



**T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI**

**OLEANOLİK ASİTİN MODEL ORGANİZMA
Drosophila melanogaster VE KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK VE
MOLEKÜLER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞERİF YASİN KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2021



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

**OLEANOLİK ASİTİN MODEL ORGANİZMA
Drosophila melanogaster VE KANSER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK VE
MOLEKÜLER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞERİF YASİN KÖKSAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

**Doç.Dr.Serap Yalçın Azarkan
Doç.Dr.Fahriye ERCAN (Eş Danışman)**

KIRŞEHİR / 2021

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin **ZRT.A4.20.015** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ŞERİF YASİN KÖKSAL



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Yüksek Lisansa başlamamda ve yüksek lisans ders sürecinde kendisini tanıdığım günden bu yana gösterdiği sakin ve sabırlı hali ile her zaman bana örnek olmasının yanı sıra bir bilim insanının nasıl çalışması gerektiğini kendisinden öğrendiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışmalarında bana yardımcı olan eş danışmanım Doç. Dr. Fahriye ERCAN'a teşekkürlerimi içtenlikle sunarım.

Tezimi, ailem başta olmak üzere özellikle oğlum Arslan KÖKSAL' a ithaf ederim.

Eylül, 2021

ŞERİF YASİN KÖKSAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO DİZİNİ.....	..vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	..vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. Fitoterapi.....	2
2.1.1. Sekonder Metabolitler	3
2.1.2. Terpenler ve Terpenoidler	5
2.1.3. Oleanolik Asit	6
2.1.4. Oleanolik Asitin Biyosentezi	10
2.1.5. Oleanolik Asitin Tespiti	11
2.1.6. Farmakolojisi	11
2.1.7. Oleanolik Asitin Kimyasal Türevleri	12
2.1.8. Oleanolik Asitin Biyoyararlanımı	12
2.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.3. Kanser	16
2.3.1. Kanserin Tedavisi	17
2.3.2. Radyoterapi.....	17
2.3.3. Kemoterapi	18
2.3.4. Kök Hücre Tedavisi	19
2.3.5. Hormonal Tedaviler	19
2.3.6. Cerrahi Yöntemler.....	20
2.3.7. Biyolojik Tedaviler	20
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	22
4. MALZEME VE YÖNTEM	25
4.1. Materyal.....	25
4.1.1. Hücre Hatları	25
4.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler.....	25
4.1.3. Kullanılan Makine ve Teçhizatlar.....	26

4.2. Metod	27
4.2.1. Hücre Kültürü	27
4.3.1.1 MCF-7 ve MCF-10A Hücre Hattının Geliştirilmesi	27
4.3.1.2 Hücrelerin Pasajlanması	28
4.3.1.3. Tripan Mavisini ile Hücre Sayımı	29
4.3.1.4. Sitotoksikite Analizi	29
4.2.2. Kanser ve Normal Meme Hücre Hattında RNA İzasyonu	30
4.2.2.1. cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analiz	31
4.2.3. <i>D. melanogaster</i> Ortam Hazırlama ve Aktarma	33
4.2.3.1. Oleanolik Asidin <i>D. melanogaster</i> Uygulamaları.....	34
4.2.3.2. <i>D. melanogaster</i> RNA İzasyonu ve Gen Düzeyi Analizi.....	36
5. BULGULAR.....	39
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	55

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.Suda ve Yağda Çözünen Sekonder Metabolitler ve Bitkilerde Depolandıkları Yerler [9].	4
Tablo 2. Oleanolik Asitin Bitkisel Ürünlerdeki Miktarları [17].	8
Tablo 3. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler	25
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat.	26
Tablo 5. Horse Serum 1000 ml/ DMEM/ F12 (Besiyesi İçin)	28
Tablo 6. Amplifikasyon Koşulları	32
Tablo 7. Oleanolik Asit Uygulanan <i>D. melanogaster</i> larvalarının LC ₅₀ ve LC ₉₉ Değerleri	35
Tablo 8. <i>D. melanogaster</i> ve <i>Homo sapiens</i> Çalışılan Genler	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Oleanolik Asit Yapısı [25].....	7
Şekil 2. Oleanolik Asitin Biyosentezi [38].....	10
Şekil 3 <i>D.melanogaster</i> Evreleri [60]	14
Şekil 4. Erkek (alt) ve Dişi (Üst) <i>D.melanogaster</i> [60].....	15
Şekil 5. MCF-7 Hücreleri.....	27
Şekil 6. Hücrelerden Elde Edilen Total RNA (%1 Agaroz Jelde Yürütülmüştür).	31
Şekil 7. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon Muhtemel Basamakları [86]. ...	33
Şekil 8. <i>D.melanogaster</i> Besiyeri	34
Şekil 9. <i>D. melanogaster</i> Kültürü	34
Şekil 10. <i>D. melanogaster</i> larvaları [97].....	36
Şekil 11. RNA İzalasyonu Öncesi Homojenize edilen Larva Örnekleri [97].	37
Şekil 12. Oleanolik asit hücreler üzerinde LC ₅₀ değerini belirlemek için yapılan XXT Analizi	40
Şekil 13. Kontrol MCF-7 Hücre Hatları	40
Şekil 14. Oleanolik Asit Uygulaması Yapılmış MCF-7 Hücre Hatları	41
Şekil 15. Oleanolik asit MCF-7 kanser hücre üzerindeki toksisite grafiği (LD ₅₀ : 20µM)...	41
Şekil 16. Oleanolik asit MCF-10A normal meme hücre hattı üzerindeki toksisite grafiği (LD ₅₀ : 120 µM).....	42
Şekil 17. <i>D. melanogaster</i> DR-CG ₁₅₅₃₀ gen ifade düzeyleri	42
Şekil 18. <i>D. melanogaster</i> DR-PN gen ifade düzeyleri	43
Şekil 19. <i>D. Melanogaster</i> DR-AKT1 gen ifade düzeyleri.....	43
Şekil 20. <i>D.melanogaster</i> DR-BUFFY gen ifade düzeyleri.....	44
Şekil 21. MCF-7 hücre hatlarında BAD gen ifade düzeyleri	44
Şekil 22. MCF-7 hücre hatlarında BCL-2 gen ifade düzeyleri	45
Şekil 23. MCF-7 hücre hatlarında AKT-1 gen ifade düzeyleri	45
Şekil 24. MCF-7 hücre hatlarında H- Prune gen ifade düzeyleri	46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	:Derece Santigrat
C	:Karbon
CAS	:Sikloartenol sentez
cDNA	:Komplementer DNA
CO ₂	:Karbondioksit
CP	:Sabit basınçta özgül ısı
dH ₂ O	:Distile Su
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
Dnaz	:Deoksiribonükleaz
Dntp	:Dinükleotittrifosfat
Dw	:Kuru Madde
FID	:Gaz Kramtografisi
Fw	:Taze Ağırlık
G	:Gram
GC	:Gaz Kromatografisi
HPLC	:Kromatografisi high performance liquid chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
iNOS	:Nitrik Oksit Sentaz
K	:Potasyum
L	:Litre
LC	:Lethal Concentraion (Öldürü Konsantrasyon)
MCF-7	:İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
Mg	:Miligram
MI	:Mililitre
Mm	:Milimetre
MS	:Kütle Spektrometrisi
Nd	:Tespit Edilemedi
Nrf2	:Nükleer Faktör Eritroid 2
OSC	:Oksidoskualen Siklaz
PBS	:Phosphate Buffered Saline
PCR	:Polymerase Chain Reaction
RNA	:Ribonükleik Asid
RNaz	:Ribonükleaz
ROS	:Realtif Oksijen Türleri
RT-PCR	:Rel Time Polymerase Chain Reaction
TOS	:Total Oksidatif Seviye

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OLEANOLİK ASİTİN MODEL ORGANİZMA *Drosophila melanogaster* VE KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK VE MOLEKÜLER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞERİF YASİN KÖKSAL

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serap Yalçın Azarkan

Eş Danışman: Doç.Dr.Fahriye Ercan

Bilim insanları son yıllarda bitkilerin yapısında doğal olarak bulunan ve bitkilerde sekonder metabolit olarak salgılanan bileşiklere giderek ilgi duymaktadır. Bu bileşiklerden elde edilen maddelerin günlük kullanımı yanı sıra kanser gibi hastalıklara karşı tedavisinde terapötik olarak kullanılabilmesine yönelik çalışmalar yapmaktadır. Bu bileşiklerden biri olan oleanolik asit betulinik aside bağlı doğal olarak oluşan bir pentasiklik triterpenoiddir. Triterpenoid bileşiklerin farmokolojik etki potansiyeline sahip olduğu yapılan çalışmalarda ortaya sunulmuştur. Oleanolik asitin de anti kanser, antioksidan, antifungal, antimikrobiyal ve antinflamatuar etkileri bilinmektedir.

