bozulmalar ve klinik olarak gözlenebilecek aksaklıklar meydana getirebilirler. Onkogen aktivasyonları çeşitli yapısal değişimler sonucu (kromozomal düzenleme, mutasyon, gen amplifikasyonu vb.) oluşur (Bireller İplik & Çakmakoglu, 2018).

2. Tümör baskılayıcı (süpresör) genler, normal hücrelerde hücre büyümesini düzenleme ve tümör gelişimini inhibe etmekten sorumlu genlerdir. Çoğunlukla tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünü inhibe edebilir, hücre farklılaşmasını sağlayabilir veya apoptozu tetikleyerek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engellemeye bilmektedir. Ayrıca bazı tümör baskılayıcı genler, onkogenlerin aktivasyonlarını inhibe ederler. Tümör baskılayıcı genler, somatik mutasyonlar (nokta mutasyonları, delesyon vb.), translokasyon, epigenetik değişimler nedeniyle fonksiyon kaybı, apoptozu karşı direnç kazanma, kontrolsüz çoğalmayı tetikleyerek kansere yol açarlar (Küçüksayan et al., 2018). Tümör baskılayıcı olarak bilinen Rb (retinoblastom) ve p53 genleri hücre döngüsünde bazı kontrol noktalarında bulunmaktadır. Rb geni hücre döngüsü M fazından G₁ fazına geçişte, p53 geni ise G₁ fazından S fazına geçişte ve G₂ fazından M fazına geçiş kontrollerin etki ettiği bilinmektedir (Akgün et al., 2018).

Normal hücreler, onkogenlerin aktifleşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda, kontrolsüz çoğalma, kontakt inhibisyonun yok olması, invazyon ve metastaz yeteneklerini kazanır ve anormal hücrelere dönüşürler (Aliustaoğlu, 2009).

2.2.2 Apoptoz

Programlı hücre ölümü olarak bilinir. Hücre, yaşlandığında, zararlı hale geldiğinde kendi otonom mekanizması ile enerji harcayarak kendini öldürme işlemine apoptoz denir. Her saniyede hücrede yapım (mitoz) ve yıkım (apoptoz) olayları görülmektedir. Bu olay sekteye uğradığında çeşitli hastalıklara neden olur. Örneğin kanser hastalarının hücreleri incelendiğinde hücre proliferasyonunda (hücre çoğalması (yapım aşaması)) artış, apoptozda (hücrenin programlı ölümü (yıkım aşamasında)) ise azalma görülür (Şekil 2.7) (Kaya et al., 2012).



Şekil 2. 7: (A) Mutasyon sonucu normal hücrelerin izlediği yol. (B) Mutasyon sonucu kanserli hücrelerin izlediği yol (Berk, 2014)

Bir hücre apoptoz sinyali aldığı anda sırasıyla oluşan metabolik ve fizyolojik olaylar;

- Hücre komşu hücrelerle olan iletişimi keser ve büzüşür,
- Çekirdek büzüşür ve kromatitler belirgin hale gelir,
- DNA zincirleri nükleozomlar tarafından kesilir,
- Hücre zarı yapısında bulunan fosfolipitler iç yüzeyden ayrılarak dış yüzeye transloke olur,
- Çekirdek parçalara ayrılır,
- Hücre zarı küçük cisimcikler halinde koparak uzaklaşır,
- Ayrılan küçük cisimcikler fagosite edilir (Coşkun & Özgür, 2011).

Apoptoz sırasında rol alan genler;

- Bcl-2 gen ailesinin, bir kısmı (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo vb.) apoptoz inhibitörü, bir kısmında (Bax, Bak, Bad, Hrk vb.) apoptoz aktivatörü olarak görev yapmaktadırlar. Bcl-2 genlerinin ürünleri, çekirdek zarı, mitokondri ve endoplazmik retikulum zarı üzerinde tek başlarına yada başka proteinler ile bağ yaparak çalışırlar.

- p53 geni, bir tümör baskılayıcı gen olarak çalışır. Hücresel hasarlarda DNA'ya direk bağlanarak hasarı tanır ve onarım için hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak tamir mekanizmasını devreye sokar ve hasarı tamir etmeye çalışır. Ancak hasar tamir edilemeyecek kadar fazla ise hücreyi apoptoza sürükler. p53 geni mutasyona uğradığı takdirde hücrenin yaşam sürecini uzatarak hücrenin kanserleşmesine yol açabilir.
- Kaspazlar, apoptozdan sorumlu sistein proteazlardır. Kaspaz enzimi ailesi apoptozun başlaması ve uygulanması için önemli rollere sahiptir. Sistein proteaz olan kaspazlar aspartik asitten sonra gelen peptid bağı kırarlar. 100 farklı proteini hedef alarak apoptoza neden olurlar. Kaspazlar apoptoz sırasında, DNA tamiri ve replikasyonu için kullanılan enzimleri inaktive eder ve hücre zarlarının tomurcuklanmasını sağlarlar (Celepli et al., 2020; Coşkun & Özgür, 2011; İnci et al., 2009).

2.2.3 Anjiyogenez

Vasküler sistemin oluşumu, vaskülogenez ve anjiyogenez olarak üzere iki çeşit süreç görülür. Vaskülogenez, embriyo gelişimi sırasında kan damarlarının farklılaşmasını, anjiyogenez ise yetişkin bireylerde kan damarlarında türeyerek yeni damar yolunun oluşması sürecidir. Anjiyogenez, embriyonik gelişim, yara iyileşmeleri ve üreme fonksiyonlarında çok önemlidir. Fakat tümör gibi patolojilerde yeni damar gelişmesi için proliferatif süreci yönetmektedir. Anjiyogenez atık maddeleri atmaya ve besin desteği vermeyeceğinden tümör yayılımı sınırlı (1-2 mm ötesine gidemez) olduğundan solid tümörler ve metastazın yayılmasına yardımcı olur (Çelik & Mete, 2017).

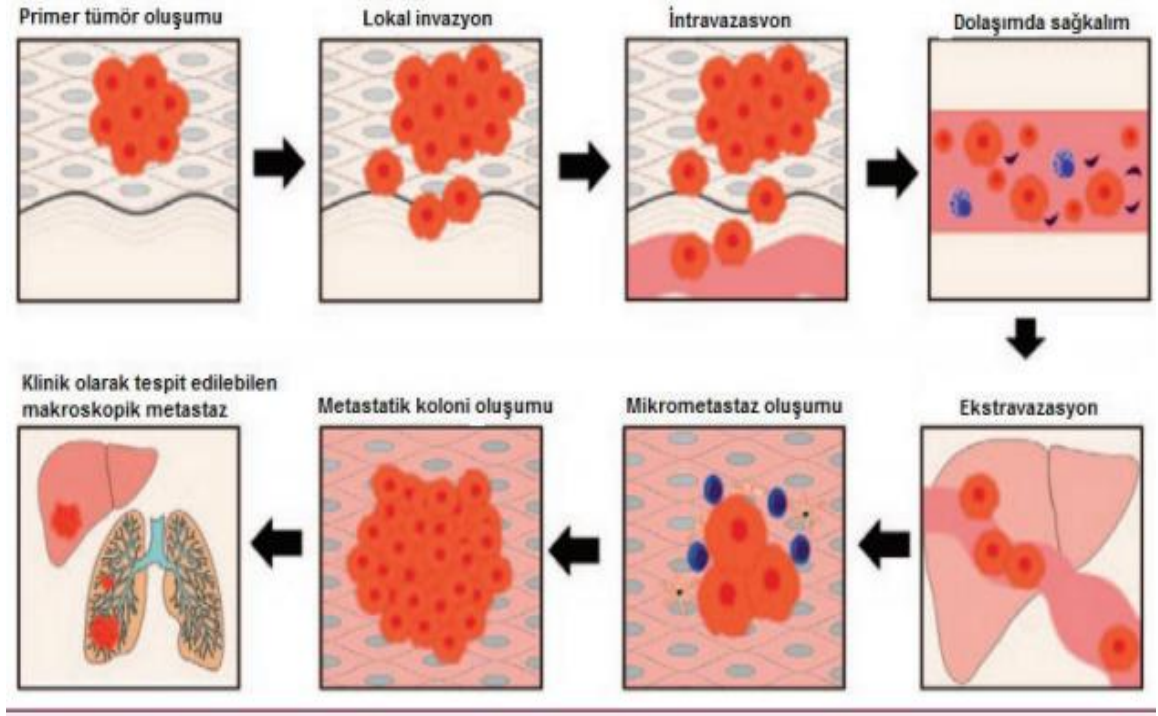
Anjiyogenez tümör hücrelerinde, hücreler tarafından veya makrofajlar tarafından uyarılırlar. Anjiyogenez tümör hücreleri için gerekli olan besin maddelerini, oksijeni ve metastatik yayılımı sağlamada oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Tümör hücrelerinde organize olma özelliğinin olmaması nedeni ile oluşan damarlanma fonksiyonunda bozulma veya farklı damarlanmalar meydana gelebilmektedir (Hamutoğlu & Önder, 2017). Anjiyogenezin tümör yayılmasına ek olarak metastazı kolaylaştırdığı klinik çalışmalar tarafından kanıtlanmıştır (Konukoğlu & Turhan, 2014).

2.2.4 Metastaz

Kanser hücrelerinin bulundukları dokudan başka bir dokuya, doğrudan veya kan-lenf damarlarıyla sıçramasına metastaz denir. Kanserli hücrelerin bulunduğu koloniden ayrılması moleküler açıdan zincir kırma reaksiyonu olarak kabul edilir. Çünkü normal ve kanserli hücreler birbirlerine hücre dışı protein ağı (extracellular matrix) ile bağlıdırlar. Metastaz yapan hücreler bir şekilde bu bağı kırmayı başarırlar (İnci et al., 2012).

Metastazın oluşum mekanizması sırasıyla (Şekil 2.8);

1. Epitelyal-mezenkimal geçiş (Lokal invazyon); tümör hücrelerinde patolojik bir olaydır geri dönüşsüzdür. Bu süreçte hücre-hücre adezyonu azalmaya, hücre-ekstrasellüler matriks çözünmeye ve hücre polaritesi azalmaya başlar. Tümör hücreleri ekstrasellüler matriks özelliğini kaybetmesi sonucunda primer yapılı tümör koloniden ayrılır.
2. İntravazasyon; primer yapıdan ayrılan tümör hücrelerinin kan ve lenf damarlarına geçmesidir. Bazı moleküller aracılığıyla tümör hücrelerine gerekli besin ve oksijene ulaşması için anjiyogenez başlar.
3. Dolaşımda sağ kalım; tümör hücrelerinin küçük bir kısmı için geçerlidir. Çünkü tümör hücrelerin büyük bir kısım hemodinamik güçler ve immün sistem hücrelerinin saldırısından dolayı dolaşımdan atılır. Dolaşımda sağ kalan tümör hücreleri metastaz oluşturabilirler.
4. Ekstravazasyon; dolaşımdaki tümör hücrelerin kan ve lenf damarlarını geçerek ilgili organa ulaşmasına denir. Tümör hücreleri ilgili organın damar sistemine ulaştığında lümene yapışarak koloni oluştururlar daha sonra damara delerek organa ulaşırlar.
5. Mikrometastaz; tümör hücrelerinin tutunduğu organda hayatta kalabilmesi için gerçekleştirmesi gereken olaylardır. Tümör hücrelerin gelecekte hücre proliferasyonunu sağlayabilmek için büyüme faktörü gibi sinyaller salgılamaya başlar.
6. Metastatik koloni oluşumu; tümör hücreleri, epitelyal-mezenkimal oluşumunun tersi işlemler yaparak çoğalırlar ve organda makro koloniler oluşturmaya başlarlar (Özkara et al., 2020).



Şekil 2. 8: Metastaz oluşum mekanizması (Özkara et al., 2020)

2.2.5 Kanser tedavi yöntemleri

Genel olarak kanser tedavileri 4 yol ile gerçekleştirilmektedir. Bunlar cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve alternatif tıptır. Bunlar;

- Cerrahi, kanserli doku ile birlikte invazyon riski taşıyan sağlıklı dokunun bir kısmının alınmasıdır. Fakat her durumda kullanılması mümkün olmayan bir yöntemdir.
- Radyoterapi, kanserli dokular üzerine bir miktar ışın verilmesiyle yapılan bir tedavidir.
- Kemoterapi ilaç kullanılmasıyla kanserli dokuyu tedavi yöntemine dayanır.
- Alternatif tıp ise marjinalliğe açık olunması gereken bir yöntemdir. Bu yöntem uygulanan tedaviye destek amacı vardır. Ayrıca güvenilir ve etkinliği kanıtlanmış yöntemler olmak zorundadır (Özenoğlu et al., 2013).

Kanser tedavilerinde, cerrahi, radyoterapi ve lokal kemoterapi uygulanması genel yaklaşımlardır. Bununla birlikte son yıllarda tedaviler hastaya ve tümör çeşidine göre değişim göstermektedir. Hedefe yönelik çalışmalar geliştirilmiş tedavilerin kişilere

uygunluğu biyobelirteçler sayesinde kanser tedavilerinde bireyselleşmenin yolu açılmıştır (Yalçın & Sarı, 2015).

2.2.6 Kanser oluşum nedenleri

Kanserden korunma ancak ona sebep olan faktörlerden uzak durmakla mümkün olmaktadır. Kanserin oluşmasında, çevresel faktörler (UV, tütün, alkol, aşırı kilolu olma, virüsler, gıdalarda, fiziksel-kimyasal ajanlar vb.) genetik risk faktörleri gibi başlıca sebepler neden olmaktadır. Bazı kanser türleri hem çevresel hem de genetik faktörler neden olabilmektedir. Eğer ki bir kanser oluşumunda, neden olarak iki faktörde (çevre ve genetik) etki etmiyorsa bu kanserin kendiliğinden oluştuğunu söylemek mümkündür (Erdem et al., 2017; Güran, 2005).

Başlıca kanser oluşum nedenleri;

- Aile geçmişi: Kanserin büyük çoğunluğunu genetik mutasyonlar sonucu oluştuğu bilinmektedir. Bu mutasyonlar sonucu da genetik materyal ebeveynlerden çocuğa geçer ve neslin geri kalanında sıklıkla görülür.
- Tütün kullanımı: Yapılan araştırmalar sonucunda tüm akciğer kanserlerin % 85'ini ve ölümlerin % 30'unu nedeni olarak sigara tüketimi görülmektedir. Sigara içenlerin içmeyenlere oranla daha farklı kanser türlerine (akciğer, gırtlak, böbrek, mide vb. kanserler) yakalanma riskleri yüksektir.
- Güneş ışığı ve Radyasyon: Cildin erken yaşlanmasına ve kansere yakalanma riskini artırmasına yol açmaktadır. Fazla güneş ışığına maruz kalınması halinde güneş yanığı, kanserler, elastik ve kolajen proteinlerinin yok olmasına yol açmaktadır.
- Organik ve inorganik kimyasallar: Yüksek konsantrasyonlardaki kimyasalların tehlikeli olduğu ortaya çıkmasıyla sağlık alanında tehditlere yol açtıkları kesinleşmiştir. Bu kimyasalların kansere neden olan kimyasal ajanlara ise karsinogen adı verilmektedir. Çevremizde analiz edilmiş yaklaşık 30 bin kimyasal elementle (böcek ilacı, boya, arsenik, benzen vb.) etkileşim halinde olduğumuzdan kanser riskleri artmaktadır.

- Hormonlar: Östrojen ve progesteron, kalp krizi, meme ve rahim kanseri, felç ve kan pıhtılaşma riskini artırdığı bilinmektedir (Parsa, 2012).

2.2.7 Kanser epidemiyolojisi

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2019 yılında dünya genelinde ölüm sebeplerinin ikinci nedeni olarak gösterilmekte yani kanser insidansı dünyada hızlı bir şekilde artmaktadır. 2020 yılı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (GLOBOCAN) verileri incelendiğinde yaklaşık olarak dünyada 19.3 milyon yeni varaka ve 10 milyon ölüm görülmüştür (Sung et al., 2021).

2.3 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, bronş epitelinden köken alan, 60-70 yaş aralığındaki kadın ve erkeklerde görülme sıklığı çok yüksek olan bir kanser türüdür. Genç yetişkinlerde görülme sıklığı (50 yaş altı % 5-10) oldukça düşüktür. Erkeklerde ve kadınlarda birlikte görülmesi sebebiyle dünyada en çok öldürücü kanser tipi olarak bilinmektedir. Akciğer kanserinin baş nedeni olarak sigara görülmektedir (Alar & Şahin, 2012; Ergelen & Çimşit, 2000). Günümüzde uygulanan tıbbi tedaviler sonucunda hasta kişinin ortalama 5 yıl sağkalım oranı % 16'yı kapsamaktadır (Üstüner & Entok, 2019).