Yapılan çalışmada oleanolik asidin insan meme hücre hattı üzerine sitotoksik etkiler belirlenerek ve aynı zamanda iyi bir model organizma olan *Drosophila melanogaster* larvaları üzerine öldürücü etkisi belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada oleanolik asidin 1, 5, 10, 20 mM konsantrasyonlarında çözeltiler yabancı tip *D.melanogaster* III. Instar

larvalarına uygulanmıştır. 10 dişi ve 10 erkek taze besiyerinde 25 °C ve % 60 nem ortamında 24 saat inkübe edilmiştir. Konsantrasyonlarda bulunan maddeler doğrudan larvalar üzerine uygulanmıştır ölüm oranları LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri 10,4 mM ve 32,5 mM olarak belirlenmiştir.

Oleanolik asidin *D. melanogaster* üzerinde CG₁₅₅₃₀, AKT-1, DR-PN gen ifade düzeyleri kontrol grubuna göre uygulanan bütün konsantrasyonlarda anlamlı olarak belirlenmiştir. Ancak DR-Buffy gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. MCF-7 hücre hatlarında ise BAD, BCL-2, H-prune ve AKT-1 gen ifade düzeyi sonuçlarında ise H-prune ve BCL-2 genlerinde anlamlılık tespit edilmiştir.

EYLÜL 2021 55 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Oleanolik asit, *D.melanogaster* MCF-7

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

**INVESTIGATION OF THE CYTOXIC AND MOLECULAR EFFECT
OF OLEANOLIC ACID ON MODEL ORGANISMA *Drosophila*
Melanogaster AND CANCER CELL LINES**

ŞERİF YASİN KÖKSAL

Kırsehir Ahi Evran University

Graduate School of Sciences and Engineering

Molecular Biology and Genetics Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serap Yalçın Azarkan

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr.Fahriye Ercan

In recent years, scientists have become increasingly interested in compounds that are naturally present in the structure of plants and secreted as secondary metabolites in plants. In addition to the daily use of substances obtained from these compounds, it is working to use them therapeutically in the treatment of diseases such as cancer. One of these compounds, oleanolic acid, is a naturally occurring pentacyclic triterpenoid bound to betulinic acid. It has been revealed in studies that Triterpenoid compounds have the potential for farmocological action. Oleanolic acid is also known for its anti-cancer, antioxidant, antifungal, antimicrobial and antinflamatory effects.

The aim of the study was to determine the cytotoxic effects of oleanolic acid on the human breast cell line and to determine the lethal effect of oleanolic acid on the larvae of *Drosophila melanogaster*, a good model organism. In the study, solutions at concentrations of oleanolic acid 1, 5, 10 and 20 mM were found to Be Wild Type *D.melanogaster* III. It has been applied to instar larvae. 10 females and 10 males were incubated 24 hours at 25 °C and 60% humidity in fresh media. Substances found in concentrations were applied directly to larvae death rates LC₅₀ and LC₉₉ values were determined as 10.4 mM and 32.5 mM.

CG₁₅₅₃₀, AKT-1, Dr-PN gene expression levels of oleanolic acid on *D. melanogaster* were significantly determined at all concentrations applied according to the control group. But no significance was observed at the level of expression of the DR-Buffy gene compared to the control group. In MCF-7 cell lines, significance was determined in the H-prune and BCL-2 genes in the bad, BCL-2, h-prune and AKT-1 gene expression level results.

September 2021, 55 Pages

Keywords: Cancer, oleanolic acid, *D.melanogaster* MCF-7

1. GİRİŞ

Oleanolik asit 120'den fazla bitkinin yaprak veya köklerinden izole edilebilen ve doğal olarak gıda maddelerinde bulunan pentasiklik triterpendir. Oleanolik asitin antibakteriyel, antimutajenik, antidiyabetik, antitümöral, antiinflamatuvar, antioksidan etkilerinin yanında kolon, meme, karaciğer kanserleri gibi kanser türlerinde de apoptozisi indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Oleanolik asitin uzun yıllardır Çin'de karaciğer fibrozisi ve siroz gibi karaciğer rahatsızlıklarında kullanıldığı bilinmektedir.

Kanser türleri arasında yaygın olan meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser tipi olmakla birlikte akciğer kanserinden sonra ölüm oranında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanserinin tedavilerinde birçok ilaç kullanımda olmasına rağmen kötü prognozla sonuçlanmaktadır. Son yıllarda geleneksel kanser tedavilerine ek alternatif tıptan köken alan tedaviler popüler olmaktadır.

1.1. Amaç

Çalışmamızda oleanolik asitin;

MCF-7 Kanser hücre hatları üzerine etkisi

Model organizma olan *D. melanogaster* (Meig)(Diptera: *Drosophilidae*) üzerine öldürücü etkisi

Oleanolik asitin CG₁₅₅₃₀, AKT-1, Dr-PN BCL-2, H-Prune ve BAD genleri üzerinde ekspresyonlarının ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Fitoterapi

Bitkiler tarihin çok eski dönemlerinden beri dünya üzerinde yaşamsal faaliyet sürdüren canlılar için vazgeçilmez temel oksijen ve besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin temel besin maddesi olarak kullanılmasının dışında insanlar tarafından çeşitli formlarını giysi, barınma, alet vb. gibi alanlarda kendilerine fayda sağlamak amacıyla kullanmıştır. İnsanoğlu bitkileri hem taze olarak tüketmiş hem de uzun süre saklamak amacıyla kurutma yöntemiyle çeşitli baharatlar olarak da kullanmışlardır. Bitkiler tarihin birçok döneminde insanların çeşitli hastalıklara karşı da tedavi edici olarak kullandıkları bilinmektedir [1-2]. Bitkiler endemik türlerine göre Çin, Hindistan, Mısır, Afrika ve Mezopotamya gibi bölgelerde yaşayan uygarlıkların kendi kültürlerine göre farklı şekilde tedavi yöntemlerine kaynak olmuşlardır [3]. Yapılan araştırmalarda Antik Mısır döneminde kil tabletlerinde bitkisel tedavi yöntemi olarak papirüs, hint otu, ardıç, aloe, kenevir ve sarımsak gibi 800’ den fazla bitkinin kullanıldığı saptanmıştır [4].