Akciğer kanseri, kitlenin bulunduğu yere göre semptomlarda değişiklik göstermektedir. Fakat çoğunlukla, hırıltı, hemoptizi (ağızdan kan gelmesi), göğüs ağrısı, kilo kaybı, ateş, halsizlik, kemik ağrısı ve öksürük gibi semptomları bulunmaktadır. Akciğer kanseri semptomları büyük ölçüde spesifik olmayıp, kronik olarak devam eden solunum yolu hastalıkları ile karıştırılma olasılığı çok yüksek olduğundan tanısının yapılması çok güçtür (Birring & Peake, 2005; Ergelen & Çimşit, 2000).

Farklı kanser türlerinin tedavilerinde, kanser biyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda olumlu gelişmeler olsa da akciğer kanseri tedavisi için yapılan kanser biyolojisi çalışmalarından elde edilen gelişmeler yeterli bulunmamaktadır. Çünkü akciğer kanseri, dünya genelindeki kanser ölümlerin başlıca nedeni olmaya devam etmektedir (Arthur et al., 2020).

Akciğer kanseri, tümörün oluştuğu yere göre periferik ve santral olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlar;

1. Periferik yerleşim, akciğer kanserlerin % 42'lik kısmını oluşturur, oluşan kitleler her boyutta olabilir, segmentlerinin kökeni bronşlardan gelmekte ve ilk başta 1-3 cm arası sınırları belli yuvarlak şekilde nodüllerden oluşmaktadır.
2. Santral yerleşim, bronş içi veya perihiler kitle olarak görünür, bronş içinde bulunduğu bronş duvarında kalınlaşma, polipoid lezyon, lümen daralması gibi bulgular ile hastalık teşhisi yapılır (Balcı & Altay, 2014)

Akciğer kanseri etiyolojisinde en büyük pay sigaraya düşse de çevresel faktörler (radyoizotoplar, aromatik hidrokarbonlar, nikel, krom, formaldehitler vb.), genetik faktörler, yaş, cinsiyet, tüketilen gıdalar tetikleyici olarak bilinmektedir (Günbatar et al., 2012).

Akciğer kanseri 2 ana grupta toplanır. Bu iki grup ise küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olarak isimlendirilir (Işıtmangil, 2013).

2.3.1 Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), akciğer kanseri vakalarının % 80'lik kısmı oluşturmaktadır. KHDAK tanısı konmuş hastaların genellikle evre 3 (lokal ileri) ve evre 4 (metastatik) safhalarında dır. KHDAK için tedavi yöntemini seçmek büyük önem taşır. Erken evrelerde tanısı konan hastalık için cerrahi müdahale uygulanır. İleri evrelerde ise kemoterapi ve radyoterapi tedavileri uygulanır. Bu hastalarda sağkalım oranı çok düşüktür ve durumları kötüdür (Balta et al., 2013; Ceylan et al., 2009).

2.3.2 Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

Akciğer kanserlerinin % 15'ni küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) oluşturmaktadır. KHAK solunum yolu ve sindirim sisteminde ikinci bir tümör oluşmasına yüksek oranda neden olmaktadır. Tedavisi için kemoterapi ve radyoterapi birlikte kullanılması uzun bir sağkalım elde edilebilmektedir. Tedaviden sonra sağ kalım oranı 2 yıl için % 30' dur. Fakat bu tedavi olma sırasında ikinci primer tümör oluşma riski çok fazladır (Başoğlu et al., 2013; Ergen et al., 2015).

KHAK'nın, ikinci primer oluşumunun hızlı olması, uzak metastaza erken ulaşması, kemoterapiye ve radyoterapiye dramatik yanıtlar vermesinden dolayı KDHAK'dan farklılıkları vardır (Ergen et al., 2015).

2.3.3 Akciğer kanserinin epidemiyolojisi

Kanser, 2020 yılında yaklaşık olarak 10 milyon ölümün nedeni olarak bilinmektedir. Akciğer kanseri ise 2020’de en fazla vaka sıralamasında 2.21 milyon ile 2. sırada, en fazla ölüm sıralamasında 1.80 milyon ile 1. sırada yerini almaktadır (Sung et al., 2021).



3. MATERYAL-METOT

3.1 Kullanılan Materyaller

3.1.1 Aletler ve cihazlar

Hücre kültürü çalışmaları, hücre proliferasyon çalışmaları, flow sitometri (akan ölçer) ile apoptozis yöntemi, MTS testi ve yağ asitlerinin belirlenmesi deneyleri için kullanılan aletler ve cihazlar çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 3. 1: Çalışmada kullanılan ekipmanlar

μ-Plate 96 Well Black
GC-2010 Plus Gaz Kromatografisi
İnkübatör
Su Banyosu
+40 °C, + 20 °C, -20 °C ve -80 °C Derin Dondurucuları
Laminar Akışlı Kabin
Hassas Terazı
İnverted (Ters) Mikroskop
Pipet (Pipet Takımı, serolojik pipet ve Pipetör)
Vorteks
Kültür şişeleri (Plastik Flakslar)
Plastik Santrifüj (Falkon, eppendorf) Tüpü
Spektrometre

3.1.2 Kimyasal maddeler

Hücre kültürü çalışmaları, hücre proliferasyon çalışmaları, flow sitometri (akan ölçer) ile apoptozis yöntemi, MTS testi ve yağ asitlerinin belirlenmesi deneyleri için kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3. 2: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Marka
Besiyer	PAN High glucose DMEM besiyeri (L glutamin içeren)
Fetal Bovin Serum (FBS)	PAN Heat inactivated FBS
Tripsin-EDTA	PAN % 0,25 Tripsin-EDTA
Kaspaz	G7790 Promega Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay kit
n-Hekzan	Sigma
Potasyum Hidroksit (KOH)	Sigma
Yağ asitleri standardı	Supelco Fame Mix 37

3.1.3 Hücre hatları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen hücre hatları çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 3: Hücre kültüründe kullanılan hücre hatları

Hücre Adı	Kategorisi	Firma
A549	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Dizisi	ATCC (CCL-185™)
BEAS-2B	İnsan Akciğer Hücre Dizisi	ATCC (CRL-9609™)

3.1.4 Besiyerler ve solüsyonları

Kenevir tohumu yağının eldesi

Kenevir tohumu yağı soğuk sıkım yöntemiyle elde edildi. Bu yöntemin yapılması için ilk önce kenevir tohumları 30 °C 'de kurutuldu. Kuruyan tohumların yağını çıkarabilmek için öğütüldü. Öğütme işleminin ardından preslenerek (soğuk pres) elde edilen yağ 2 ile 7 gün arasında dinlenmeye bırakıldı. Dinlenen yağda oluşan partiküller bez filtreden geçirilerek berrak bir hale getirildi. Elde edilen berrak yağ analizlerde kullanılmak üzere 20 °C'de saklandı (Şekil 3.1) (Aladić et al., 2014; Jian et al., 2018).



Şekil 3. 1: Soğuk pres yöntemiyle elde edilen kenevir tohumu yağı

Kenevir tohumu yağının konsantrasyonun hazırlanılması

Kenevir tohumundan elde edilen saf yağın hücre hatları üzerindeki etkileri incelenmesi için DMSO içinde kenevir tohumu yağı çözündürülerek 100 mg/ml konsantrasyon hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4: 100 mg/ml konsantrasyonun hazırlanması için kullanılan değerler

Kenevir Tohumu Yağı	0,1 gr
DMSO	1 ml

Kültür ortamı için hazırlanılan besiyer

Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri (DMEM) (L glutamin içeren) içerisine, % 10 fetal bovin serum (FBS) ve antibiyotik çözeltisi eklenerek hücre kültürü için gerekli besiyer hazırlandı.

3.2 Metotlar

3.2.1 Hücre kültürü çalışmaları

Hücre hatlarının çözündürülmesi

Çalışmada kullanılacak, % 10 DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve % 1 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Besiyer) dondurma besiyerinde bulunan A549 ve BEAS-2B hücre hatları -80 °C dondurucudan çıkartılarak, 37 °C su banyosunda çalkalanarak 1-2 dakika içinde çözündürme işlemi uygulandı. Hücre hatları çözüldükten sonra, hücre hatlarının içinde bulunduğu eppendorf tüplerine % 70 etanol püskürterek dekontamine edildi. Laminar akışlı kabinde, eppendorf tüpündeki hücre hatları serolojik pipet ile içinde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Besiyer) bulunun falkon tüplerine alındı. Falkon tüpleri 15 dakika 1500 RPM'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkon tüplerinin süpernatant kısmındaki DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve DMEM hücrelere zarar vermemesi için ortamdan uzaklaştırıldı, pellet kısmındaki hücre hatları ise kullanılmak üzere falkon tüpünde bırakıldı (İsan et al., 2016).

Falkon tüpünde kalan hücre hatlarının devamlılığını sürdürmek için, üzerine DMEM besiyerinden 5 ml kadar eklenerek pipetaj yapıldı. Falkon tüpündeki DMEM ve hücreler, T-25 cm²'lik kültür şişelerinin içine aktarıldı. Kültür şişeleri, 37 °C, % 95 nem ve % 5 CO₂'e (karbondioksit) ayarlı inkübatöre yerleştirildi (İsan et al., 2016).

Kültür şişelerinde hücrelerin, devamlılığı ve çalışma için yeterli yoğunla erişene kadar 2-3 günde bir pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama için kültür şişelerinde besiyer uzaklaştırıldı ve daha sonra şişelerin tabanında kalan hücreler 2 ml'lik PBS (Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)) ile yıkandı. Kültür şişelerinin tabanına yapışkan halde bulunan hücreleri kaldırma işlemi için Tripsi-EDTA şişelere ilave edilerek 2-3 dakika 37 °C'de bekletildi ve kültür şişesine tutunan tüm hücreler tamamen kalkması sağlandı. Daha sonra hücreler kültürü şişelerine taze besiyer eklenerek 37 °C, % 95 nem ve % 5 CO₂'e ayarlı inkübatöre yerleştirildi (İplik & Çakmakoglu, 2020).

Bu çözündürme ve pasajlama işlemi sırasıyla, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilen A549 ve BAES-2B hücre hatları için yapıldı.

Hücre kültürü

A549 ve BAES-2B hücre kültürlerinin, 24 saat aralıklarıyla hücreler inverted mikroskobunda morfolojik yapıları ve yoğunlukları incelendi. Kültür şişelerinin tüm yüzeyi hücreler ile kaplanana kadar kültür şişelerindeki besiyer değiştirildi. Tüm yüzey alanı hücrelerle kaplanmasıyla serolojik pipet ile kültür şişelerindeki besiyer aspire edildi. Kültür şişelerinde kalan kültür ortamındaki, hücresel atıklar ve kalan besiyer atıkları uzaklaştırmak için PBS ile yıkandı. PBS ile yıkamadan sonra kültür şişelerinin yüzeylerinde yapışkan bir şekilde kalan hücre hatlarını kaldırmak için hücre kültürü şişelerine 1 ml tripsin-EDTA (% 0.05 tripsin & % 0.02 EDTA) eklenerek çalkalandı. Tripsin-EDTA içinde bulunan kültür şişeleri inkübatörde yaklaşık 2-3 dakika bekletildikten sonra taban yüzeylerine yapışmış hücre kalmadı. Kültür şişelerindeki hücre hatları içerisinde DMEM eklenmiş falkon tüplerine alınarak 1500 RPM'de 15 dk santrifüj edildi ve falkonun süpernatant kısmı atıldı. Falkon tüplerinde kalan pellet kısmına DMEM eklenerek farklı kültür ortamlarında kullanılmak için hazır hale getirilmiş oldu (Şalva, 2019).

3.2.2 Hücre proliferasyon analizi

A549 ve BEAS-2B hücre hatları, 1×10^4 hücre yoğunluğuna ulaştıklarından sonra hücreler, DMEM ile 100 μ l kuyucuklu 96'lı kültür plaklarına (μ -Plate 96 Well Black) ekimi yapıldı. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plaklar, 37 $^{\circ}$ C, % 95 nem ve % 5 CO₂'e ayarlı inkübatörde 24 saat bekletilerek hücrelerin plakların yüzeyine yapışması beklendi. 24 saatin sonrasında 96 kuyucuklu plakta bulunan kontrol grubu kuyularına sadece hücre ve DMEM, pozitif kontrol grubu kuyularında ise hücre, DMEM ve DMSO, deney grubu olan kuyularında da hücre, DMEM ve 100 mg/ml'lik stok konsantrasyonundan sırasıyla 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml kenevir tohumu yağı solüsyonu aktarıldı ( izelge 3.5 ve  izelge 3.6). Hazırlanılmış plaklar 37 $^{\circ}$ C'lik inkübatöre yerleştirildi (Citti et al., 2019; Petrovici et al., 2021).

Çizelge 3. 5: μ -Plate 96 Well Black plakların da, A594 hücre hatları üzerinde kullanılan konsantrasyonlar

Plak sütunları	Konsantrasyonlar
Normal Kontrol grubu	A594 hücre hatları DMEM besiyeri
Pozitif kontrol grubu	A549 hücre hatları DMEM besiyeri DMSO
1. Deney grubu	A549 hücre hattı DMEM besiyeri 1 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
2. Deney grubu	A549 hücre hattı DMEM besiyeri 5 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
3. Deney grubu	A549 hücre hattı DMEM besiyeri 10 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
4. Deney grubu	A549 hücre hattı DMEM besiyeri 25 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
5. Deney grubu	A549 hücre hattı DMEM besiyeri 50 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu

Çizelge 3. 6: μ -Plate 96 Well Black plakların da, BAES-2B hücre hattı üzerinde kullanılan konsantrasyonlar

Plak sütunları	Konsantrasyonlar
Normal Kontrol grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri
Pozitif kontrol grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri DMSO
1. Deney grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri 1 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
2. Deney grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri 5 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
3. Deney grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri 10 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
4. Deney grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri 25 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu
5. Deney grubu	BEAS-2B hücre hattı DMEM besiyeri 50 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonu

3.3 *In Vitro* Çalışmada Kullanılan Testler

3.3.1 MTS testi

Sitotoksosite ve proliferasyon testlerinde canlı hücreleri analiz etmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntem olan, Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Hücre Proliferasyon Testi kullanıldı. CellTiter 96[®] AQueous One Solution, tetrazolyum bileşiği (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxy phenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H- tetrazolium, inner salt (iç tuz); MTS) ve elektron birleştirme reaktifi (fenazin etosülfat; PES) solüsyonlar içerir. MTS tetrazyum bileşiğinin çalışma prensibi, hücre kültürü ortamında çözünerek renkli formazan ürüne indirgenmesi ile oluşan rengin ölçülmesine dayanır. Bu indirgenme olayı, aktif hücrelerden dehidrogenaz enziminin ürettiği NADPH ve NADH aracılığıyla gerçekleştirir. MTS yönteminde canlı hücre sayısını belirlemek için plak okuyucu spektrometrede 490 nm absorbans değeri ile ölçülür.

96 kuyucuklu plaklarda MTS tetrazyom bileşiği kullanılmadan önce kuyucuklardaki besiyer uzaklaştırıldı. Uzaklaştırma nedeni ise besiyerin fenol kırmızı içeriğinin absorbans değerini etkilemesini önlemektir.

Cell Titer 96[®] AQueous One Solution hücre proliferasyon testi üretici tarafından belirlenen protokole uygun kullanıldı. İlk olarak, -20 °C'lik dondurucudan çıkarılan solüsyon oda sıcaklığında 90 dk (37 °C su banyosunda 10 dakika) bekletilerek çözünmesi sağlandı. 96 kuyucuklu plakların her kuyucuğuna, solüsyon reaktifinden 20 µl pipetlendi. Pipetle plaka 37 °C, % 5 CO₂ atmosferde 4 saat inkübatörde bekletildi. 4 saatin sonunda inkübatörden çıkarılan plaklar, plak okuyucu spektrometrede 490 nm absorbans da okuması yapıldı (Riss et al., 2016).

3.3.2 Flow sitometri (akan ölçer) ile apoptozis yöntemi

Flow sitometri (akan hücre ölçer) cihazı yaygın olarak, onkoloji, immünoloji, mikrobiyoloji gibi alanlarda kullanılmakta olup bu cihaz boyalar ile işaretlenmiş süspansiyonların içinde bulunan hücrelerin lazer ışıkların önünden geçerek yaydıkları sinyalleri fotodedektörler yardımıyla toplanarak analiz edilmesi prensibine dayanır. Akan hücre ölçer cihazı sayesinde hücrelerin sayısını, çoğalmasını, proliferasyonu gibi hücreler için birçok özellik hakkında bilgi verebildiği için kullanıldı (Gelmez & Deniz, 2020).

A549 hücrelere uygulanan 10 mg/ml ve 25 mg/ml konsantrasyonlarındaki hücreler üzerinde hücre ölümü açısından nasıl bir etki oluşturduğunun gözlemlenmesi kapsamında, apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğine dair bir delil sunan ve hücre ölümü sebebiyle hücrelerin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserin moleküllerine bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesine imkan sağlayan FITC ile konjuge olabilen Annexin V ve PI boyama yöntemleri kullanılmıştır. Elabscience Annexin V-FITC/ PI apoptoz belirleme kit protokolüne göre bütün aşamalar izlenerek protokole uygun olarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

A549 hücre hattı için kontrol grubu hücreleri ve belirlenen konsantrasyonlarda (10 mg/ml ve 25 mg/ml) uygulanan hücrelerin mikroskop altında kontrolleri ardından hücrelerin toplanmasına geçildi. Hücrelerin üzerinde bulunan besiyerleri, kontrol grubu hücreleri ve konsantrasyonlar (10 mg/ml ve 25 mg/ml) uygulanan hücreler için ayrı olarak isimlendirilmeleri yapılan falkon tüpleri hazırlandı. Hücre kültür şişelerinin yüzeyinde bulunan hücrelere 1 ml tripsin/EDTA ile muamele edildi. Bir süre beklemenin ardından hücrelerin kalkma durumlarına mikroskopla bakıldı ve hücrelerin kaldırılmasıyla falkon tüpler santrifüje alındı. 300 g'da 5 dakika santrifüj sonrası, supernatant uzaklaştırıldı ve pellet halinde bulunan hücrelerin PBS ile yıkanması işlemine geçildi. PBS ile hücrelerin yıkanması iki kez yapıldı ve hücreler supernatanttan arındırdıktan sonra hücrelerin üzerine 500 µl Annexin V Binding çalışma solüsyonu eklendir. Ardından kültürü şişelerindeki (kontrol grubu ve deney grupları (10 /mg/ml ve 25 mg/ml)) hücrelerin üzerine 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI boyası eklendi ve 15 dk inkübatörde bekletildikten sonra akan ölçer cihazı ile ölçümü ve analizi yapıldı (BD Biosciences, USA) (Aljadani et al., 2020).

3.4 İstatistiksel Değerlendirme

In vitro olarak gerçekleştirilen hücre proliferasyon deneylerinde sitotoksik etki sonuçları değerlendirmesinde, kenevir tohumu yağının, A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki etkileri *Student t* testi kullanıldı. Analiz sonucunda bulunan *p* değerleri 0,05'den küçük ($p < 0,05$) olduğunda deney sonucu istatistik olarak anlamlı kabul edildi (Ruxton, 2006).

3.5 Kenevir Tohumu Yağın Yağ Asitlerinin Belirlenmesi

Kenevir tohumu yağının kromatografik analiz için hazırlanması

Kenevir tohumu yağı 20 °C'den çıkarılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek kullanılmaya başlandı. Kenevir tohumu yağından 0.1 gr yağ 15 ml'lik falkon tüpüne alındı. Falkon tüpüne 10 ml n-hekzan eklendi. Kapak kapatılarak kuvvetlice vortekste çalkalandı. Çalkalanmadan sonra üzerine 0.5 ml 2 N metanol içeren KOH çözeltisi eklendi. Kapak kapatılarak tekrar kuvvetlice vortekste karıştırıldı. Üst faz berrak olana kadar bekletilerek (1-2 saat, karanlık ortamda bekletilmeli) kromatografik kullanıma hazır hale gelmiş oldu (Decorti et al., 2015).

Gaz kromatografi analizi

Yağ asitleri kompozisyonu kromatografik cihazlarla belirlenmesinde genel olarak Gaz Kromatografi-Alev İyonlaştırma Dedektörü (GC-FID) enstrümental analiz sistemi kullanıldı. Kenevir tohumu yağının, yağ asidi analizleri için önceden soğuk sıkım yöntemiyle elde ettiğimiz ve metil esterleri türevine dönüştürdüğümüz yağ örneği karanlık ortam da 1-2 saat aralığında bekletilmesi sonucu üst fazda kalan berrak kısım manuel olarak, 2 ml'lik renkli (amber) vial enjektör ile GC kolon sistemine transfer edildi (Da Porto et al., 2012).

Esansiyel yağ asitlerini belirlemek için kullanılan kromatografik cihazımız ve gaz kromatografi cihazın çalışma koşulları çizelge 3.7'de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3. 7: Gaz Kromatografi sisteminin çalışma koşulları

Sistemler	Çalışma Koşulları
Analiz İçin Kullanılan Cihaz	GC-2010 Plus
Kolon	JW scientific DB 23 (30m x 0.25 mm id x 0.25µm film kalınlığı)
Dedektör	FID
Enjektör Hacmi	1 µL
Enjeksiyon Sıcaklığı	250 °C
Taşıyıcı Gaz	Helyum (He)
Akış Oranı	0.9 mL/dk
Enjeksiyon Modu	Split
Split Oranı	1:100

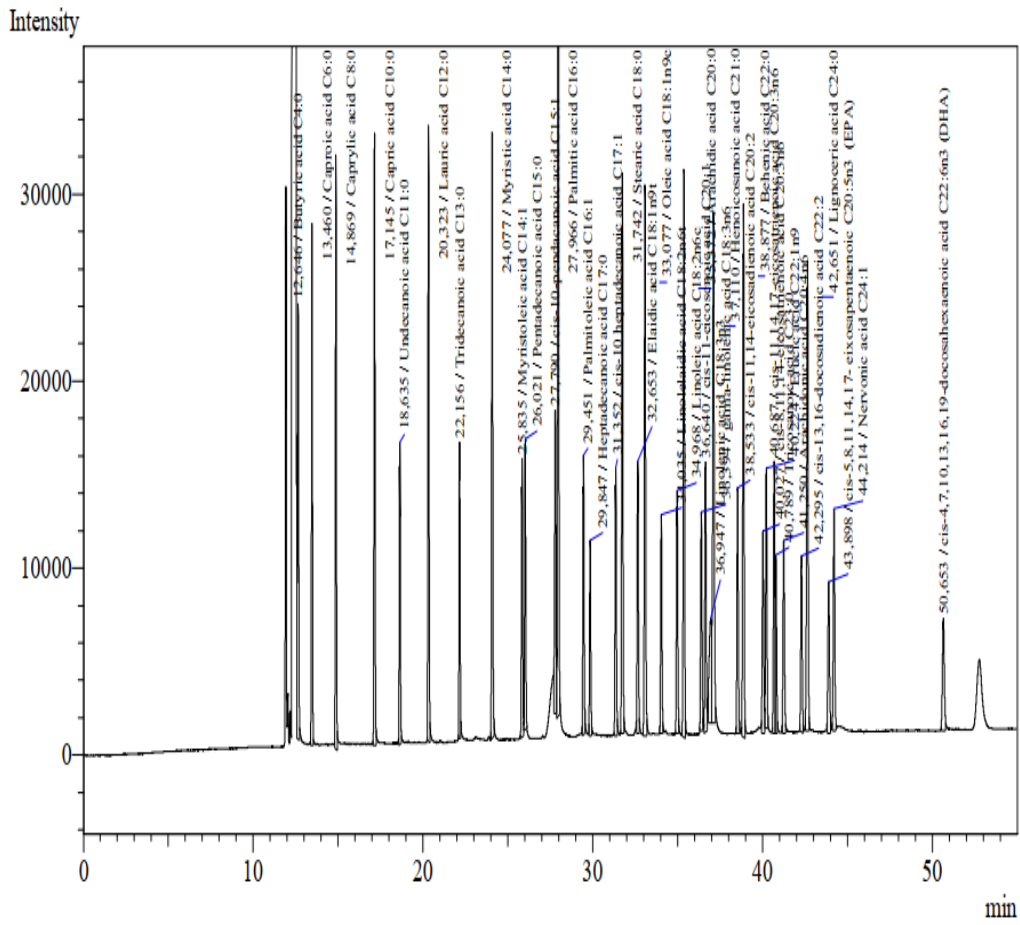
Manuel olarak kolona enjekte edilen vialenin içindeki yağ damlacıkları kolonlardan helyum gazı sayesinde hızla geçebilmektedir. Kenevir tohumu yağındaki, yağ asitlerinin belirlemek için sistem de belli sıcaklıklara maruz kalınmaktadır. Kullanılan GC'deki sistemlerin ulaşabildiği maksimum değerler çizelge 3.8'de belirtilmiştir.

Çizelge 3. 8: GC-2010 Plus Enstrümental sistemin sıcaklık programları

Sistem Sıcaklığı	Derecesi
Enjektör Bloğu Sıcaklığı	230 ⁰ C
Kolon Sıcaklığı	140 °C 5 dk, sonrasında 4 °C/dk 240 °C'ye ulaşıldı ve bu sıcaklıkta 15 dk bekletildi
Dedektör Sıcaklığı	240 ⁰ C

GC sisteminde metil esterli yağ asitleri analizi için trans-cis, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini de içeren 37'lik standart bir mix tercih edilmektedir. Yağ asit kompozisyonunun hesaplaması için kullanılan örneğimiz “Supelco Fame mix 37” standardıdır. Bu mix’den elde edilen GC-FID kromatogramının 37 yağ asidi bileşeninin alan dağılımı bulunmaktadır (Çizelge 3.9)(Şekil 3.2).

Esansiyel yağ asitlerinin belirlenmesi ise yağ asidi metil ester kompozisyonu yüzde (%) alan cinsinden yapılmıştır. Hesaplama 37 yağ asidi bileşeninin alan dağılımı referans alınarak karşılaştırma yapıldı.



Şekil 3. 2: ‘Supelco Fame mix 37’ standart karışımı için elde edilen GC-FID kromatogramı

Çizelge 3. 9: ‘Supelco Fame mix 37’ standart karışımında bulunan yağ asitleri, alıkonma zamanları ve miktarları

Sırası	Çıkış Süresi (dk)	Alan	Yoğunluğu	Formül Adı	Yağ Asiti
1	12,646	106040	23244	C4:0	Bütirik Asit
2	13,460	107276	27851	C6:0	Kaproik Asit
3	14,869	123431	31644	C8:0	Kaprilik Asit
4	17,145	132987	32668	C10:0	Kaprik Asit
5	18,635	67843	16094	C11:0	Undekanoik Asit
6	20,323	139319	32850	C12:0	Laurik Asit
7	22,156	67320	15786	C13:0	Tridekanoik Asit
8	24,077	142414	32344	C14:0	Miristik Asit
9	25,835	68210	14831	C14:1	Miristoleik Asit
10	26,021	67857	15532	C15:0	Pentadekanoik Asit
11	27,790	81049	16151	C15:1	cis-10-pentadekanoik Asit
12	27,966	225088	48513	C16:0	Palmitik Asit
13	29,451	70429	14905	C16:1	Palmitoleik Asit
14	29,847	47771	10407	C17:0	Heptadekanoik Asit
15	31,352	71876	14320	C17:1	cis-10-heptadekanoik Asit
16	31,742	146321	29939	C18:0	Stearik Asit
17	32,653	73540	14499	C18:1n9t	Elaidik Asit
18	33,077	148076	29412	C18:1n9c	Oleik Asit
19	34,035	58960	11690	C18:2n-6t	Linolelaidik Asit
20	34,968	66897	12920	C18:2n-6c	Linoleik Asit
21	35,372	151739	30202	C20:0	Araşidik Asit
22	36,394	62523	11690	C18:3n6	Gama-linoleik Asit
23	36,640	73396	14417	C20:1	cis-11-eikosenoik Asit
24	36,947	54661	5601	C18:3n3	Linolenik Asit
25	37,110	170615	27248	C21:0	Henoikosanoik Asit
26	38,533	69642	13079	C20:2	cis-11,14-eikosadienoik Asit
27	38,877	152263	28488	C22:0	Behenik Asit
28	40,027	62162	10792	C20:3n6	cis-8,11,14-eikosadienoik Asit
29	40,224	72308	13888	C22:1n9	Erusit Asit
30	40,687	77160	14507	C20:3n3	cis-11,14-17-eikosatrinoik Asit
31	40,789	51074	9493	C23:0	Trikozanoik Asit
32	41,250	61309	10287	C20:4	Arakidonik Asit
33	42,295	53287	9375	C22:2	cis-13,16-dokosadienoik Asit
34	42,651	149039	25105	C24:0	Lignoserik Asit
35	43,898	51542	8079	C20:5n3	cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenoik Asit
36	44,214	69520	11876	C24:1	Nervonik Asit
37	50,653	46593	5938	C22:6n3	cis-4,7,10,13,16,19-dokosahekzaenoik Asit

4. BULGULAR

4.1 Hücre Proliferasyon Bulguları

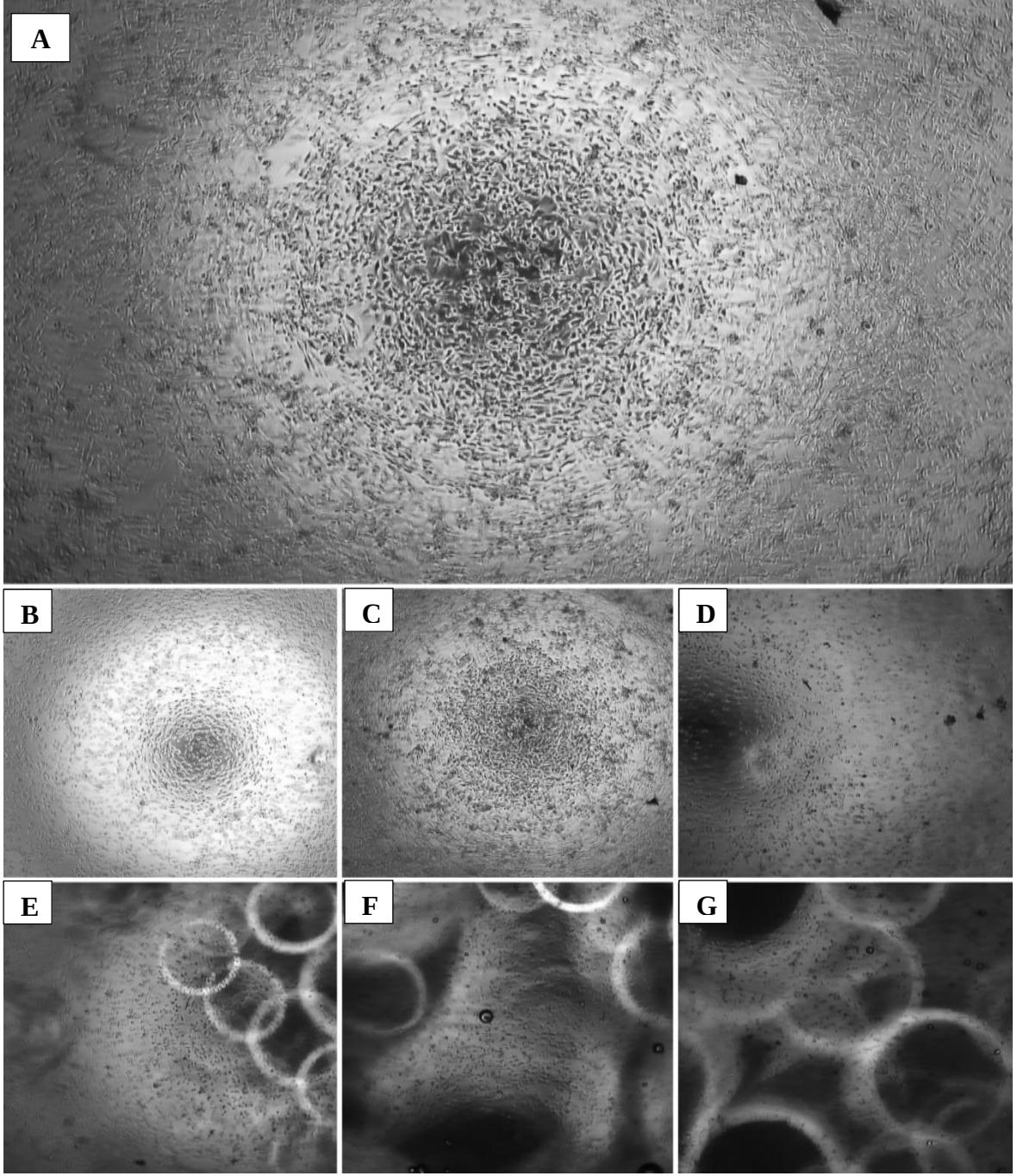
Bu *in vitro* çalışmada A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına uygulanacak kenevir tohumu yağının uygulanacağı maksimum konsantrasyonu belirlemek için plaklara 50 ug/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml konsantrasyonları eklenerek, bu üç derecelendirme arasında hücrelerin canlılıkları üzerindeki etkisine bakıldı ve ciddi bir etkisi olmadığı görüldü. Bu sonuç üzerine kenevir tohumu yağının yüksek konsantrasyonlarda kullanmamaya karar verildi.