Bitkileri kullanılarak hastalıkları tedavi etme yaklaşım fitoterapi terimi olarak ilk kez 1870-1953 yılları arasında yaşamış Fransız Hekim LENCLERC tarafından “La Presce Medice I “ adlı dergide kullanıldığı iddia edilmiştir. Bitkiler antiseptik, antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiviral özelliklerinden dolayı birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. 19-20. yüzyıllarda ise gelişen kimya ve biyokimya bilimleri sayesinde ilaç sanayisinde büyük etkileri gözlemlenmiştir. Zararsızlığı ve doğallığı ile laboratuvar çalışmalarında tıbbın gereksinimlerine yanıt veren birçok bitkisel kökenli ilaç geliştirilmiştir. Hâlen günümüzde kullanılan ilaçların % 25’i bitkisel kökenlidir [5].

Tarih boyunca insanlığın tedavi amacı ile kullandığı bitkisel ilaçların sağladığı faydaların yanında beklenmeyen yan etkileri ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Bu sebeple ortaya çıkabilecek kötü sonuçlara karşın, bitkilere ait bileşenler bilim dünyası için bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu araştırmalar neticesinde bitkisel materyallerin de içerisinde yer alan birçok bileşik son yıllarda tedavi amacıyla kullanılabilme potansiyeli olabileceği düşünülmektedir. Bitki bünyesinde yer alan bu bileşiklerin antioksidan, antikanser, antimutagen, antiinflamatuvar, antiseptik gibi birçok aktiviteye sahip olduğu görülmüştür [6]. Tedavi edici olarak kullanılan bitkilerin içeriğindeki bileşiklerden biri vücuda fayda

sağlarken diğer bileşik veya bileşikler insan vücudunda tahmin edilemeyen etkilere yol açabilmektedir [7]. Bilimsel gelişmeler sayesinde bitkilerden doğrudan elde edilen birçok madde gıda, ilaç, kozmetik ve tekstil gibi alanlarda kullanılabildiği gibi alternatif tıp, fitoterapi ve aromaterapi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır. İnsanoğlu geçmişten bu yana ister istemez bitkilerin içerdikleri bileşiklere doğrudan ya da dolaylı yoldan maruz kalmıştır [6]. Bu sebeple bitki bünyesinde yer alan bileşiklerin kullanım süresi ve dozunun yaratabileceği sorunlar ile karşılaşılması için iyi bir şekilde ayarlanması gerekmektedir.

2.1.1. Sekonder Metabolitler

Bitki bünyesinde ortaya çıkan ürünler primer ve sekonder metabolit olmak üzere ayrılır. Sekonder metabolitler; bitki tarafından üretilen büyüme ve gelişme sırasında işlevi olmayan çok sayıda çeşitli organik maddelerin (aminoasit, şeker ve nükleotidler) dışındaki bileşiklerdir. Primer metabolitlerin karşısı olarak tanımlanan ve bitkiler tarafından üretilen fotosentez sonucu elde edilmeyen, çeşitli birçok mekanizma fonksiyonu sonucu ortaya çıkan ve bitkilerin temel yaşamsal olaylarında görev almayan sekonder metabolitlerin, primer metabolitler üzerindeki etkileri de henüz tam anlamıyla keşfedilmemiştir. Sekonder metabolitler üzerine yapılan çalışmalar sonucunda 100.000'den fazla çeşitliliği olduğu, bu kompleks bileşiklerin organdan organa ve bazen de bitki türleri arasında farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Görülen bu farklılıklar bitki sınıflandırılmasında taksonomik özellik olarak da kullanılabileceği tespit edilmiştir [8].

Daha önceleri bilim insanları sekonder metabolitlerin, bitki yaşamı boyunca değişiklik göstermeden biriken atık ve depo ürünü olduğu görüşüne sahiptiler. Yapılan araştırmalar sonucunda tanenler, ligninler, kauçuk gibi polimerlerin dışında tüm sekonder metabolitlerin değişebileceği görüşü hâkim olmuştur. Bitki bünyesinde büyüme, fotosentez gibi ürün dönüşümü faaliyetlerinde doğrudan ilişkisi olmayan bu yapılar bitki doku, organ ve gelişim kısımlarında spesifik yollarla sentezlenmektedir. Bu metabolitler bitki organlarında farklı yoğunluk oranlarında depolanabilmektedir.

Sekonder metabolitler spesifik olarak sentezlendikleri yerlerde depolanması zorunlu değildir. Yapılan çalışmalarda floem, ksilem ve apoplast yolu ile uzak mesafelere taşındığı tespit edildiği gibi sekonder metabolitlerin yağda ve suda çözünmediği hidrofilik bileşiklerin vakuolde, lipofilik bileşiklerin ise reçine kanallarında depolandığı tespit edilmiştir [9].

Tablo 1.Suda ve Yağda Çözünen Sekonder Metabolitler ve Bitkilerde Depolandıkları Yerler [9].

Bitki Depo Bölgeleri	Suda Çözünenler		Bitki Depo Bölgeleri	Yağda Çözünenler
Vakuol	Alkoloidler	Saponinler	Kutikula	Mumlar
	Glikozitler	Flavonoidler		Lipofilik
	Antosianinler	Aminler		Flavonoidler
	Taninler			Terpenoidler
Latisifer	Alkoloidler	Kardiyak	Tüylar	Monoterpenler
				Sesquiterpenler
			Reçine Kanalları	Terpenoidler
				Lipofilik
				Flavonoidler
			Latisifer	Politerpenler
Hücre Duvarı	Taninler	Glikozitler		Diterpenler
				Lipofilik
				Flavonoidler
			Yağ	Antaquinone
				Hiperisin
				Terpenoid
			Plastid	Ubiquinone

			Membran	Teraterpenler
--	--	--	---------	---------------

Sekonder metabolitler; kimyasal yapıları, farklı çözücülerdeki çözünübilirlik düzeyleri veya sentez şekillerine göre sınıflandırılabilir. Basit sınıflandırmaya göre,

- Terpenler (Mevalonik asitten üretilir karbon ve hidrojenin birleşmesi ile oluşur)
- Fenolikler (Basit şekerlerden oluşur hidrojen oksijen ve benzen halkaları içerir)
- Nitrojen içerikli (Sülfür içerebilirler oldukça çeşitlidir) olmak üzere 3 gruba ayrılabilinmektedir [8].

Bitkilerde bulunan önemli sekonder metabolitler

- Alkolodidler
- Flavonoidler
- Glikozitler
- Fenilpropanoidler
- Terpenler ve Terpenoidler

2.1.2. Terpenler ve Terpenoidler

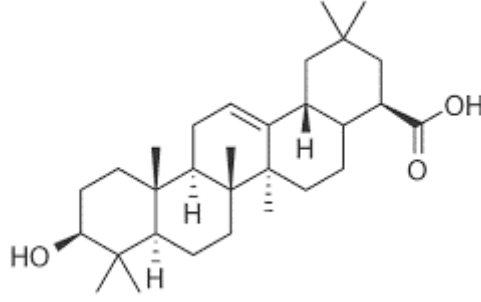
İzopren birimlerinden oluşan terpenler, $(C_5H_8)_n$ formülüne sahiptir. Terpenlerin temel yapısı izopren (2- metil büta-1,3-dien) polimerlerdir. 5 karbon ve 2 çift bağ içeren kısa karbonlu bileşiklerdir. Terpenler, sekonder metabolitler içerisinde belirlenmiş en yaygın ve en geniş grubu oluşturmaktadır. Terpenler genellikle bitkisel kökenli olup köknar (*Abies*), ladin (*Picea*), çam (*Pinus*), ardıç (*Juniperus*) gibi iğne yapraklı bitkilerde esansiyel yağ, reçine, mum, kauçuk gibi ürünlerin ana bileşimidir [9]. Terpenler antioksidan, antitumör ve antikarsinogen özelliklerinden dolayı biyolojik olarak aktif bileşiklerin kaynağını oluşturmaktadırlar [10]. Bu özellikleri sayesinde fitoterapi ve aromaterapi gibi alternatif tıp alanlarında ilgi çekmektedir. Terpenler iğne yapraklı bitkiler dışında sardunya (*Pelargonium sp.*), hindistan cevizi (*Myristica fragrans*), keklik otu (*Origanum vulgares sp.*) kekik (*Tyhmus vulgaris*) gibi çeşitli bitki türlerinden de elde edilmektedir [11].