Çalışmamızda kullanılacak konsantrasyon dereceleri 1 mg/ml ile 50 mg/ml arasındaki konsantrasyonları olarak karar verilerek deney grupları hazırlanmıştır. Böylelikle A549 ve BEAS2 hücrelerinin bu konsantrasyonlarda canlı hücrelerin yüzdelik olarak hesaplanabilmesi için MTS testi yapılmıştır.

4.1.1 A549 hücre proliferasyonundaki değişimler

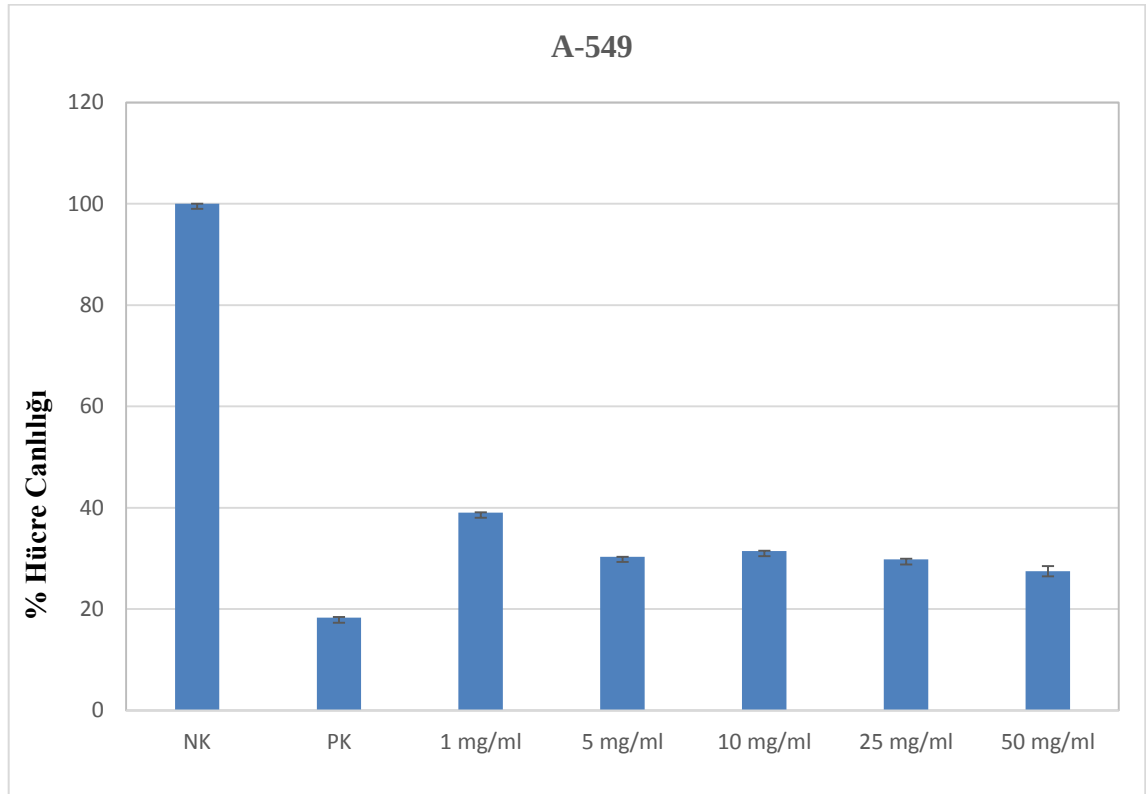
A549 hücreleri 3.2.2’de belirtildiği gibi 96 kuyucuklu plaklara ekimi yapıldıktan sonra, inkübatörde 24 saat inhibe edilen hücreler inverted mikroskopla morfolojisi incelendi (Şekil 4.1). İnceleme sonrasında hücrelerin proliferasyonun test etmek için MTS testinden elde edilen veriler yüzdelik olarak hesaplanmıştır.

A549 hücreleri 3.3.1’de anlatılan yöntem izlenerek MTS testi için hazırlandı. 20 µl CellTiter 96® AQueous One Solutionu eklenen 96 kuyucuklu plaklar 4 saat inkübatörde bekletildikten sonra plak okuyucudan 490 nm’de alınan absorbans değerlerini 7 farklı konsantrasyon ortamı için hücre canlılığı yüzdelik olarak hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4. 1: Normal kontrol (A), pozitif kontrol (B), 1 mg/ml (C), 5 mg/ml (D), 10 mg/ml (E), 25 mg/ml (F), 50 mg/ml (G) plaklarının inverted mikroskopunda görünümü.

Şekil 4.2’de gösterilen verilere göre, normal kontrol (NK) grubundaki hücre canlılığı referans olarak kabul edilerek yüzdeliği % 100 olarak belirlendi. Referansa esas alındığında pozitif kontrol (PK) grubumuzda hücre canlılığı % 18, deney grupları (mg/ml) konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı oranları ise; 1. Deney grubunda (1 mg/ml) % 39; 2. Deney grubunda (5 mg/ml) % 30; 3. Deney grubunda (10 mg/ml) % 31; 4. Deney grubunda (25 mg/ml) % 29 ve 5. Deney grubunda (50 mg/ml) % 27 olarak ölçülmüştür.

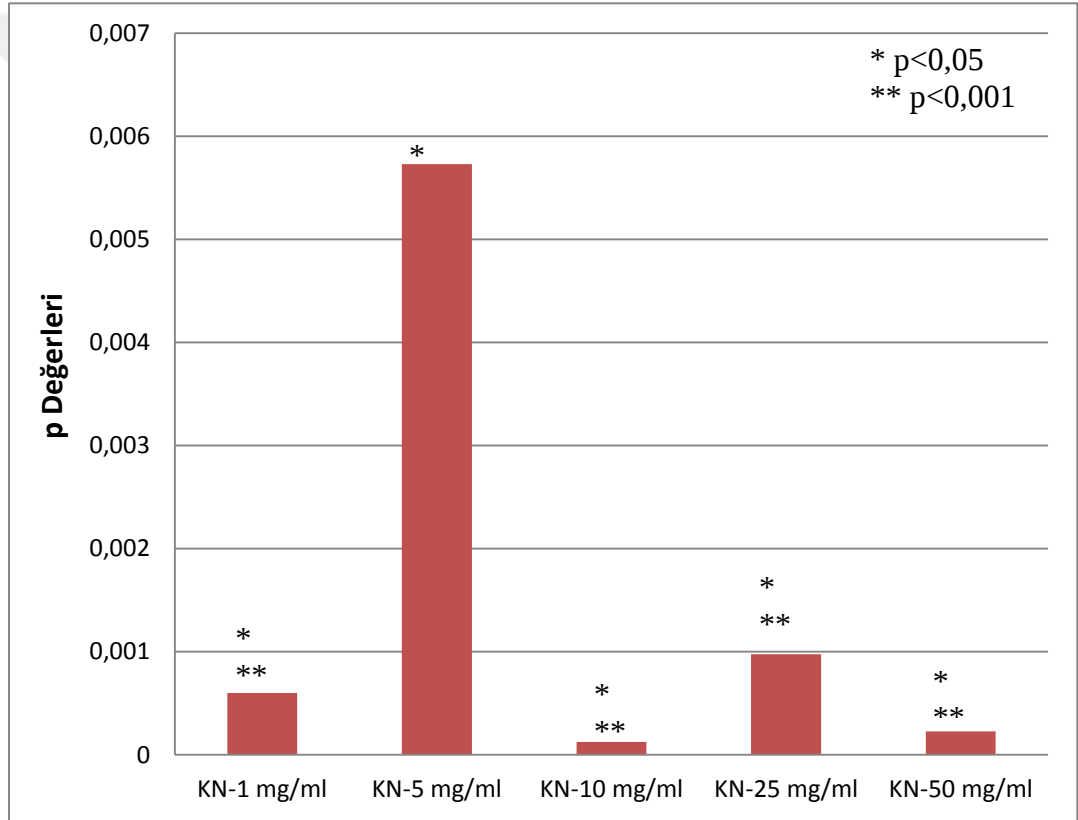


Şekil 4. 2: Kenevir tohumu yağı ekstresinin A549 hücrelerin proliferasyon etkisi (% büyüme inhibisyonu)

A549 hücre hatlarının üzerine uygulanan, normal kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu ölçümlerine bakıldığında hücrelerimizin, normal koşullar altında çalıştığı ve DMSO gibi kanser hücrelerinin canlılığını azaltan bir bileşikle muamele edildiği takdirde canlı hücre sayılarında ciddi bir azalma olduğu görülmektedir. Deney gruplarına bakıldığında kullanılan kenevir tohumu yağı konsantrasyonun oranı arttıkça (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml), canlı hücre oranının yüksek oranda azaldığı saptanmıştır.

A549 hücre hatlarının proliferasyonunda oluşan azalmalar istatistiksel olarak *Student t* testi yardımıyla incelenmiş ve bulunan oran (*p* değeri) 0,05’den küçük olanlar

anlamli kabul edildi (Şekil 4.3). İstatistiksel olarak A549 hücre proliferasyonundaki düşüşlerin anlamlılığını hesaplamak için deney grupları (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) ile kontrol grubu oranları kıyaslanmıştır. Bütün deney grupları, kontrol grubu kıyaslanması istatistiksel olarak $p < 0,05$ değerine göre anlamlı olduğu bulunmuştur. 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml deney grupların daki p değerleri değerlerin ise 0,001' den düşüktür. Bu deney gruplarının (1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) $p < 0,001$ olması çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark oluşturduğu anlamına gelmektedir. A549 akciğer kanser hücresine, kenevir tohumu yağı konsantrasyonların sitotoksik etki yaptığı görülmüştür. Bu bulgulara bakılarak akciğer kanser hücrelerinin canlılıklarını azaltmaya yönelik olumlu bir yanıt verdiği kesinleşmiştir.



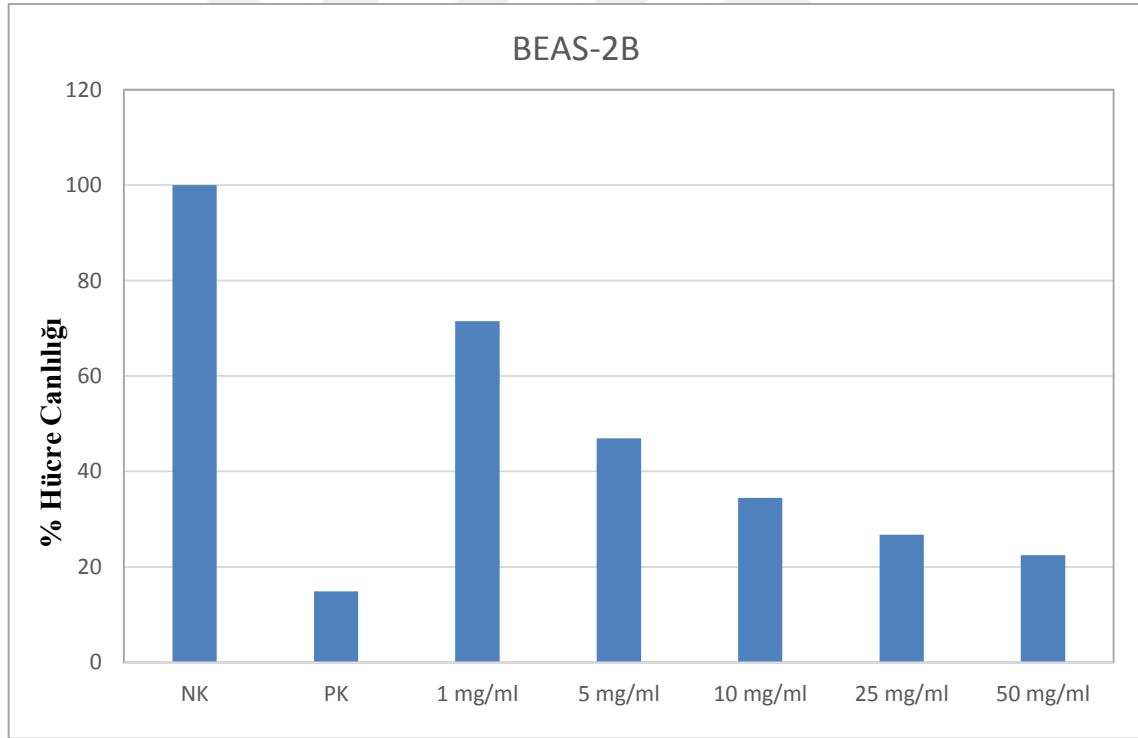
Şekil 4. 3: A549 hücre hattına uygulanan konsantrasyonların kontrol grubuna bakılarak student t testine göre anlamlılık istatistiği (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ olarak kabul edilmektedir)

4.1.2 BEAS-2B hücre proliferasyonundaki değişimler

BEAS-2B hücrelerinin 3.2.2'de belirtildiği gibi 96 kuyucuklu plaklara ekimi yapıldı. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plakalar, inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra

inverted mikroskobu ile morfolojisi incelendi. Daha sonra, *in vitro* çalışması için 3.3.1’de anlatılan prosedür izlenerek MTS testi için 96 kuyucuklu plakları hazırlandı. 20 µl CellTiter 96® AQueous One Solutionu eklenen 96 kuyucuklu plaklar 4 saat inkübatörde bekletildikten sonra plak okuyucudan 490 nm’de alınan absorbans değerinde 7 farklı konsantrasyon ortamlarında bulunan BEAS-2B hücrelerin canlılığının yüzdelik oranları hesaplanmıştır (Şekil 4.4).

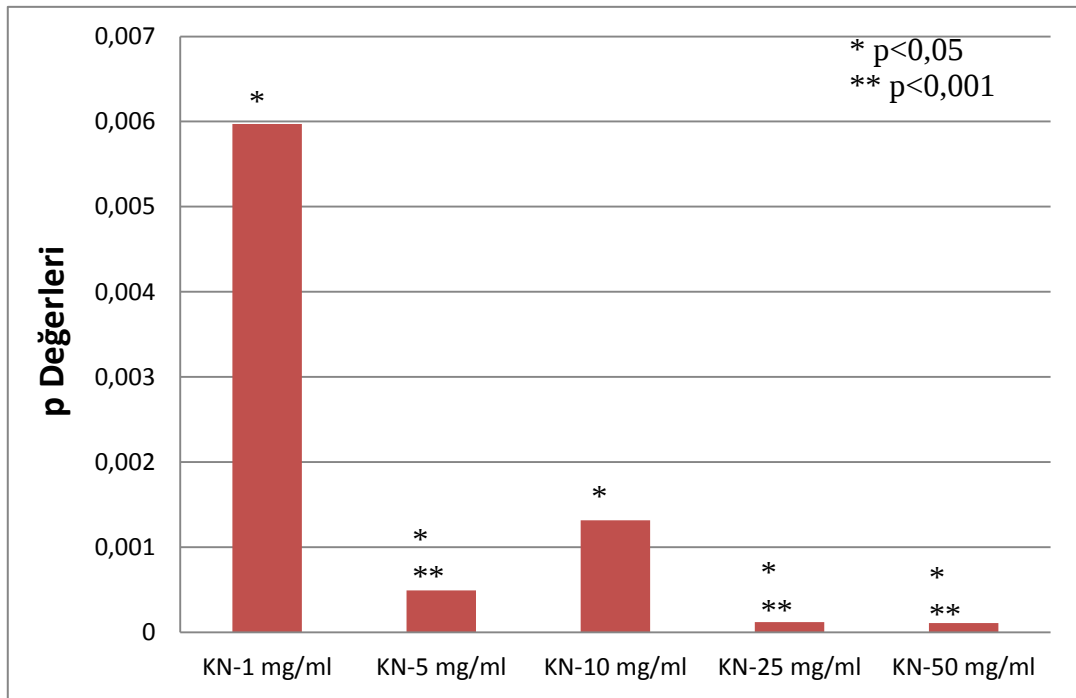
Şekil 4.4’de elde edilen verilere göre, normal kontrol (NK) grubundaki hücre canlılığı referans olarak kabul edilerek yüzdeliği % 100 olarak belirlendi. Referans değerine bakılarak, pozitif kontrol (PK) grubumuzda hücre canlılığı % 14, deney gruplarında (mg/ml) konsantrasyonlarındaki hücre canlılığı oranları ise; 1. Deney grubunda (1 mg/ml) % 71; 2. Deney grubunda (5 mg/ml) % 46; 3. Deney grubunda (10 mg/ml) % 34; 4. Deney grubunda (25 mg/ml) % 26 ve 5. Deney grubunda (50 mg/ml) % 22 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4. 4: Kenevir tohumu yağı ekstresinin BEAS-2B hücrelerin proliferasyon etkisi (% büyüme inhibisyonu)

BEAS-2B hücre hatlarının üzerinde uygulanan tedavide, normal kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu verileri incelendiğinde, hücrelerin normal koşullar altında çalıştığı ve DMSO gibi kanser hücrelerini etkisi azaltan bir bileşikle muamele edildiği takdirde canlı hücrelerin sayılarında ciddi bir azalma görülmüştür. Deney gruplarına uygulanan konsantrasyon oranı arttıkça (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml), canlı hücre oranının azaldığı görülmektedir.

BEAS-2B hücre hatlarının proliferasyonunda oluşan azalmalar istatistiksel olarak *Student t* testi yardımıyla incelenmiş ve bulunan oran (*p* değeri) 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edildi (Şekil 4.5). İstatistiksel olarak BEAS-2B hücre proliferasyonundaki düşüşlerin anlamlılığını hesaplamak için deney grupları (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) ile kontrol grubu oranları kıyaslanmıştır. Bütün deney grupları (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) istatistiksel olarak $p < 0,05$ değerine kıyasla anlamlı bulunmuştur. 5 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml deney grupları *p* değerlerinin 0,001' den düşük olduğu bulunmuştur. Bu deney gruplarının (5 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) $p < 0,001$ olması çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark oluşturduğu anlamına gelmektedir. BEAS-2B sağlıklı akciğer hücresine, kenevir tohumu yağı konsantrasyonların sitotoksik etki yaptığı görülmüştür.

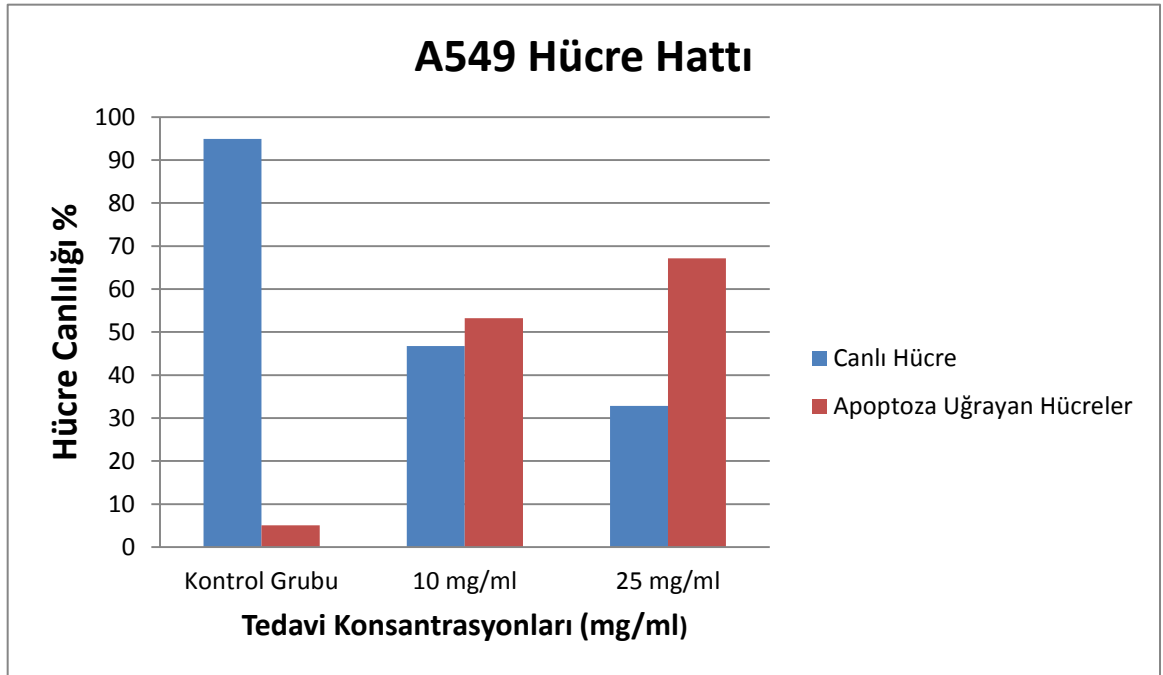


Şekil 4. 5: BEAS-2B hücre hattına uygulanan konsantrasyonların kontrol grubuna bakılarak student t testine göre anlamlılık istatistiği (* $p < 0.05$ ve ** $p < 0,001$ olarak kabul edilmektedir.)

4.2 Flow Sitometri (Akan Ölçer) ile Apoptozis Bulguları

A549 hücre hattına uygulana 10 mg/ml ve 25 mg/ml konsantrasyonlarındaki hücre canlılığının azalmasının, Elabscience Annexin V-FITC/ PI apoptoz belirleme protokolüne uygun yöntemi uygulandıktan sonra hücrelerin apoptoza sürüklenme sonuçları değerlendirilmiştir.

A549 hücre hattı üzerinde 10 mg/ml ve 25 mg/ml olarak uygulanan konsantrasyonların meydana gelen apoptozun belirlenmesine dair yapılan deneylerin flow sitometride ulaşılan sonuçlarına göre; kontrol grubu hücrelerinde canlılık oranı % 94,9 olarak görülmüştür. Hücrelerin canlılık oranları 10 mg/ml konsantrasyonu uygulaması sonrası % 46,76 olarak görülürken, 25 mg/ml konsantrasyonu uygulanması sonucu canlılık oranının % 32,87 seviyesine kadar gerilediği belirlenmiştir. Apoptoza uğrayan hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldığında ise kontrol grubunda bu yüzdenin % 5,1 olduğu görülürken, 10 mg/ml konsantrasyonunda uygulanan hücrelerde apoptoza bağlı hücre ölümü oranının % 53,24 olduğu ve % 67,13'le en yüksek oranın 25 mg/ml konsantrasyon uygulanması sonucu olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6: A549 hücre hattı için denen tedavi konsantrasyonlarının apoptozun yüzdelik sonucu

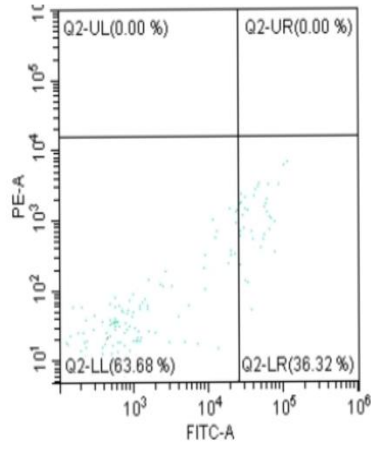
A549 hücre hattının apoptoz deneyi için kullanılan Annexin V-FITC/ PI belirleyicileri akan ölçer ile ölçülmüştür. Akan ölçer histogram sonuçlarının değerlendirilmesi için şekil 4.7’de gösterilen prosedüre uygun yorumlanmıştır.

Nekroz Hücre	Geç Apoptotik Hücre
Canlı Hücre	Erken Apoptotik Hücre

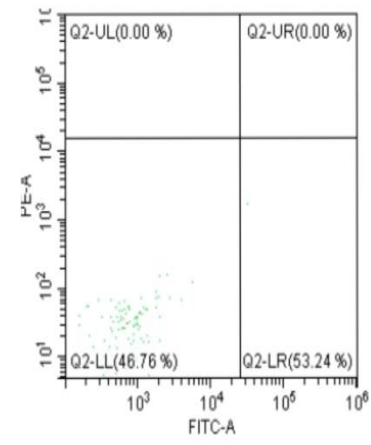
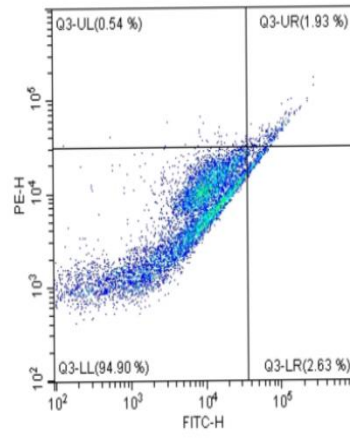
Şekil 4. 7: Annexin V-FITC/PI boyaları ile boyanma şekline göre akan ölçer değerlendirilmesi (Bakar Ateş & Çelik, 2021).

Annexin V-FITC/PI boyaları ile boyanan hücreler 15 dakika sonunda akan hücre ölçer grafiğinden elde edilen sonuçlara göre A549 kontrol grubundaki hücreleri, geç apoptotik % 1,93, erken apoptotik % 2,63 ve canlılık % 94,90; 10 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyonlu deney grubundaki hücreleri, geç apoptotik hücreler % 21,42, erken apoptotik % 4,64 ve canlılık % 73,94 ve 25 mg/ml kenevir tohumu yağı konsantrasyon deney grubundaki hücreler, geç apoptotik hücreler % 24,4, erken apoptotik % 14,94 ve canlılık % 60,65 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).

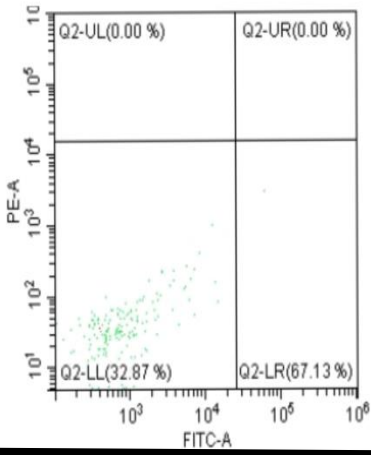
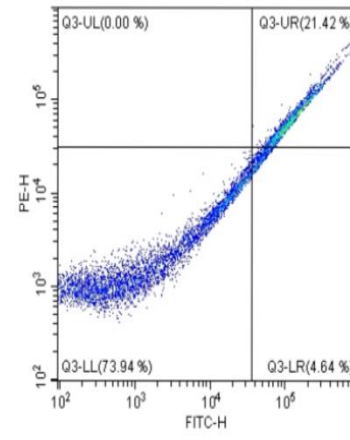
PI



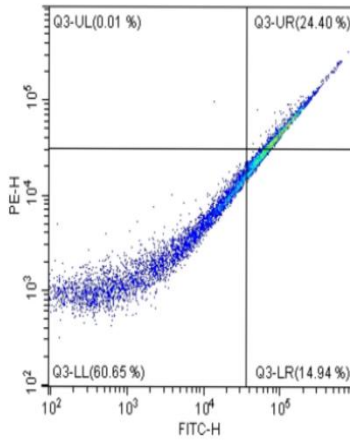
Kontrol Grubu



10 mg/ml



25 mg/ml



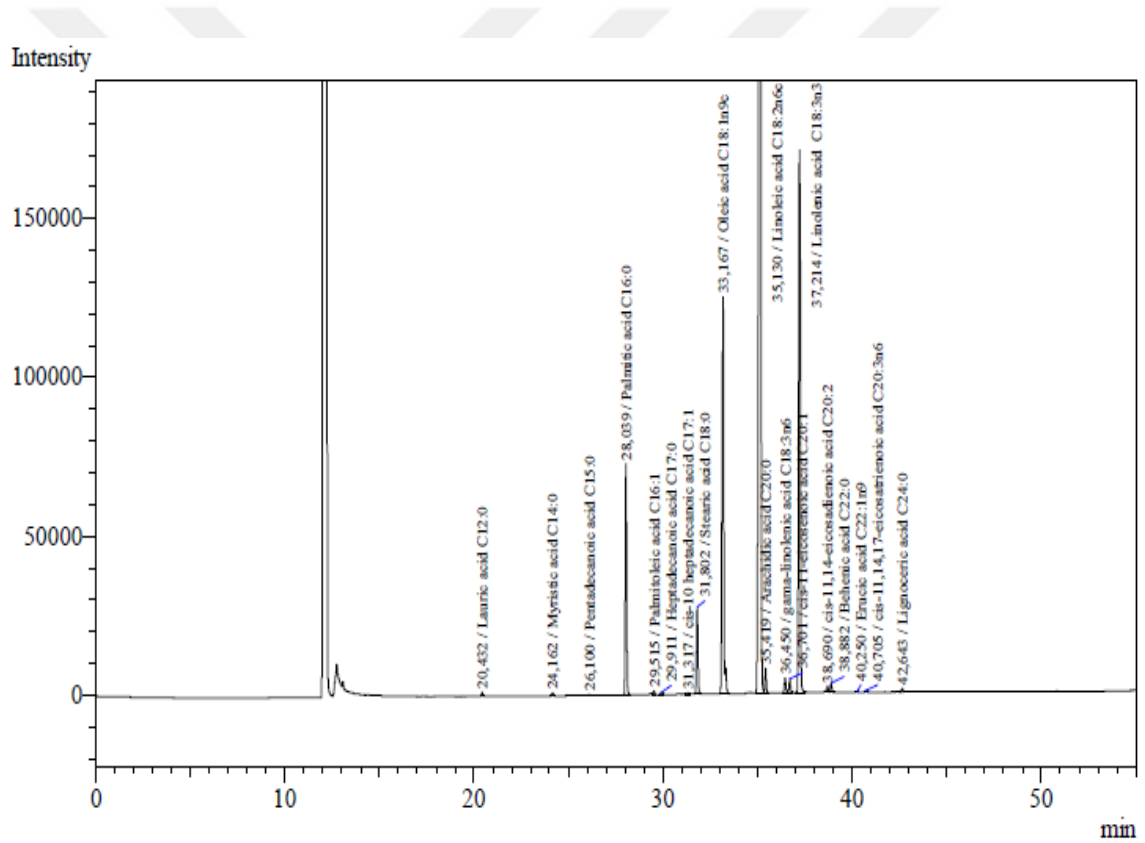
ANNEXIN V/FITC

Şekil 4. 8: Kenevir tohumu yağı ile muamele edilmiş A549 hücre hattın akan ölçer grafiği

4.3 Kenevir Tohumu Yağının Esansiyel Yağ Asitleri Bulguları

Kenevir tohumu yağının içeriğinde bulunan esansiyel yağ asitlerini belirlemek için bölüm 3.5’de anlatılan prosedüre uygun işlemler yapıldı.

GC-FID cihazına enjekte edilen numune sistemde helyum gazı sayesinde kolonlardan geçerken belli aralıklar ile kolon sıcaklığı 140 °C 5 dk, sonrasında 4 °C/dk’da 240 °C’ye ulaşana kadar artırıldı ve 240 °C’de 15 dk bekletildi. Kromatogramda alınan sonuçlara göre referans alınan Supelco Fame mix 37 standardı ile karşılaştırma yapılarak 19 adet yağ asitleri bileşenlerinin tayini yapılmıştır (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.1).