İçerdikleri izopren birim sayısına göre terpenlerin sınıflandırılması;

- Hemiterpenler
- Monoterpenler
- Seskiterpen
- Diterpen
- Sesterpen
- Triterpen
- Tetraterpen
- Politerpenler olmak üzere ayrılırlar

2.1.3. Oleanolik Asit

Bitkilerden doğrudan ya da sekonder metabolit olarak izole edilen bileşiklerin birçok hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde, sentetik olarak kullanılan moleküllere kıyasla daha az yan etkileri olması nedeni ile daha çok tercih edilmektedir. Oleanolik asit bir çok gıda ve tıbbi aromatik bitkiler de dahil olmak üzere 120'den fazla bitki türünden izole edilen aktif pentasiklik bir triterpenoid bileşiktir [12]. 1- bütanol ve etil asetatta çözünen uçucu olmayan açık sarı renkte bir bileşiktir. Etanol, 2-propanol, metanol, aseton ve suda daha az çözüldüğü tespit edilmiştir. Triterpenoid bileşiklerin büyük bir farmakolojik etki potansiyeline sahip olduğu ve bitkilerdeki biyosentetik yolları araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Oleanolik asitin kimyasal adı 3-β-hidroksi-olea-12-en-28-oik asittir. Oleanolik asit yapısı şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 1. Oleanolik Asit Yapısı [25].

Bitkilerdeki oleanolik asit hem serbest formunda hem de bir veya daha fazla şeker grubuna bağlı triterpenoid saponinlerin bir aglikonu olarak meydana gelmektedir. Serbest haliyle, bitki biyotik ve abiyotik stres yanıtlarında yer aldığı, bitkilerin kutikula tabasında mumsu yapılarda bulunduğu tespit edilmiştir [13].

Bitkilerde ve bitki bazlı gıdalarda, oleanolik asit genellikle izomeri ursolik asit ile birlikte bulunmakta ve E halkasındaki metil grubunun bölgelerine göre farklılık göstermektedir [14]. Her iki izomer de benzer farmakolojik özelliklere sahiptir. Metil gruplarındaki farklılık nedeni ile biyolojik aktivitenin yoğunluğunda farklılık gösterirler, bu da potansiyellerini ve dolayısıyla bileşiklerin biyo-aktivitesini etkilemektedir [15],[16].

Yapılan araştırmalarda Oleanolik asit triterpenoidlerinin intrakutiler balmumu bölmesinde yoğunlaştığı bu nedenle meyve kabuklarında, posalarda daha çok bulunduğu tespit edilmiştir. Genel olarak kurutulmuş meyveler de dâhil olmak üzere kabukla tüketilen meyveler, oleanolik asit için daha iyi beslenme kaynakları olmaktadır [17].

Tablo 2. Oleanolik Asitin Bitkisel Ürünlerdeki Miktarları [17].

Meyveler	Analiz Edilen Bölüm	Oleanolik Asit Konsantrasyonu	Yöntem
Elma	Kabuk	16 µg/g.dm	HPLC-DAD
	Posa	28 µg/g.dm	
	Yenilebilir meyvede	nd	
Nar	Kabuk	29.96 ± 0.93 µg/g.dw	HPLC-DAD
	Tohum	1.12 ± 0.09 µg/g.dw	HPLC-DAD
Limon	Yenilebilir meyvede	nd	HPLC-DAD
	Kabuk	0.62 ± 0.01 µg/g.dw	HPLC-DAD
Mandalina	Yenilebilir meyvede	nd	HPLC-DAD
	Kabuk	1.05 ± 0.04 µg/g.dw	
Yaban Mersini	Bütün meyvede	1679,2–2029,6 µg/g.dw	GC-MS-FID
Armut	Kabuk	164,3–3066,6 µg/g.fw	HPLC-PAD
	Posa	34,0–156,0 µg/g.fw	HPLC-PAD
Üzüm	Kabuk	176.2 µg/g.dw	HPLC-FD
Trabzon Hurması	Kabuk	367.7 µg/g.dw	HPLC-FD
	Yenilebilir meyvede	17,2 µg /g.dw	HPLC-FD
Hünnap	Posa	360± 10,7 µg/g.dw	UHPLC-
Zeytin	Kabuk	3094–4356 µg/g.fw	MS/MS
	Posa	27–29 µg/g.fw	HPLC-DAD
	Çekirdek	nd	

kuru madde, dw: kuru ağırlık, fw: taze ağırlık, nd: algılanamadı.

Özellikle Zeytingiller (*Oleaceae*) familyasına ait bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. *Oleaceae* familyasının en önemli türleri arasında gösterilebilecek zeytin; oleanolik asit kaynağıdır [18]. Zeytine ek olarak çeşitli baklagiller, hünnap gibi akdeniz diyetinde yaygın olan yiyecekler oleanolik asit içermektedirler. Ginseng (*Panax sp.*) ağaç minesini (*Lantana camara L.*) gibi tıbbi aromatik bitkilerin kökleri de oleanolik asit bakımından zengindir. Alıç meyveleri (*Crataegus sp.*), kurtbağrı meyveleri (*Ligustrum lucidum*) ve Çin ayvası (*Chaenomeles sinensis*) geleneksel tıp tedavilerinde kullanılan diğer bitkiler arasında iyi bir oleanolik asit kaynağı olarak öne çıkmaktadır [19-22].

Yapılan araştırmalarda aslında birçok tıbbi aromatik bitkinin oleanolik asit içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. *Lamiaceae* familyası üzerinde yapılan büyük ölçekli bir çalışmada 88 taksonda varlığını göstermiştir [23]. Oleanolik asit ayrıca bitkisel yağlarda, propoliste, kuruyemişlerde ve baharatlar da dâhil olmak üzere birçok bitkisel kaynaklı gıda ürününde tespit edilmiştir [24-26].

Genellikle oleanolik asit birçok farmakolojik özelliği paylaştığı izomeri ursolik asit (3- β -hidroksiüre-12-en-28-oik asit) ile birlikte bulunmaktadır [27]. Oleanolik asit gibi konjuge olmayan triterpenoidler genellikle bitkilerin kutikula tabakasında mumsu yapıda bulunur ve su kaybını önleyerek patojenlere karşı ilk savunma bariyeri görevini görür [28]. Zeytin yapraklarındaki oleanolik asit bitkilerdeki fungal hastalıklara karşı fiziksel bir koruma bariyeri oluşturan saf kristaller olarak görev yapmaktadırlar [29]. Oleanolik asit sadece serbest bir asit olarak görülmemektedir. Bunun yanında bir veya daha fazla şeker zincirine bağlı olduğu triterpenoid saponinler için bir aglikon öncüsü olarak bitkilerde çeşitli glikoformlarda bulunan oleanolik asit ilk başlarda etkisiz kabul edilse de son yıllarda düşük toksisitesi ve göstermiş olduğu farmakolojik etkileri sayesinde dikkatleri üzerinde toplanmıştır. Oleanolik asitin antibakteriyal, antidiyabetik, antiparazitik ve antiinflamatuvar aktiviteleri olduğu ortaya konmuştur [30], [31].

Pentaksiklik triterpenoid bileşiklerin; antioksidan, antiviral, antiparazitik, antimikrobiyal ve antitümöral aktiviteleri başta olmak üzere insan sağlığı için önemli biyolojik yararlığa sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur [32].

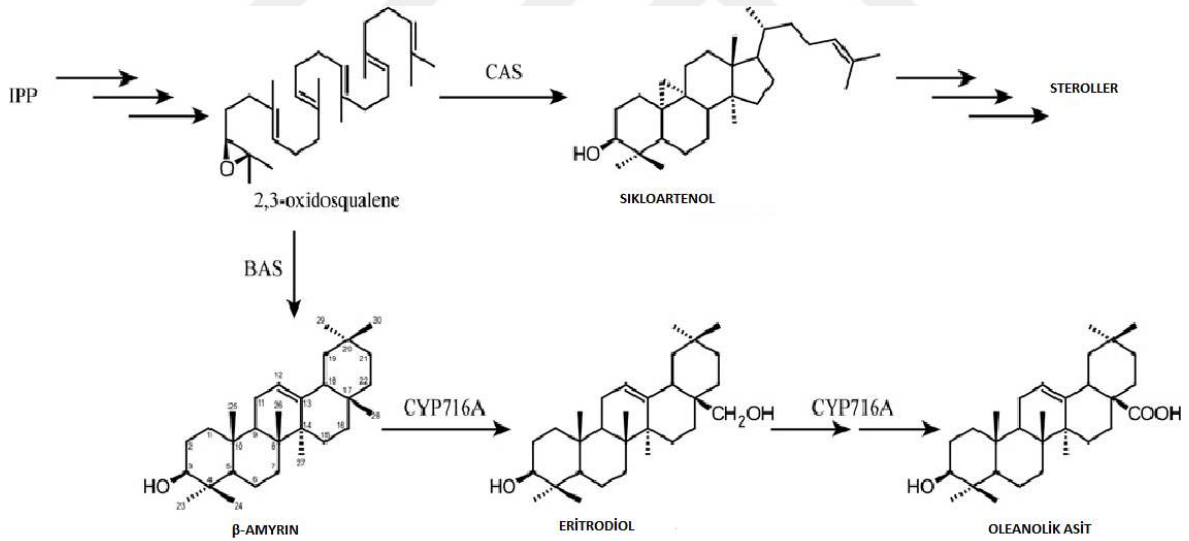
Triterpenoidlerden olan oleanolik asit siroz, karaciğer fibrozisi karaciğer rahatsızlıklarında uzun yıllardan beri Çin'de tedavi edici bileşik olarak kullanılmaktadır. Düşük toksisitesi ve

göstermiş olduğu farmakolojik etkileri sebebiyle dikkat çekmiştir. Bunun yanında oleanolik asitin kolon kanseri, meme kanseri ve akciğer kanseri gibi birçok tümör hücrelerini baskıladığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [33], [34].

Oleanolik asitin antienflamatuar etkisi ilk olarak 1960' larda Gupta ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [35].

2.1.4. Oleanolik Asitin Biyosentezi

Bir triptenoid olan oleanolik asit sterol, steoid ve triterpenoid saponinleri içeren yapısal olarak çeşitli doğal ürünlerden elde edilen geniş bir gruba aittir [36]. Bitki hücrelerinde, primer sterol metabolizmasının öncü molekülü olan 2,3-oksidoskualen, mevalonat (metabolik bir yolak) yolundan türetilen izopentenil pirofosfattan sitozolde sentezlenir [37]. Primer sterol ile sekonder triterpenoid metabolizması arasında dallanma noktası oluşturur ve oleanolik aside yol açar. Bitkisel sterollerin biyosentezi için 2,3-oksidoskualen, tetrasiklik bitkisel strel öncüsü olan sikloartenol verecek şekilde sikloartenol sentez (CAS) ile siklize edilir [38].



Şekil 2. Oleanolik Asitin Biyosentezi [38].

Bitkilerin oluşmasına öncülük eden CAS, sekonder metabolitlerde mevcut olan bitki oksidoskualen siklazlarının (OSC) atalarından kalma bir enzimdir [39]. Oleanolik asit biyosentezi için 2,3-oksidoskualen, OSC β-amyrin sentaz (BAS) tarafından pentasiklik oleanan tipi bir omurga baminerine siklize edilir. (BAS) ilk olarak tıbbi aromatik bitkilerden olan ginseng daha sonra zeytin gibi çeşitli bitkilerden elde edilmiştir [40]. Oleanolik asitin

son aşamasında β -amyrin, sitokrom P-450 enzimi tarafından üç aşamalı oksidoasyonda oksitlenir ve oleanolik asit elde edilir [41], [42].

2.1.5. Oleanolik Asitin Tespiti

- Bitkisel pentasiklik tripertenoidlerin ayrılması ve belirlenmesi için çeşitli analitik teknikler kullanılmaktadır. Bunlar;
- İnce Tabaka Kromatografisi(TLC)
- Sıvı Kromatografi (LC)
- Kapiler Elektroforez (CE)
- Alev İyonizasyonu veya Kütle Spektrometresi (MS)
- Gaz Kromatografisi (GC)

Bu yöntemler içerisinde Kütle Spektrometresi (MS) ile Gaz Kromatografisi (GC) oleanolik asit ve ursolik asit gibi benzer yapılara sahip izomerlerinin ayrılması ve yapılarının belirlenmesi açısından en iyi yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle beraber oleanolik asitin yüksek moleküler ağırlığı ve polaritesi ayrıca düşük uçuculuğu nedeniyle, Gaz Kromatografisi analizinden önce sililasyon, asetilasyon veya metilasyon yoluyla çoğaltmak zorunludur [43], [44].

2.1.6. Farmokolojisi

Oleanolik asitin önemli farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan biri olan hepatoprotektif (Karaciğer koruma) etkisidir. Ayrıca oleanolik asitin sadece karaciğer hasarlarından koruma etkisi olmadığı, aynı zamanda karaciğer de kronik hastalıklardan olan fibroz ve sirozdan da koruduğu tespit edilmiştir. Bu karaciğeri koruma özellikleri Çin’de viral hepatit gibi karaciğer bozuklukları için insanlara reçetesiz bir ilaç olarak kullanılmaktadır [45]. Oleanolik asitin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak antioksidan ve detoksifiye edici enzimlerinin temel bir transkripsiyonel düzenleyicisi olan Nrf2’ nin nükleer birikimini arttırdığı ve böylelikle karaciğerin korunmasında yol oynayan Nrf2’ ye bağımlı genlerin aktif olmasına yol açtığı gösterilmiştir [46], [47].

Oleanolik asitin karaciğer koruma ve antioksidan etkilerinin yanı sıra antikanser ve antiinflamatuvar aktiviteleri olduğu yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir [48]. Ayrıca Oleanolik gibi triptenoidler apoptozu indükleyerek antiinflamatuvar aktiviteleriyle tümör ortamını modüle ederek kanser hücrelerini hedef alır. İnflamasyonda yer alan temel bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, kanser hücrelerinde yaygın olarak çok fazla bir biçimde ekspres edilir. Böylece tümör hücrelerinin apoptozu bastırılır ve kanser proliferasyonu için faydalı bir ortam oluşturur [49]. Birçok çalışmada oleanolik asitin anti inflamatuvar ve antikanser potansiyelleri gösterilmiştir. Ancak kesin etki mekanizması halen keşfedilmeyi beklemektedir [50].

2.1.7. Oleanolik Asitin Kimyasal Türevleri

Doğasında var olan farmakojik aktivite potansiyeli, bulunabilirliği ve düşük üretim maliyetleri nedeniyle, oleanolik asit daha fazla sentetik modifikasyonlara dönüştürülebilmesi için başlangıç molekülü olarak kabul edilebilmektedir [51]. Oleanolik asitin üç aktif kısmı C-3 Hidroksi, C-12 C-13 çift bağı ve C-28 karboksilik asit üzerindeki kimyasal modifikasyonu bir dizi yeni sentetik oleanan triptenoidlere yol açabilmektedir. Bunlar oleanolik asit ile karşılaştırıldıklarında bileşiklerin birkaçının iltihaplanma sürecinde kilit rol oynayan bir enzim türü olan uyarılabilir Nitrik Oksit Sintaz (iNOS) sentezini bloke etme potansiyelini artırdığı gözlemlenmiştir [52].