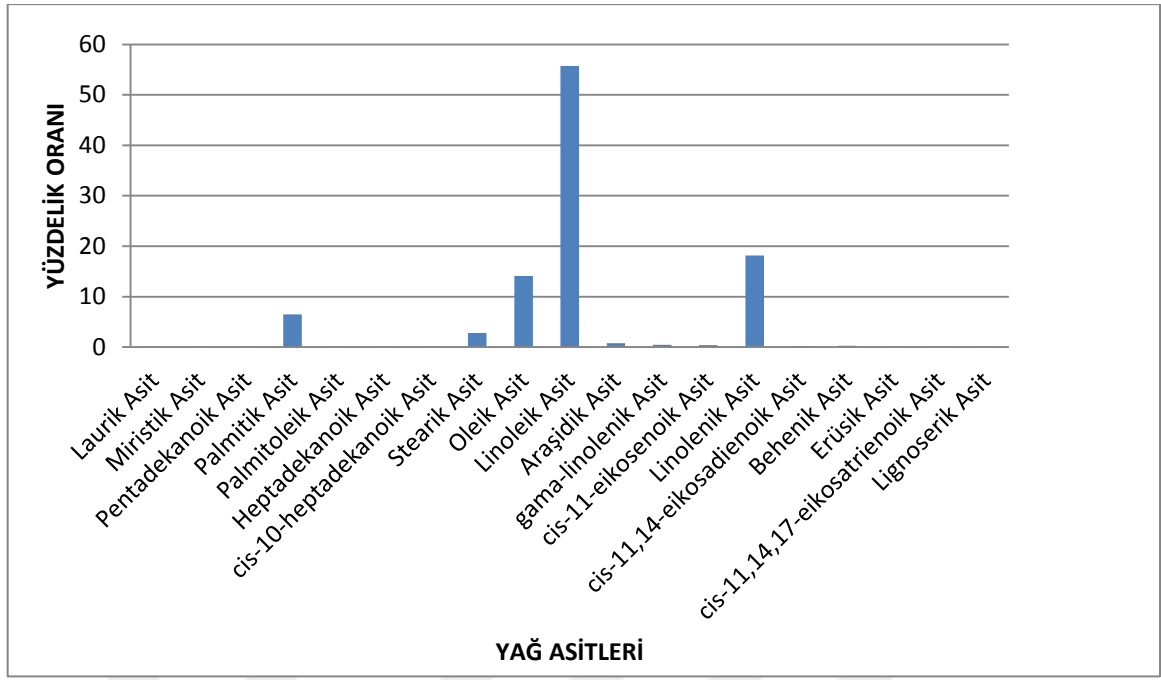


Şekil 4. 9: Kenevir yağı örneğimizdeki yağ asitlerine ait GC-FID kromatogramı

Çizelge 4. 1: Kenevir yağı örneğimizdeki yağ asitleri, alıkonma zamanları ve miktarları

Sıra	Referans No	Çıkış Süresi (dk)	Alan	Yoğluk	Formül Adı	Yağ Asiti
1	6	20,432	5472	1216	C12:0	Laurik Asit
2	8	24,162	4203	865	C14:0	Miristik Asit
3	10	26,100	704	173	C15:0	Pentadekanoik Asit
4	12	28,039	348043	72606	C16:0	Palmitik Asit
5	13	29,515	4869	1014	C16:1	Palmitoleik Asit
6	14	29,911	2932	589	C17:0	Heptadekanoik Asit
7	15	31,317	2255	358	C17:1	cis-10-heptadekanoik Asit
8	16	31,802	149475	27445	C18:0	Stearik Asit
9	18	33,167	756656	124640	C18:1n9c	Oleik Asit
10	20	35,130	2983606	401357	C18:2n-6c	Linoleik Asit
11	21	35,419	40240	7785	C20:0	Araşidik Asit
12	22	36,450	26165	4706	C18:3n6	gama-linolenik Asit
13	23	36,701	22714	4401	C20:1	cis-11-eikosenoik Asit
14	24	37,214	974489	170626	C18:3n3	Linolenik Asit
15	26	38,690	11063	1901	C20:2	cis-11,14-eikosadienoik Asit
16	27	38,882	14638	2880	C22:0	Behenik Asit
17	29	40,250	1524	247	C22:1n9	Erüsik Asit
18	30	40,705	1451	294	C20:3n3	cis-11,14,17-eikosatrienoik Asit
19	34	42,643	5656	997	C24:0	Lignoserik Asit

Analiz edilen yağ asitlerinin tohum içeriğinde bulunma yüzdeliklerini belirlemek için örneğin kromatogramda kapladığı alan ile Supelco Fame mix 37 standardında belirlenen alanlar referans alınarak hesaplama yapılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10: Analiz edilen yağ asitlerinin kenevir tohumu yağında içerik yüzdeleri

Analizde elde edilen sonuçlara göre en yüksek yağ asitleri oranları sırasıyla; linoleik asit (LA) % 55,70, α -linolenik asit (ALA) % 18,19, oleik asit % 14,12, palmitik asit % 6,49 ve stearik asit % 2,79 olduğu, geri kalan yağ asitleri oranları ise % 0,75'in altında olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

20. yüzyılın başından itibaren kanserden dolayı ölümlerin oranı % 31 oranında düştüğü görülmüş, buda yaklaşık olarak 3,2 milyondan daha az ölüm sayısı demektir. Bu ilerlemenin nedeni, büyük ölçüde sigara kullanımının azalması ve bunu takiben akciğer kanseri tedavisinde kullanılan yeni yöntemler sayesinde iyileşmelerin artmasıdır. Akciğer kanserinin bu orandaki en büyük söz hakkına sahip olmasının neden ise kanser ölümlerinin dörtte birini oluşturmasıdır. Akciğer kanseri oluşumunun % 82'sinin ise sigara içmekten kaynaklandığı bilinmektedir (Siegel et al., 2021).

Akciğer kanseri, yaklaşık olarak 2 milyon tanı ve 1.8 milyon ölümün nedeni olarak dünyada kanser insidansı ve mortalitesinin başında gelmektedir. Kadınlarda ve erkeklerde görülme sıklığı olarak ikinci sırada teşhis edilmektedir (Thandra et al., 2021). Akciğer kanseri dünyada en fazla ölümün nedeni olsa da 40 yaş altındaki genç hastalarda teşhisi yaygın değildir. Bununla beraber genç hastaların daha yaşlı hastalara oranla daha iyi veya daha kötü sonuçları olduğuyla ilgili çelişkiler mevcuttur. Akciğer kanseri yaygın olarak 60-70 yaş aralığındaki kişilerde görülür (Subramanian et al., 2010). Akciğer kanseri, bronş epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen bir kanser türüdür (Yağcı, 2015). Akciğer kanseri genellikle normal seyrinden dolayı geç tanısı konan bir hastalıktır (Beckles et al., 2003). Tanısı konan akciğer kanserine karşı hangi tedavi yönteminin uygulanacağına ise bireyin yaşı, tümörün histolojisi, hastalığın evresi gibi spesifik özelliklerine göre karar verilir (Işıtmangil, 2013). Akciğer kanseri tedavi sonuçlarında sağkalım oranları ise çok düşüktür.

Kanserde sağkalım oranları geleneksel tedavi yöntemleri (cerrahi, kemoterapi, radyoterapi) sayesinde başarıya ulaşırsa da, hastalar geleneksel yöntemler dışında yeni arayışlar içine girmişlerdir. Bu nedenden dolayı kanser hastaları tamamlayıcı ve alternatif tedavilerin kullanımlarına yönelmişlerdir (Güveli et al., 2021).

Kanser tedavileri için yeni farmakolojik ilaçların geliştirilmesi günümüzde hâlâ önemli bir ihtiyaç olarak görülmektedir. Bu bağlamda kenevir bileşeni olan kannabinoidler; akciğer, meme, kolon gibi kanser türlerine karşı umut vadeden terapötik potansiyelleri sayesinde gün geçtikçe artan bir ilgiye sahiptir (Nigro et al., 2021). Fakat alternatif tedavilerde sıklıkla kullanılan kenevir bitkisi, 1970 yılında yasaların ajan sınıfında (narkotik) değerlendirmesinden dolayı kenevir bitkisi için yapılan çalışmalar

kısıtlanmıştır. Bu kısıtlamalara rağmen az sayıdaki klinik veri sayesinde kenevirin kanser tedavisinde terapötik potansiyelinin varlığından söz edilebilmektedir (Blake et al., 2017).

Yapılan bazı araştırmalar sonucunda kanser hücrelerine karşı kenevir bitkisinde bulunan bir kimyasal olan kannabinoidin antikanser özelliği kanıtlanmıştır. Javid ve arkadaşlarının 2016 yılında yazdıkları bir makalede, kannabinoidlerin antikanser özelliğinin tipik kemoterapilerin aksine hiçbir toksik etki bırakmaması kullanımı için önemini arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca Javid ve arkadaşları, kannabinoidler, apoptotik etkilerini aktive etme, antiproliferatif ve antianjiyojenik etkilerini indüklediğinden de bahsetmişlerdir (Javid et al., 2016). Bu çalışmalardan biride Petrocellis ve arkadaşlarının 2013 yılında prostat kanseri üzerine kannabinoidler ile yaptıkları çalışma da CBD'nin hücre canlılığını büyük ölçüde inhibe ettiği ve proapoptotik duyarlılığı artırdığını keşif etmişlerdir (De Petrocellis et al., 2013).

Kenevir bitkisinin tohum kısmı ise yüksek besin değerlerine sahiptir. Kenevir tohumları % 27-30 yağ, % 24-28 protein, % 20-34 karbonhidrat içermektedir. Kenevir tohumları ayrıca kalsiyum, magnezyum, demir, çinko gibi minerallerde içerir. Kenevir tohumları presleme yöntemi ile yağ elde edilir. (Crimaldi et al., 2017; Zajac et al., 2019).

Bu çalışma kapsamında çoklu fonksiyon grubuna sahip olduğu bilinen kenevir tohumu yağının içeriğindeki esansiyel yağ asitleri teşhis edilmiştir. Kenevir bitkisinin çiçek salkımında üretilen tohumdan elde edilen kenevir tohumu yağının içerisindeki yağ asitleri ve bazı bileşenler sayesinde antikanser özelliğinin olduğu bilinmektedir. Porto ve arkadaşları 2012 yılında yaptığı çalışmada da kenevir tohumu yağının, sağlığı geliştirmek ve hastalıkların önlenmesi için esansiyel yağ asitleri (EFA) ve antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek çok fonksiyonlu bir yağ olduğunu belirtmişlerdir (Da Porto et al., 2012). Kenevir tohumu yağının içeriğinde çoklu doymamış yağ asitleri (linoleik asit (LA), α -linolenik asit (ALA) vb.) bulunmaktadır. Bu yağ asitlerin büyük çoğunluğunun ise insan sağlığı için oldukça yararlı esansiyel yağ asitleri oluşturmaktadır (Mikulcova et al., 2017; Rapa et al., 2019).

Çalışmada kullanılan kenevir tohumu yağı, kenevir tohumları kurutularak soğuk sıkım yöntemiyle saf halde yağı elde edilmiş ve kenevir tohumu yağı ağzı kapalı bir cam şişede 20 °C'de analizlerde kullanılmak için saklanmıştır. Saf halde elde edilen kenevir tohumu yağının içerisindeki esansiyel yağ asitlerinin belirlenmesi için Gaz Kromatografi-Alev İyonlaştırma Dedektörü (GC-FID) enstrümental analiz sistemi kullanılmıştır. Gaz

kromatogramda elde edilen yağ asitleri karşılaştırılması ve kenevir tohumu yağının içeriğindeki esansiyel yağ asitlerinin adlarının belirlenebilmesi için de trans-cis, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini de içeren 37'lik standart bir mix olan "Supelco Fame mix 37" standardı kullanılmıştır. Kenevir tohumu yağının kromatografisi referans alınan Supelco Fame mix 37 standardı ile karşılaştırılmış ve soğuk sıkım yöntemi ile elde edilen kenevir tohumu yağının içerisinde 19 adet esansiyel yağ asiti tespit edilmiştir. Yağın içeriğinde en yüksek orana sahip yağ asitleri ise çoklu doymamış yağ asitleri olarak bilinen; linoleik asit (LA) (% 55,70), α -linolenik asit (ALA) (% 18,19), tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (% 14,12), palmitik asit (% 6,49) ve stearik asit (% 2,79) dir (Şekil 4.9). Dinçel 2022 yılında yaptığı çalışmada Sivas-Ankara Karayolları üzerinde yetiştirilen kenevir tohumlarını soğuk sıkım yöntemi ile yağ eldesini yapmış ve GC kromatografi cihazı ölçümü ile içerisindeki yağ asitlerini belirlenmiştir. Dinçel, kenevir tohumu yağının esansiyel yağ asitlerini belirlediği çalışmasında, 9 adet yağ asidi tespit etmiş olup en yüksek oranlar % 56,34 linoleik asit, % 14,18 oleik asit ve % 6,33 palmitik asit içeriğinin olduğundan bahsetmiştir (Kütük Dinçel, 2022).

Kenevir tohumu yağı içerisinde bulunan esansiyel yağ asitlerinin genel özellikleri incelendiğinde, LA (ω 6) ve ALA (ω 3) yağ asitlerinin antikanser özelliği kanıtlandığı bilinmektedir. Bu yağ asitlerinin, hücre büyümesini düzenlediği, lipid peroksidasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptoza sürüklenme gibi antikanser ajanlıkları olduğu bilinmektedir (Dachev et al., 2021). Ayrıca bu yağ asitleri; kalp krizi, depresyon, kardiyovasküler, migren, romatizma, kolesterol, bazı alerjik ve kanser gibi bir çok hastalıktan koruyucu etkisinin olduğunu ve bu çoklu doymamış yağ asitlerinin tedavilerde ağrı kesici etkisinden de yararlanılmaktadır. LA'nın kansere karşı korucu olması ve vücut yağının azaltma etkisinin keşfedilmesi ile bu yağ asidine olan ilgi artmıştır. İnsan sağlığı üzerinde antikanserojen, antidiyabet, bağışıklık artırıcı gibi yararlı etkileride mevcuttur (Çakmakçı & Tahmas Kahyaoğlu, 2012; Çevik Aygün & Pirinççi, 2017). Yao ve arkadaşları 2014 yılında çoklu doymamış yağ asitleri olan, ω -3 yağ asitlerinin akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonlarını azalttığı ve zamana bağlı olarak hücre apoptozunu ve otofajisini indüklediği sonucuna varmışlardır. Ayrıca akciğer kanseri için yeni ve güvenilir bir seçenek olabileceğine değinmişlerdir (Yao et al., 2014). ω -9 yağ asidi olan oleik asidin ise kanser insidansını azaltır. Oleik asidinin antioksidan özelliği de bulunmaktadır (Aktaş, 2021). Bu bilgiler ile kenevir tohumu yağının içerisinde bulunan

yağ asitlerinin kanser hücrelerine karşı antikanser özelliklerinin varlığından söz etmek mümkün olmuştur. (Trombetta et al., 2007).

Bu bilgiler ışığında kenevir tohumu yağının, kanser hastalığının tedavisi için umut edilen terapötik potansiyele sahip olduğu ve araştırmaya değer olduğunu gösteren sonuçlara sahiptir.

Bu çalışmada, akciğer kanser hücrelerine (A549) ve sağlıklı akciğer hücrelerine (BEAS-2B) *in vitro* olarak hücre kültür ortamında ideal dozlarda soğuk sıkım yöntemiyle elde edilen kenevir tohumu yağı uygulanmış ve kenevir tohumu yağı içerisinde bilinen birçok bileşiğin (Mikulcova et al., 2017) kanser hücrelerine antikanserojenik etki göstererek hücre proliferasyonunu düşürmesi ve akciğer kanser hücrelerinin apoptoza sürüklenmesi araştırılmıştır.

Bu çalışma kapsamında önceden yapılan araştırma sonuçlarına bakıldığında, Aviello ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada kolon kanseri hücrelerine kannabinoidlerin *in vivo* olarak etkilerini incelenmiş, çalışma sonucunda da, kannabinoidlerin hücrelerde oluşabilecek DNA hasarlarını koruduğu ve çoklu mekanizma yolu ile hücre proliferasyonun düşürdüğünü kanıtlanmış, ayrıca kannabinoidlerin kolon kanserinin önlenmesinde klinik değerlendirmeye değer olduğu belirtilmiştir (Aviello et al., 2012). Ayrıca Lukhele ve Motadi'nin 2016 yılında yaptığı araştırmada da rahim ağzı kanser hücrelerine uygulanan *Cannabis sativa* özütünün, tüm hücre dizilerinde değişen konsantrasyonlarda hücre çoğalmasının durduğu ve hücreleri apoptoza sürüklediği ortaya çıkarılmıştır (Lukhele & Motadi, 2016).

Bu çalışmada soğuk sıkım yöntemiyle saf halde elde edilen kenevir tohumu yağı, akciğer kanser hücre hattı (A549) ve sağlıklı akciğer hücre hattı (BEAS-2B) hücre kültürü ortamında 96 kuyucuklu plaklarda ekimleri yapılmış ve ekim sonrasında hücre proliferasyonun oranını hesaplayabilmek için MTS testi kullanılmıştır. Yapılan hücre proliferasyon deneyleri incelendiğinde, kenevir tohumu yağı ve A549 hücre hattı arasında etkileşim sonucunda, kontrol grubu ve deney grupları (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) karşılaştırıldığında kenevir tohumu yağı konsantrasyonu arttıkça deney grubu hücrelerinin canlılığının ciddi derecelerde azaldığı görülmüştür. A549 hücre hattında en yüksek düşüşün 50 mg/ml konsantrasyonundaki deney grubuna (% 27) ait olduğu saptanmıştır. Karşılaştırmak için kullanılan BEAS-2B hücrelerinde ise konsantrasyon oranı arttıkça hücre proliferasyonunda düşüş olduğu belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde en

yüksek düşüş 50 mg/ml konsantrasyonundaki deney grubunda (% 22) olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda kenevir tohumu yağının dozajı artırıldıkça hücre kültüründeki, hücre proliferasyonunun düştüğü saptanmıştır.

Çalışmada kenevir tohumu yağı, iki farklı hücre hattının (A549 ve BEAS-2B) hücre proliferasyonun düşürdüğü belirlenmiş olsada bu düşüşlerin anlamlı bir fark oluşturduğunu *Student t* testi uygulanarak bakılmıştır. *Student t* testi sonucunda çıkan *p* değerleri 0,05'den küçük olduğu takdirde anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel sonuçları incelendiğinde, A549 hücrelere hatlarına uygulanan 5 farklı kenevir tohumu yağı konsantrasyonların tümünün $p < 0,05$ değerine göre anlamlı bulunmuştur. Ayrıca 1 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlardaki *p* değerlerinin 0,001'den düşük olduğu yani bu konsantrasyonların çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.3). Bu bulgura göre A549 akciğer kanser hücreleri kenevir tohumu yağları tarafından hücre proliferasyonunu azaltarak olumlu bir yanıt verdiği görülmektedir.

BEAS-2B sağlıklı akciğer kanser hücrelerinde yapılan *Student t* testi sonuçları ise tüm konsantrasyonların (1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml) oranları istatistiksel olarak $p < 0,05$ değerine göre anlamlı bulunmuştur. 5 mg/ml, 25 mg/ml ve 50 mg/ml konsantrasyonlardaki *p* değerlerinin 0,001' den düşük olduğu yani bu konsantrasyonların çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.5). BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerine, kenevir tohumu yağının sitotoksik etki yaptığı görülmüştür.

Kenevir tohumu yağının, hücre kültüründe hücre proliferasyon düşüklüğünün apoptotik etkisi de incelenmiştir. Apoptotik etkileri incelemek için ise flow sitometri (akan ölçer) ile apoptozis yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde A549 kontrol grubu ve A549 deney gruplarına (10 mg/ml ve 25 mg/ml) Elabscience Annexin V-FITC/ PI apoptoz belirleme protokolüne uygun yöntem uygulandıktan sonra elde edilen sonuca göre A549 hücrelerin kontrol grubu ve deney grupları (10 mg/ml ve 25 mg/ml) karşılaştırıldığında konsantrasyon oranı arttıkça hücrelerin apoptoza sürüklenme oranlarının arttığı görülmüştür. En yüksek konsantrasyon olan 25 mg/ml deney grubunun hücrelerin % 67,13'nü apoptoza sürüklendiği saptanmıştır. Apoptoza sürüklenen A549 hücrelerin Anneksin V-FITC/PI uygulaması sonucunda akan ölçer grafiği oluşturuldu. Bu grafik ile kenevir tohumu yağının A549 hücrelerini apoptoza sürüklemesi incelenmiştir. A549 kontrol grubundaki hücreler, geç apoptotik % 1,93, erken apoptotik % 2,63 ve canlılık % 94,90 oranlarında olduğu, 10 mg/ml deney grubundaki hücreler, geç apoptotik % 21,42,

erken apoptotik % 4,64 ve canlılık % 73,94 oranında olduğu, 25 mg/ml deney grubunda grubundaki hücreler, geç apoptotik % 24,4, erken apoptotik % 14,94 ve canlılık % 60,65 oranında olduğu ölçülmüştür. Canlılığın en düşük olduğu konsantrasyon 25 mg/ml (% 60,65) olmuştur (Şekil 4.6). Anneksin V-FITC/ PI apoptoz uygulaması sonucunda kenevir tohumu yağı konsantrasyonu arttıkça, akciğer kanser hücrelerini daha fazla apoptoza sürüklendiği görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, akciğer kanseri tedavisine yeni bir alternatif yaklaşım için kenevir tohumu yağının antikanserojenik etkisi ve terapötik potansiyeli araştırılmış ve kenevir tohumu yağının, akciğer kanseri tedavisinde kullanıldığında umut verici sonuçlar elde edilebileceği görülmüştür. Kenevir tohumu yağının, akciğer kanser hücrelerini (A549) apoptoza sürükleyerek hücre canlılığını azaldığı belirlenmiştir. Bu sayede kenevir tohumu yağının bir antikanser ajanı olarak çalışma potansiyelinin olduğu gösterilmiş fakat kenevir tohumu yağının yeni bir tedavi yöntemi olarak kullanım sağlaması için gelişmiş *in vivo* veya *in vitro* çalışmalara ihtiyacı vardır.

Sonuç olarak yapılan çalışmada literatüre, kenevir tohumu yağının akciğer kanser hücrelerinin (A549) proliferasyonunu büyük oranda düşürdüğü ve apoptoza sürüklediği gösterilmiştir. Literatürde kenevir tohumu yağının akciğer kanseri hücrelerine yönelik etkilerini araştıran az sayıdaki çalışmadan biri olması nedeniyle özgün bir nitelik taşımaktadır.

Elde edilen sonuçlara bakılarak gelecekte yapılacak çalışmalar için aşağıda bazı çalışma önerileri bulunmaktadır.

1. *In vivo* olarak kenevir tohumu yağını, akciğer kanser hücrelerine karşı antikanserojenik etkileri incelenebilir.
2. Kenevir tohumu yağı içerisindeki kannabinoidler analiz edilerek, kanser hücreleri üzerinde saf olarak teşhis edilen kannabinoidlerin etkileri ve saf kenevir tohumu yağının etkileri karşılaştırılabilir.
3. Kenevir tohumu yağındaki belirlenmiş esansiyel yağ asitleri izolasyonu yapılarak hem kanser hücreleri hem de sağlıklı hücrelerin proliferasyonunu nasıl etkiledikleri tek tek araştırılabilir.
4. *In vivo* olarak metastaz yapmış kanser dokularına kenevir tohumu yağı ile muamele edilerek, kanser dokunun metastaz yeteneğine karşı bir etkisi olup olmayacağı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Akgül, A.** (2014). Türkiye’de Yasadışı Kenevir Ekim ve Mücadele Politikaları. *Uluslararası Güvenlik ve Terörizm Dergisi*, 5(1), 119–140. <https://doi.org/88.236.160.124>
- Akgün, Ş., Küçüksayan, H., & Akça, H.** (2018). Tümör Baskılayıcı Genler. In Y. Baran (Ed.), *Kanser Moleküler Biyolojisi* (Vol. 1, pp. 151–160). Kısayol Yayıncılık.
- Aktaş, İ.** (2021). Omega 9. In *Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi* (Aktaş, İbr, pp. 76–78). Iksad Puplications.
- Aladić, K., Jokić, S., Moslavac, T., Tomas, S., Vidović, S., Vladić, J., & Šubarić, D.** (2014). Cold pressing and supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 28(4), 481–490. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2013.1895>
- Alar, T., & Şahin, E. M.** (2012). Akciğer Kanseri: Birinci Basamakta Tanı, Tedavi ve Korunma. *Smyrna Tıp Dergisi*, 2, 68–74.
- Aldemir, E., Döğər, R., Aydoğdu, M., Akyel, B., Atlam, D. H., Akgür, S. A., & Yüncü, Z.** (2020). Kannabis, Tıbbi Kullanımı ve İlişkili Politikaların Topluma Yansımaları. *Klinik Psikiyatri Dergisi*, 23(2), 204–213. <https://doi.org/10.5505/kpd.2020.46547>
- Aliustaoğlu, M.** (2009). Temel Kanser Fizyopatolojisi. *Klinik Gelişimi*, 22(3), 46–49.
- Aljadani, M. A., Alkhatib, M. H., & Mahassni, S. H.** (2020). Evaluation of the Proliferation and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells Subjected to Epirubicin Formulated with Natural Oils in Nanoemulsion. *Asian Journal of Pharmaceuics*, 14(1), 139–147. <https://doi.org/10.22377/ajp.v14i1.3578>
- Amaducci, S., Scordia, D., Liu, F. H., Zhang, Q., Guo, H., Testa, G., & Cosentino, S. L.** (2015). Key Cultivation Techniques for Hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*, 68, 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.041>
- Andradas, C., Truong, A., Byrne, J., & Endersby, R.** (2021). The Role of Cannabinoids as Anticancer Agents in Pediatric Oncology. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.3390/cancers13010157>
- Arı, M., Öğüt, S., & Döğər Kaçar, F.** (2017). Kanserın Önlenmesinde Antioksidanların Rolü. *Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 1(2), 67–74.

- Arslan, N.** (2018). Tartışmalar Işığında Kenevire Bakış. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 28, 23–28.
- Arthur, P., Patel, N., Surapaneni, S. K., Mondal, A., Gebeyehu, A., Bagde, A., Kutlehria, S., Nottingham, E., & Singh, M.** (2020). Targeting Lung Cancer Stem Cells Using Combination of Tel and Docetaxel Liposomes in 3D Cultures and Tumor Xenografts. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 401, 28. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115112>
- Atakan, Z.** (2012). Cannabis, a Complex Plant: Different Compounds and Different Effects on Individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6), 241–254. <https://doi.org/10.1177/2045125312457586>
- Atlı, A., Ölmez Kavak, G., & Bozhan, N.** (2020). Kenevirin Medikal Kullanımı. In A. Onay, H. Yıldırım, & R. Ekinci (Eds.), *Kenevir (Cannabis sativa L.)* (pp. 209–245). Palme Yayınevi.
- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V., & Izzo, A. A.** (2012). Chemopreventive Effect of the Non-Psychotropic Phytocannabinoid Cannabidiol on Experimental Colon Cancer. *Journal of Molecular Medicine* 2012 90:8, 90(8), 925–934. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0856-x>
- Bakar Ateş, F., & Çelik, A.** (2021). Interlökin-6'nin MMP-2/-9 mRNA Ekspresyonunun Downregülasyonu Yoluyla MCF-7 Hücrelerinin Apoptozisi Üzerindeki Etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 46(5), 549–555. <https://doi.org/10.1515/TJB-2020-0508>
- Balcı, P., & Altay, C.** (2014). Akciğer Kanserinde Radyolojik Bulgular. *Türk Radyoloji Seminerleri*, 2, 304–315. <https://doi.org/10.5152/trs.2014.025>
- Balpınar, Ö., & Aytaç, S.** (2021). Tıbbi Kenevir Ve Sağlık: Farmakolojik Bir Derleme. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 45(3), 631–651. <https://doi.org/10.33483/jfpau.859372>
- Balta, B. Z., Üre, Ö. S., Erturan, S., & Aydın, G.** (2013). Prognostic Factors in Advanced-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Haseki Tıp Bulteni*, 51(2), 56–60. <https://doi.org/10.4274/Haseki.848>
- Başbag, S., & Ekinci, R.** (2020). Kenevir Tarımı. In A. Onay, H. Yıldırım, & R. Ekinci (Eds.), *Kenevir (Cannabis sativa L.)* (pp. 61–84). Palme Yayınevi.

- Başer, U., & Bozoğlu, M.** (2020). Türkiye'nin Kenevir Politikası ve Piyasasına Bir Bakış. *Tarım Ekonomisi Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 127–135.
- Başoğlu, A., Taslak Şengül, A., Akpolat, I., Özbek, N., & Yücel, I.** (2013). Kür Sağlanan Küçük Hücreli Akciğer Karsinomlu Olguda Gelişen Metakron Akciğer Kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 28(1), 36–40. <https://doi.org/10.5505/tjoncol.2013.849>
- Baykara, O.** (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>
- Beckles, M. A., Spiro, S. G., Colice, G. L., & Rudd, R. M.** (2003). Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes. *Chest*, 123, 97–104. https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.97s
- Berk, V.** (2014). Temel Onkoloji. *İmmuno Onkoloji ve Hedeflenmiş Tedaviler Kursu*, 107. http://www.kithemsireleri.com/FileUpload/ds394642/File/1-temel_onkoloji_doc.dr._veli_berk.pdf
- Bireller İplik, E. S., & Çakmakoğlu, B.** (2018). Onkogenler. In Y. Baran (Ed.), *Kanser Moleküler Biyolojisi* (1st ed., pp. 161–171). Kısayol Yayıncılık. <https://www.kitapyurdu.com/kitap/kanser-molekuler-biyolojisi/596956.html>
- Birring, S. S., & Peake, M. D.** (2005). Symptoms and The Early Diagnosis of Lung Cancer. *Thorax*, 60(4), 268–269. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.032698>
- Blake, A., Wan, B. A., Malek, L., DeAngelis, C., Diaz, P., Lao, N., Chow, E., & O'Hearn, S.** (2017). A Selective Review of Medical Cannabis in Cancer Pain Management. *Annals of Palliative Medicine*, 6, S215–S222. <https://doi.org/10.21037/apm.2017.08.05>
- Borgelt, L. M., Franson, K. L., Nussbaum, A. M., & Wang, G. S.** (2013). The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. *Pharmacotherapy*, 33(2), 195–209. <https://doi.org/10.1002/far.1187>
- Cabadak, H.** (2008). HücreSiklusu Ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 51–61.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. A.** (2000). Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3–4), 222–230. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00317-8)

- Çakmakçı, S., & Tahmas Kahyaoğlu, D.** (2012). Yağ Asitlerinin Sağlık ve Beslenme Üzerine Etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(2), 133–137.
- Callaway, J. C.** (2004). Hempseed as a Nutritional Resource: An Overview. *Euphytica*, 140(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6>
- Çelebi, Ş., Kaya, H., & Kaya, A.** (2017). Omega-3 Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 32(2), 105–112. <https://doi.org/10.28955/alinterizbd.319437>
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., & Karagin, P. H.** (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 24(3), 103–111.
- Çelik, L. S., & Mete, U. Ö.** (2017). Overlerde Anjiyogenezi Etkileyen Faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 26(3), 330–330. <https://doi.org/10.17827/aktd.303589>
- Cerino, P., Buonerba, C., Cannazza, G., D’Auria, J., Ottoni, E., Fulgione, A., Di Stasio, A., Pierri, B., & Gallo, A.** (2021). A Review of Hemp as Food and Nutritional Supplement. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(1), 19–27. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0001>
- Çevik Aygün, B., & Pirinçci, E.** (2017). Beslenme ve Kansere. *Fırat Tıp Dergisi*, 22(1), 1–7.
- Ceylan, K. C., Arpat, A. H., & Kaya, Ş. Ö.** (2009). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Klinik ve Patolojik Evrelemenin Karşılaştırılması. *Dr. Suat Seren Göğüs Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Göğüs Cerrahisi*, 14.
- Chang, L., Duan, W., Huang, S., Chen, A., Li, J., Tang, H., Pan, G., Deng, Y., Zhao, L., & Li, D.** (2021). Improved Antibacterial Activity of Hemp Fibre by Covalent Grafting of Quaternary Ammonium Groups. *Royal Society Open Science*, 8(3), 16. <https://doi.org/10.1098/rsos.201904>
- Chauhan, A.** (2021). Nutrition and Health Benefits of Hemp-Seed Protein (Cannabis sativa L.). *The Pharma Innovation Journal*, 10(1), 16–19.
- Cherney, J. H., & Small, E.** (2016). Industrial hemp in North America: Production, politics and potential. *Agronomy*, 6(4), 24. <https://doi.org/10.3390/agronomy6040058>
- Citti, C., Linciano, P., Panseri, S., Vezzadini, F., Forni, F., Vandelli, M. A., & Cannazza, G.** (2019). Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil By Liquid

- Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00120>
- Corn, P. G., & El-Deiry, W. S.** (2002). Derangement of Growth and Differentiation Control in Oncogenesis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(1), 83–90. <https://doi.org/10.1002/bi.10036>
- Coşkun, G., & Özgür, H.** (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *ARŞİV*, 20(3), 145–158.
- Crimaldi, M., Faugno, S., Sannino, M., & Ardito, L.** (2017). Optimization of Hemp Seeds(Canapa Sativa L.) Oil Mechanical Extraction. *Chemical Engineering Transactions*, 58, 373–378. <https://doi.org/10.3303/CET1758063>
- Da Porto, C., Voinovich, D., Decorti, D., & Natolino, A.** (2012). Response surface optimization of hemp seed (Cannabis sativa L.) oil yield and oxidation stability by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 68, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.04.008>
- Dachev, M., Bryndova, J., Jakubek, M., Moucka, Z., & Urban, M.** (2021). The Effects of Conjugated Linoleic Acids on Cancer. *Processes*, 9, 17. <https://doi.org/10.3390/pr9030454>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Iappelli, M., Verde, R., Stott, C. G., Cristino, L., Orlando, P., & Di Marzo, V.** (2013). Non-THC Cannabinoids Inhibit Prostate Carcinoma Growth in Vitro and In Vivo: Pro-Apoptotic Effects and Underlying Mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 79–102. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02027.x>
- Decorti, D., Natolino, A., & Da Porto, C.** (2015). Potential Oil Yield, Fatty Acid Composition, and Oxidation Stability of the Hempseed Oil from Four Cannabis sativa L. Cultivars. *Journal of Dietary Supplements*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.3109/19390211.2014.887601>
- Doğan, N., & Doğan, C.** (2021). Mucizevi Bitki Kenevir'in (Cannabis sativa L.) Gıda Endüstrisinde Kullanımı. *Bozok Veterinary Sciences*, 2(2), 47–56.
- Dunford, N.** (2020). *Hemp Seed Oil Properties*. Oklahoma State University. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5sKTGmRJKdAJ:https://shareok.org/rest/bitstreams/1f222da4-afda-4ce6-acb9->

- Ekinci, R., Başbag, S., & Yaşar, M.** (2020). Kenevirin Ekolojik İstekleri. In A. Onay, H. Yıldırım, & R. Ekinci (Eds.), *KENEVİR (Cannabis sativa L.)* (Issue December, pp. 45–60). Palme Yayınevi.
- Erdem, S. S., Yılmaz, M., Yildirim, H., Mayda, A. S., Durak, A. A., & Şener, Ö.** (2017). Düzce ' de Yaşayanların Kanser ve Kanser Risk Faktörleri Hakkında Bilgi Düzeyi Information Level on Cancer and Cancer Risk Factors Living in Duzce. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 1–10.
- Ergelen, R., & Çimşit, N. Ç.** (2000). Akciğer Tümörü. *Türk Toraks Derneği*, 178–188. <https://doi.org/10.5152/tcb.2013.30>
- Ergen, Ş. A., Tiken, E. E., Zalova, G., Turna, H., Öksüz, D. Ç., Öner Binçbaş, F., & Yıldırım, H. C.** (2015). Sınırlı Evre Küçük Hücreli Akciğer Kanseri: Tedavi Sonuçları ve Prognostik Faktörler. *Türk Onkoloji Dergisi*, 30(4), 188–194. <https://doi.org/10.5505/tjoncol.2015.1353>
- Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., & Merendino, N.** (2020). The Seed of Industrial Hemp (Cannabis sativa L.): Nutritional Quality and Potential Functionality for Human Health and Nutrition. *Nutrients*, 12, 59. <https://doi.org/10.3390/nu12071935>
- Galasso, I., Russo, R., Mapelli, S., Ponzoni, E., Brambilla, I. M., Battelli, G., & Reggiani, R.** (2016). Variability in Seed Traits in a Collection of Cannabis sativa L. Genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAY2016), 688. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00688>
- Garcia, F. L., Ma, S., Dave, A., & Acevedo-fani, A.** (2021). Structural and Physicochemical Characteristics of Oil Bodies from Hemp Seeds (Cannabis sativa L.). *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10122930>
- Gelmez, M. Y., & Deniz, G.** (2020). Akan Hücre Ölçer ve Kullanım Alanları. In R. Özyavuz (Ed.), *ÜCD Güncelleme Serileri “Moleküler Tıp” Özel Sayısı* (2nd ed., Vol. 9, pp. 9–13). Ürolojik Cerrahi Derneği.
- Gencer, H., Serçekuş, P., & Özkan, S.** (2021). Kanser Hastalarının Bilgi Kaynakları. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(3), 568–573.
- Gönen, S.** (2009). Cannabis Sativa L. Bitkisinin Morfolojik ve Anatomisi Üzerine Bir

Araştırma. *Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*, 63.