2.1.8. Oleanolik Asitin Biyoyararlanımı

Oleanolik asit gibi bitkisel temelli bileşenlerin biyoyararlanımları yani biyolojik etkileri yalnızca belirli gıdalardaki miktarlarıyla doğru orantılı değildir. Biyoyararlanım bir bileşiğin vücuda verildiğinde dolaşım sistemine girip emilme ve vücuttaki etki yerine ulaşabilme hızı ve derecesi olarak tanımlanabilir. Yapılan çalışmalarda oleanolik asitin bozulmamış haliyle insan vücudunda alınmasından birkaç saat sonra kanda bulunduğu bildirilmiştir [53]. Ancak oleanolik asitlerin suda çözünürlüğünün düşük olması ve sitokrom P450 izoenzimleri (CYP) yoğun metabolik etkilerinden dolayı oral yollardan alındığında biyoyararlanımlarının düştüğü, tespit edilmiştir [54]. Oleanolik asitin oral yollardan alındığında biyoyararlanımlarını tespit etmek üzere yapmış oldukları bir çalışmada farelerde sadece % 0,7 olduğunu tespit etmiştir [55]. Diğer bir ifade ile de biyoyararlanımın sadece bir bileşiğin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olmadığı, tüketilen gıdalarda bulunan diğer mikro ve makro bileşiklerin mevcut bileşiğin

biyoyararlanım ve metabolizmasını etkilediği gerçeğidir. Bu nedenle son yıllarda çözünürlüğünü arttırabilecek kompleksler ve formülasyonlar oluşturmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Endüstriyel alanda ve fitoterapi gibi alternatif tıp yöntemlerinde tercih edilebilen oleanolik asitlerin olumsuz biyolojik aktivitelerinin incelenebilmesi amacıyla model organizma olarak tercih edilen *D. melanogaster* üzerinde ve normal insan meme hücresi üzerindeki sitotoksitesi genler üzerindeki ekspresyonları araştırılacaktır.

2.2. *Drosophila melanogaster*

Model organizmalar, biyolojik araştırmaların ve süreçlerin daha iyi bir şekilde anlaşabilmesi için çalışmalarda kullanılan canlılardır. Bu tür organizmaların laboratuvar ortamlarında çoğaltılması ve beslenmesi diğer organizmalara göre nispeten daha kolay olmasından dolayı çalışılması zor olan organizmaların biyolojik süreçlerini anlamada kilit rol oynamaktadırlar. Latince adı *D. melanogaster* olan meyve sineği model organizma olarak tercih edilen ve biyolojik araştırmalarda özellikle moleküler genetik, gelişim biyolojisi, popülasyon genetiği, nörofarmakolojik ve genetik toksikoloji gibi birçok araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

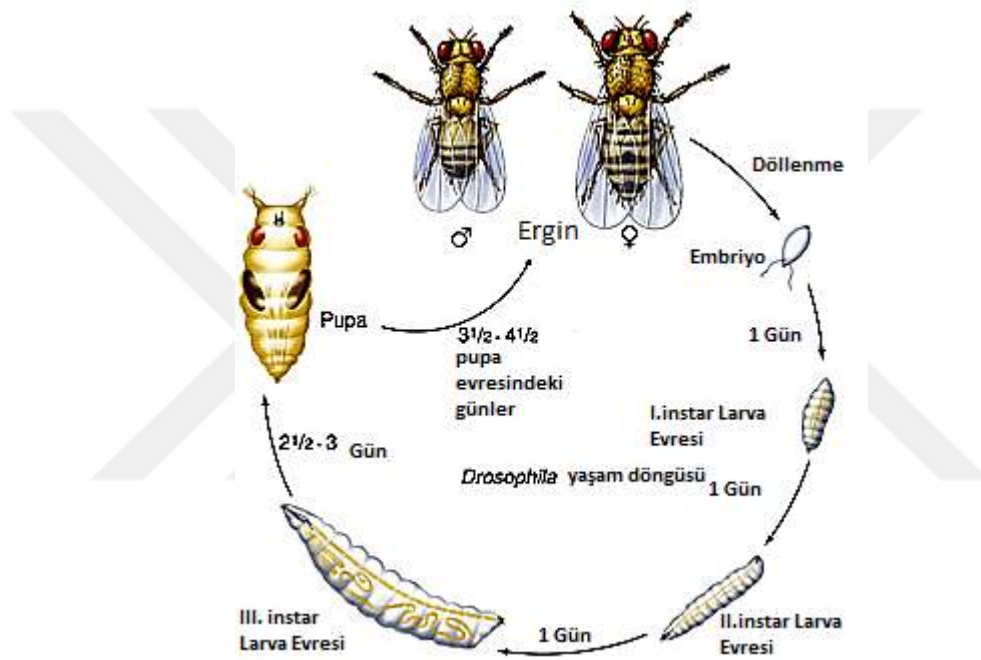
D. melanogaster, 19.y.y'da Dipteryoloji' nin babası olarak bilinen Johann Wilhem Meigen tarafından 1830 yılında tanımlanmıştır. İlk kez 1910 yılında Amerikalı Zooloji ve Genetik uzmanı "Thomas Hunt Morgan" tarafından kullanılmıştır. Kromozomlarının haritalama potansiyelini ilk fark eden kişidir. Tüm DNA dizilimi 2001 yılında tamamlanan *D. melanogaster*'in 14.000 gen ve 165 milyon baz çiftine sahip olduğu tespit edilmiştir [56].

D. melanogaster 100 yılı aşkın süredir model organizma olarak tercih edilmektedir. Bu böceğin model organizma olarak kullanılmasının birçok nedeni vardır;

- İnsan gen dizilimleri ile olan ortak özellikleri bu organizmayı insanlardaki birçok hastalıklara karşı ilaç üretilmesi ve geliştirilmesi konularındaki aktif olarak kullanılan bir canlı materyal haline getirmiştir.
- *D. melanogaster*' in fenotip özellikleri mikroskop altında (göz rengi, vücut rengi, kıl tipi) çok çeşitli mutasyonlar ve varyasyonlar olsa dahi incelenebilen ve gözlemlenebilen bir organizmadır [57].

- Laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi ve beslenme şartları maliyeti düşüktür.
- Genom sekansı çıkartılmış ve insan vücudundaki hastalıklara neden olabilecek genlerin % 60' ından fazlası bu tür ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir.
- Kanseri gibi hastalıklarda homologlarının olduğu ve insan hücre döngüleri yollarının birbirine benzediği bilinmektedir [58-59].

D. melanogaster çürümüş meyveler üzerinden beslenip yaşamını 4 farklı evrede sürdürür. Bu evreler yumurta evresi, larva evresi, pupa evresi ve ergin evreleridir.



Şekil 3 *D.melanogaster* Evreleri [60]

D. melanogaster, diploid kromozom sayısına sahiptir ve dört çift kromozom taşımaktadır. Bu dört çift kromozomdan üç çifti otozomal kromozom, bir çifti ise cinsiyet kromozomlarıdır [60].

Kültüre alınan bireyler besin üzerlerine yumurta bıraktıktan 1 gün sonra yumurtalar açılmaya başlar ve larvalar mevcut besin üzerinden beslenmeye başlarlar. Beslenen larvalar üçüncü evreye ulaştıktan sonra yaşama ortamlarında kuru bir yer olarak pupa evresine geçmektedir [61]. Pupa içerisinde imajinal disklerden kanat, göz bacak gibi metamorfoz geçirerek gelişir [62].

D.Melanogaster'in taksonomideki yeri řu şekildedir.

Regnum(Alem): *Animalia* (Hayvanlar)

Phylum (şube) : *Arthropoda* (Eklembacaklılar)

Clasis (Sınıf) : *Insecta-Hexapoda* (Böcekler-Altıbacaklılar)

Subclasis (Alt Sınıf) : *Pterygota* (Kanatlılar)

Süperordo (Üst Sınıf) : *Mecopteroidae* (Uzun kanatlılar)

Ordo (Takım) : *Diptera* (Çift kanatlılar)

Subordo (Alt takım) : *Brachycera* (Kısa antenli sinekler)

Familie (Aile) : *Drosophilidae* (Sirke sinekleri)

Genus Cins : *Drosophila*

Species Tür : *Drosophila melanogaster*



Şekil 4. Erkek (alt) ve Dişi (Üst) *D.melanogaster* [60].

D. melanogaster'ın genel özellikleri, kiremit kırmızısına sahip bir göz, sarı-kahverengi renk ve abdomende enine ve birbirine paralel olacak şekilde dizilmiş siyah çizgiler bulunmaktadır. Erkek ve dişi bireylerde farklılık göstermektedir. Dişilerde abdomen yedi segmente sahip ve uzun sivri şekildedir. Erkekler de ise dişilere nazaran kısa beş segmentli

ve küt şeklindedir. Ayrıca dişilerde devamlı yumurta gelişimi ve yaşlanmaya bağlı olarak abdomenlerde genişleme görülmektedir. *D. melanogaster*' in birçok soylarında tüm abdomen arkası dişilerde açık koyu, erkeklerde ise siyahtır. Baş bölgesinde yanlarda bir çift göz ve tepede üç basit göz ile ağız ve bir çift arista tipi anten bulunmaktadır. Göğüs bölgesi ise önden arkaya doğru sırasıyla protoraks, mesotoraks ve metatoraks olmak üzere üç segmentten meydana gelmektedir.

D. melanogaster' in gelişimi periyodu sıcaklığa göre değişmektedir, 30°C'de 11 gün, 18°C'de 19 gün, 12 °C ise 50 gündür ve en uygun sıcaklık derecesi ise 25°C'dir [63],[64].

2.3. Kanser

İnsanlık tarihi boyunca kanser sık görülen bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. M.Ö 3000 yıllarına kadar uzanan bir geçmişi vardır. Latince *canker* veya *corcinos* kelimelerinden türemiştir. Terim M.Ö. 3. Yüzyılda tümör yapısının etrafında şişen damarların bir yengecin bacakları gibi görüldüğü Hipokrat tarafından kullanılmıştır [65].

Kanser canlı bir organizmada bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, birikmesi ve bölünmesidir. Bu çoğalma ve bölünme durumu tek bir organ yapısını etkileyebildiği gibi diğer organlara da yayılma gösterebilmektedir. Günümüzde genel çerçevede bazı tedavi yöntemleri belirlenmiş olsa da kanser türlerine karşı farklı tedavi metodları uygulanmaktadır. İnsan vücudunu etkileyen 100'den fazla kanser türü tespit edilmiştir [66].

İnsan vücudundaki genler hücre bölünmesi ve çoğalmasında kontrol mekanizmasıdır. Kromozomlar üzerindeki değişimler hücre işlevlerini etkilediği için genlerde meydana gelebilecek bir hasar proteinlerin eksik ya da hatalı üretilmesine yol açar bu da hücre yapısındaki işlevlerin bozulmasına neden olur. Kanserin ortaya çıkmasında 3 gen grubu büyük rol oynamaktadır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir. Kanserin meydana gelmesinde sigara kullanımı, alkol, kötü beslenme (obezite), virüsler, UV ışınlar, mesleki hastalıklar ve çevresel faktörler sayılabilir. Dünyada kanser türlerine bakıldığında hem kadınlar da hem de erkeklerde en çok karşılaşılan ve ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir. Kadınlar da ikinci sırada meme kanseri gelirken, erkekler de ise prostat kanseri gelmektedir [67].

İnsan vücudunda hücreler sinyal aldıklarında büyüme gerçekleşir ve bölünerek çoğalırlar. Gelen sinyal hücre dışı membrandan girerek hücre çekirdeğine ulaşır. Hücre yeterli

miktarda besin ve ortam oluştuğunda büyüme evresini başlatır, temas ile karşılaştığında ise durmaktadır. DNA'nın ya da hücre elemanlarının hasarlı olması durumunda ise büyüme ve bölünmeyi durdurarak tamir aşamasına geçmektedir. Tamir aşamasında düzeltilemeyecek derecede bir hasar var ise apoptoz adı verilen mekanizma programlı bir şekilde hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak kanserli hücrelerde; hücre yüzeyleri daha çok sinyal almaktadır ve kendi sinyal sistemlerini oluşturarak kontrolsüz bir biçimde çoğalma gerçekleştirirler. Yanındaki hücre ile temas halinde olması durumunda büyümeyi ve bölünmeyi durdurmayarak devam etmedir. İnsan vücudundaki sağlıklı bir hücre her tipteki besini kullanma özelliğinde olmasına karşın kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu kullanmaktadır. şekeri normal hücreye kıyasla 100 kat daha fazla kullanmaktadır. Kanserli hücreler gerekli besin ve oksijeni almak için yeni damar sistemleri oluşturabilirler. Telomerlerini sabitleyerek sonsuz bölünme gerçekleştirebildikleri gibi apoptozdan kaçabilme özellikleri vardır [68].

2.3.1. Kanserın Tedavisi

Kanser tedavi yöntemlerinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi müdahale yöntemleri en çok kullanılan tedavi yöntemleri arasındadır. Ayrıca hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerde son zamanlarda diğer tedavilere destek olacak şekilde kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde kişiden kişiye farklılık göstermesi nedeniyle kesin bir tedavi yönteminden bahsetmek mümkün değildir.

2.3.2. Radyoterapi

Radyoterapi, mevcut kanserli hücreleri iyonize ışınlar sayesinde öldürmeye dayalı bir tedavi şeklidir. Bu tedavi yönteminde tüm vücudun hedef aldığı uygulamalar yapılabildiği gibi sadece belirli bir bölgesinin hedef alınarak yapıldığı tedavi şekilleri de mevcuttur. Radyoterapi tedavi yönteminde

- 3 Boyutlu Konformal Radyoterapi
- Konformal Proton Işın Radyosyon Terapi
- Yoğunluk Aracılı Radyoterapi
- Görüntü Rehberliğinde Radyoterapi gibi  eşitleri bulunmaktadır.

Yoğunluk Aracılı Radyoterapi sistemlerinde genellikle beyin, prostat, baş boyun ve meme kanserlerinde kullanılmaktadır. Tedavi edilecek olan bölgeye farklı kuvvetlerde ışınlar verilmesi ve bu sayede diğer sağlıklı bölgelerin korunmasını sağlanması hedef alınmaktadır. Radyoterapi yöntemleri sıklıkla cerrahi işlemler öncesi uygulanmakta olup tümörün küçültülmesi amaçlanır. Belirlenen dozaj hesapları ile birlikte doku ve organa verilen radyo ışınlar ile kanserli hücrelerin öldürülmesi veya küçültülmesi sağlanmaktadır. Ancak radyoterapide bu işlemler yapılırken bir dezavantaj ortaya çıkmaktadır. Bu da kanserli hücreler ile birlikte sağlıklı hücrelerin de ölmesidir. Ayrıca hastalarda saç kaybı, kusma, iştahsızlık sık görülmektedir. Bu gibi sebepler hasta yaşam kalitesini etkilemektedir [69].