- Göre, M., & Kurt, O.** (2021). A New Trend in Crop Production: Hemp. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(1), 138–157. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.789970>
- GTHB.** (2016). Kenevir Ekimi ve Kontrolü Hakkında Yönetmelik. *Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı*. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/09/20160929-3.htm>
- Günbatar, H., Serto, B., & Özbay, B.** (2012). Akciğer Kanseri Olgularının Değerlendirilmesi ; 3 Yıllık Analiz. *Van Tıp Dergisi*, 19(1), 13–20.
- Gündüz, K., Yanardağ, İ. H., & Karabulut Bay, A.** (2020). Kenevirin Fitokimyasalları. In A. Onay, H. Yıldırım, & R. Ekinci (Eds.), *Kenevir (Cannabis sativa L.)* (pp. 175–193). Palme Yayınevi.
- Güran, Ş.** (2005). Kanserden korunma. *Gulhane Medical Journal*, 47, 324–326.
- Gürel, A., Akdemir, H., Emiroğlu, Ş. H., Kadoğlu, H., & Karadayı, H. B.** (2000). Türkiye'nin Lif Bitkileri (Pamuk Tarımı, Teknolojisine Genel Bakış ve Diğer Lif Bitkileri). *Türkiye Ziraat Mühendisliği V Teknik Kongresi*, 525–566.
- Güveli, H., Uzsoy, A., Özlü, T., Kenger, E. B., & Ergün, C.** (2021). Onkoloji Hastalarında Tamamlayıcı Ve Alternatif Tıp Kullanım Sıklığının Ve Diyet Yaklaşımlarının Belirlenmesi. *European Journal of Science and Technology*, 21, 307–312. <https://doi.org/10.31590/ejosat.814348>
- Hamutoğlu, R., & Önder, O.** (2017). Fizyolojik ve Patolojik Koşullarda Anjiyogenezin Rolü. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 2(2), 56–62. <https://doi.org/10.5606/fng.transplantasyon.2017.010>
- İnci, A., Yavuz, A., Yıldırım, A., Düzlü, Ö., & Bişkin, Z.** (2012). Sığır Theileriosis'inde Metastaz. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 9(2), 113–122.
- İnci, A., Yıldırım, A., Yavuz, A., & Düzlü, Ö.** (2009). Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6(2), 121–133.
- İplik, E. Si., & Çakmakoglu, B.** (2020). Hücre Kültürü Temel Teknikleri. In *ÜCD Güncelleme Serileri* (Özyavuz, R, Vol. 9, Issue 2). Üroloji Cerrahi Derneği.
- İsan, H., Tüfekçi, K., Göklü, M. E., & Gülhan Aktaş, R.** (2016). Dondurma-Çözme

- İşleminin Ardından Uygulanan Santrifüjün Ortaya Çıkardığı Mekanik Stresin Karaciğer Kanseri Hücreleri İn Vitro Kültürü Üzerine Etkileri The Effects of Mechanic Stress, Due to Centrifuge After Freezing-Thawing Process, on In Vitro Culture of. *Maltepe Tıp Dergisi*, 8(3), 1–5.
- Işıtmangil, G. A.** (2013). Akciğer Kanseri İmmünoterapisinde Yeni Stratejiler. *Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, 53(3), 168–177.
- Javid, F. A., Phillips, R. M., Afshinjavid, S., Verde, R., & Ligresti, A.** (2016). Cannabinoid pharmacology in cancer research: A new hope for cancer patients? *European Journal of Pharmacology*, 775, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.010>
- Jian, F., Divagar, D., Mhaiki, J., Jayas, D. S., Fields, P. G., & White, N. D. G.** (2018). Static and Dynamic Methods to Determine Adsorption Isotherms of Hemp Seed (Cannabis sativa L.) With Different Percentages of Dockage. *Food Science & Nutrition*, 6(6), 1640. <https://doi.org/10.1002/FSN3.744>
- Karcier, M.** (2021). Farklı Ekstraksiyon Metotları ile Elde Edilen Kenevir Tohum Ve Yağlarının Fiziksel Ve Kimyasal Kompozisyonu. *Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*, 71.
- Kavradım, S., & Özer, Z.** (2014). Hope in People with Cancer. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar - Current Approaches in Psychiatry*, 6(3), 1. <https://doi.org/10.5455/cap.20130901084242>
- Kaya, C., Çalışkan, Y., & Yönden, Z.** (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3(11), 26–37.
- Kis, B., Ifrim, F. C., Buda, V., Avram, S., Pavel, I. Z., Antal, D., Paunescu, V., Dehelean, C. A., Ardelean, F., Diaconeasa, Z., Soica, C., & Danciu, C.** (2019). Cannabidiol—From Plant to Human Body: A Promising Bioactive Molecule With Multi-Target Effects in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 24. <https://doi.org/10.3390/ijms20235905>
- Konukoğlu, D., & Turhan, M. S.** (2014). Anjiyogenezin Temel Molekül Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 36(1), 42–48.
- Küçükşayan, H., Akça, H., & Akgün, Ş.** (2018). Tümör Baskılayıcı Genler. In *Kanser Moleküler Biyolojisi* (Yusuf Bara, pp. 151–160). Kısayol Yayıncılık.

- Kurtman, C.** (2018). Radyobiyojide Hücre Siklusu, 5r ve Hasar. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 17(1), 25–29.
- Kütük Dinçel, N. G.** (2022). İlk Üretim Yılında Sivas Ekolojik şartlarında Yetiştirilen Kenevir Bitkisinden Elde Edilen Tohumun Yağ oranı ve Yağ Asit Kompozisyonunun Belirlenmesi. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 11–16. <https://doi.org/10.55257/ethabd.1081704>
- Lan, Y., Zha, F., Peckrul, A., Hanson, B., Johnson, B., Rao, J., & Chen, B.** (2019). Genotype x Environmental Effects on Yielding Ability and Seed Chemical Composition of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Varieties Grown in North Dakota, USA. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(12), 1417–1425. <https://doi.org/10.1002/aocs.12291>
- Leizer, C., Ribnicky, D. M., Poulev, A., Dushenkov, D., & Raskin, I.** (2000). The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*, 2(4), 35–53. https://doi.org/0.1300/J133v02n04_04
- Leson, G.** (2003). Nutritional Profile and Benefits of Hemp Seed , Nut and Oil. *The Veto Hemp Report, USA/Brattleboro*, 1540–1580.
- Li, X., Wang, S., Du, G., Wu, Z., & Meng, Y.** (2013). Variation in Physical and Mechanical Properties of Hemp Stalk Fibers Along Height of Stem. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.043>
- Lukhele, S. T., & Motadi, L. R.** (2016). Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1280-0>
- Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., & Parolaro, D.** (2013). Cannabidiol as Potential Anticancer Drug. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), 303–312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x>
- Mikulcova, V., Kasparkova, V., Humpolicek, P., & Bunkova, L.** (2017). Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions. *Molecules*, 22(700), 13. <https://doi.org/10.3390/moleküller22050700>
- Nasir, B., Fatima, H., Ahmed, M., Phull, A.-R., & Ihsan-ul-Haq.** (2017). Cannabis: A

- Prehistoric Remedy for the Deficits of Existing and Emerging Anticancer Therapies. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 2(3), 82–93. <https://doi.org/10.14218/JERP.2017.00012>
- Nigro, E., Formato, M., Crescente, G., & Daniele, A.** (2021). Cancer Initiation, Progression and Resistance: Are Phytocannabinoids from *Cannabis sativa* L. Promising Compounds? *Molecules*, 26, 20. <https://doi.org/10.3390/molecules26092668>
- Özenoğlu, S., Aydoğdu, G., Dinçsoy, A. B., Taghidizaj, A. A., Derici, K., Yılmaz, E., Aras, S., & Cansaran-Duman, D.** (2013). Liken Sekonder Bileşiklerinin Farklı İnsan Kanseri Hücre Tipleri Üzerine Antikanserojenik Etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70(4), 215–226. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2013.37167>
- Özkara, G., Öztürk, O., & Atdoğan Yılmaz, H.** (2020). Kanser ve Metastaz : Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi. *Experimed 2020*, 10(1), 38–48. <https://doi.org/10.26650/experimed.2020.0003>
- Parsa, N.** (2012). Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iranian Journal of Public Health*, 41(11), 9.
- Paslı, R.** (2021). Bazı Yerli Kenevir (*Cannabis sativa* L.) Genotiplerinin Verim Durumu ile Morfolojik, Fizyolojik ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*, 62.
- Petrovici, A. R., Simionescu, N., Sandu, A. I., Paraschiv, V., Sillion, M., & Pinteala, M.** (2021). New insights on hemp oil enriched in cannabidiol: Decarboxylation, antioxidant properties and in vitro anticancer effect. *Antioxidants*, 10(5), 24.
- Rapa, M., Ciano, S., Rocchi, A., D'Ascenzo, F., Ruggieri, R., & Vinci, G.** (2019). Hempseed oil quality parameters: Optimization of sustainable methods by miniaturization. *Sustainability (Switzerland)*, 11(11), 30–35. <https://doi.org/10.3390/su11113104>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L.** (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual (Internet)*.
- Ruxton, G. D.** (2006). The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behavioral Ecology*, 17(4), 688–690.

<https://doi.org/10.1093/BEHECO/ARK016>

- Şalva, E.** (2019). İki Farklı Gene (VEGF-A ve VEGFR-2) Özgü shRNA İçeren Vektör Tasarımı ve Bunun Meme Kanserinde Gen Susturma Etkinliği Araştırılması. *İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 87.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A.** (2021). Cancer Statistics, 2021 ; *CA Cancer Journal*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Singh, K., Nassar, N., Bachari, A., Schanknecht, E., Telukutla, S., Zomer, R., Piva, T. J., & Mantri, N.** (2021). The Pathophysiology and the Therapeutic Potential of Cannabinoids in Prostate Cancer. *Cancers*, 13(4107), 18. <https://doi.org/10.3390/cancers13164107>
- Small, E.** (2016). Cannabis : A Complete Guide. In E. Small (Ed.), *Cannabis : A Complete Guide* (Vol. 1, p. 598). CRC Press.
- Subak, M., Aksel, N., & Kılıç Öztürk, Y.** (2020). Incidence Of Anemia in Cases With Lung Cancer at The Time Of Diagnosis and Relation Between Cancer Types. *Forbes Journal of Medicine*, 1(1), 11–14. <https://doi.org/10.5222/forbes.2020.09797>
- Subramanian, J., Morgensztern, D., Goodgame, B., Baggstrom, M. Q., Gao, F., Piccirillo, J., & Govindan, R.** (2010). Distinctive Characteristics of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) in the Young: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(1), 23–28. <https://doi.org/10.1097/JTO.0B013E3181C41E8D>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F.** (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A.** (2021). Epidemiology of Lung Cancer. *Wspolczesna Onkologia*, 25(1), 45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
- Thomas, B. F., & ElSohly, M. A.** (2016). The Botany of Cannabis sativa L. In B. F. Thomas (Ed.), *The Analytical Chemistry of Cannabis* (pp. 1–26). Elsevier.
- Trombetta, A., Maggiora, M., Martinasso, G., Cotogni, P., Canuto, R. A., & Muzio, G.** (2007). Arachidonic and Docosahexaenoic Acids Reduce the Growth of A549

- Human Lung-Tumor Cells Increasing Lipid Peroxidation and PPARs. *Chemico-Biological Interactions*, 165(3), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.014>
- Turan, H., Erkoyuncu, İ., & Kocatepe, D.** (2013). Omega-6, Omega-3 Yağ Asitleri ve Balık. *Yunus Araştırma Bülteni*, 2, 45–50.
- Tutuş, A., Çiçekler, M., Yemşen, B., Bilgiç Kara, S., & Sözbir, T.** (2020). Kenevir (*Cannabis sativa* L.) Saplarından Kağıt Hamuru ve Kağıt Üretiminin Araştırılması. *Turkish Journal of Forestry | Türkiye Ormancılık Dergisi*, 22(3), 311–317. <https://doi.org/10.18182/tjf.958584>
- Ünal, H.** (2019). Kenevir Yağının Kullanım Alanları. In Ş. Karataş (Ed.), *Endüstriyel Kenevir Forumu I-II* (p. 160). İstanbul Aydın Üniversitesi Yayınları.
- Url-1.** (n.d.). Kenevir Tohumu Türleri ve Özellikleri. Retrieved May 17, 2022, from <https://www.tohum.gen.tr/kenevir-tohumu.html>
- Url-2.** (n.d.). Kenevir Tohumu Yağının Faydaları Nelerdir? Retrieved May 18, 2022, from <https://www.kenevir.com/post/kenevir-tohumu-yaginin-faydaları-nelerdir>
- Üstüner, C., & Entok, E.** (2019). Experimental Animal Models for Lung Cancer. *Nuclear Medicine Seminars*, 5, 40–48. <https://doi.org/10.4274/nts.galenos.2019.0006>
- Yağcı, E.** (2015). NOTCH3 C381T Ve G684A Polimorfizmlerinin Akciğer Kanseri İlişkisini Belirlenmesi. *Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 69.
- Yalçın, Ş., & Sarı, E.** (2015). Kanserde Bireyselleştirilmiş Tedavilere Genel Bakış. *Nuclear Medicine Seminars*, 1(2), 128–135. <https://doi.org/10.4274/nts.2015.20>
- Yao, Q. H., Zhang, X. C., Fu, T., Gu, J. Z., Wang, L., Wang, Y., Lai, Y. B., Wang, Y. Q., & Guo, Y.** (2014). ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit the Proliferation of The Lung Adenocarcinoma Cell Line A549 İn Vitro. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 401–406. <https://doi.org/10.3892/MMR.2013.1829/HTML>
- Yıldırım, S., & Koca Çalışkan, U.** (2020). Kenevirin Sağlık Alanında Kullanımı. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 44(1), 112–136. <https://doi.org/10.33483/jfpau.559665>
- Yokuş, B., & Çakır, D. Ü.** (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7–18.

- Zajac, M., Guzik, P., Kulawik, P., Tkaczewska, J., Florkiewicz, A., & Migdal, W.** (2019). The Quality of Pork Loaves With the Addition of Hemp Seeds, De-hulled Hemp Seeds, Hemp Protein and Hemp Flour. *LWT*, 105, 190–199. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.02.013>
- Zamani, A. G., & Zamani, A.** (2013). MikroRNA'lar ve Akciğer Kanseri. *Tuberk Toraks*, 61(1), 57–62.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : ZEYNEP YAMAN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Dicle Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik

MESLEKİ DENEYİM:

- 2018 yılında Diyarbakır'da, Gazi Yaşargil Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genetik Laboratuvarında staj.
- 2021-2022 Eğitim Öğretim Yılında, 85. Yıl Milli Egemenlik Anadolu Lisesi Diyarbakır'da Öğretmenlik stajı.