2.3.3. Kemoterapi

Kemoterapi kemoterapik ajanlar kullanılarak kanser hücrelerini öldürmek amaçlanmıştır. Sitotoksik ve anti-neoplastik ajanlar kemoterapide kullanılmaktadır. Aynı radyoterapide olduğu gibi cerrahi işlemler yapılmadan önce mevcut tümör boyutunu küçültmek üzere birleşik şekilde ya da tek başına tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Lenfoma ve lösemi gibi kanser çeşitlerinde uygulanarak etkili bir tedavi yöntemi olduğu saptanmıştır [70]. Kemoterapi ile tedavi yönteminde uygulanan ilaçlar kortikosteroidler, anti metabolitler, topoizomeaz inhibitörler ve alkilleyici ajanlardır.

Kemoterapi yönteminde kullanılan ajanlar;

- Alkil sülfonatlar
- Niftozürler
- Traizenler
- Nitrojen Hardalları
- Etilenamin
- Metilenamin olmak üzere 6 gruba ayrılmaktadır.

Bu ajanlar akciğer, meme kanserleri, lösemi ve birçok hastalıkta kullanılmaktadır [71].

2.3.4. Kök Hücre Tedavisi

Kök hücreler çeşitli tip hücreler ile farklılaşabilen spesifik hücrelerdir. Her bir kök hücrenin yeni bir kök hücre üretme potansiyeli bulunmaktadır. Kök hücre bölündüğü zaman farklılaşıp başka bir hücreye dönüşebilir ya da bölündüğünde bir kök hücre olarak kalabilmektedir. Diğer yetişkin hücrelerden farklı olarak bölünerek kendilerini yenileme becerilerine sahiptir [72].

Temel olarak iki tip kök hücre bulunmaktadır

- Embriyonik Kök Hücreleri
- Embriyonik Olmayan Kök Hücreleri

Hücre odaklı tedavide, rejeneratif tıpta, ilaç geliştirmede, bazı hastalıkların modellenmesinde kullanıldığı gibi kanser de olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır [73].

Kök hücre tedavi yönteminin avantajlarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. En büyük dezavantajlardan biri ise alıcı ve verici arasındaki doku uyumunun tam olarak sağlanamamasından kaynaklı durumlardır. Alıcı ve verici arasında doku uyumsuzluğuna bağlı olarak hasta vücuduna yeni verilen bu kök hücreleri reddedilmektedir [74]. Kök hücre tedavisi sırasında hastaya bağışıklığı baskılayıcı etkili ilaçlar verilmek suretiyle bu tepkime azaltılabilir ya da radyoterapi veya kemoterapi ile tedavi etkinliği artırmaktadır. Bu tedavi yönteminde Mikro Sitotoksite Assay (MCA) yöntemi kullanılarak altı da altı uyum aranmaktadır. Kök hücre tedavi yöntemi lösemi, miyelom, lenfoma ve böbrek gibi kanser türlerinde hastalara başarı ile uygulanmaktadır [75].

2.3.5. Hormonal Tedaviler

Hormonlar insan vücudunda doğal olarak üretilmekte olan proteinler veya ihtiyaca göre dışarıdan hazır olarak verilen kimyasal maddelerdir. Bu moleküller dolaşım yolu ile endokrin sinyaller sayesinde hücre, doku ve organların davranışlarını kontrol etmektedirler.

Hormonlar prostat kanseri, meme kanseri ve endometriyum kanserlerinde ilaç tedavisi olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçlar kemoterapi tedavi yöntemindeki ilaçlara benzese de

vücudun doğal yollar ile ürettiği hormonlardan sağlanarak kanser hücrelerinin büyümesini engellemektedir [76].

2.3.6. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi yöntemler kanser tedavisinde tek başına kullanılan bir yöntem olmakla beraber radyoterapi veya kemoterapi tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılmaktadır. Özellikle kanserli dokunun /kitlenin vücuttan alınmasında veya gelişmekte olan kanserli dokudan biyopsi alınarak tanı konmasında, metastaz veya yayılma durumlarında sıklıkla kullanılır. Kemoterapi veya radyoterapi tedavi uygulamaları ile kanserli hücrelerin küçültülmesi veya bölünmesi sağlandıktan sonra kalan kitleyi cerrahi yöntemle almak tercih edilmektedir. Kanser tedavilerinde cerrahi yöntem hasarlı dokularının yenilenmesinde de kullanılmaktadır [77].

2.3.7. Biyolojik Tedaviler

Biyolojik tedavi yöntemlerinde tedavi şekli biyolojik materyaller kullanılarak yapılmaktadır. Kanser aşılı, anti anjiyogenikler (kan damarlarının büyümesini engelleyiciler), monoklonal antikolar, interferonlar, interlekinler ve gen terapi gibi tedavi yöntemleri biyolojik tedaviler arasındadır.

İmmünoterapi: Bu tedavi yönteminde mevcut vücut sistemlerine dışarıdan veya içeriden gelen uyarılara karşı savunma mekanizmasını kullanılması ile yapılmaktadır. İmmünoterapide sitokinler, antikolar ve hücreler sıklıkla kullanılan 3 adet moleküldür. Bu tedavi yöntemindeki temel amaç vücut sistemindeki bağışıklığı harekete geçirip kanserli hücrelere karşı saldırmasını sağlamaktadır. Bu yöntem sentetik uyarıcılar (monoklonal antikolar ile yapılabileceği gibi vücudun kendi bağışıklığı ile de yapılabilmektedir [78].

Tanı ve tedavide önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, radyoterapi, fototerapi, kemoterapi, immünoterapi ve cerrahi tedavi yöntemleri gibi mevcut tedavi yöntemleri belirli protokoller ile sınırlıdır ve hala düşük sonuç yüksek hastalık ve ölüm oranına neden olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar yeni ve etkili terapötik ajanlar bulma konusunda çalışmalarına devam etmektedir [79]. Kanser gelişimini önlemek veya geciktirmek için farmakolojik ajanların, nutrsötiklerin yanı sıra bioaktif doğal ürünlerin kullanılmasına kemoprevansiyon denmektedir. Son zamanlarda kanseri önlemek veya gelişimini

geciktirmek için doğal ürünlerin antikanser ajanı olarak klinik kullanıma ağırlık verilmektedir [80].

Epidemiyolojik kanıtlar, yüksek sebze ve meyve tüketimi ile belirli kanser türleri, felç ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bulaşıcı olmayan hastalıkların gelişimi arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir [81]. Yapılan araştırmalarda bitkisel kaynaklı bazı gıdalarda çeşitli formlarda besleyici olmayan fitokimyasal ajanlar olduğu düşünülmektedir [82]. Araştırmacılar bitki özlerinin veya bitkisel ürünlerin terapötik etkinliğinin çeşitli biyoaktif bileşenlerinin sinerjik veya ilave ettiklerinin sonucu olduğunu savunurken tam tersine saf olarak bileşikleri tercih eden araştırmacılar; doğal bir kaynaktan izoele edilen bileşiklerin biyolojik olarak elde edilemeyeceği ya da sınırlı biyo-yararlanıma sahip olabileceklerini ileri sürmektedir[83],[84].

Sonuç olarak kanser insanlık tarihi boyunca karşılaştığı en büyük sağlık problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüzyıllardır dünyanın birçok bölgesindeki bilim insanı her gün bu karmaşık hastalığın tedavisi için çok çeşitli yöntemler geliştirmekte ve denemektedir. Yeni teknolojilerin ve yöntemlerin gelişmesi ile kanser hastalığı insanlık için problem olmaktan çıkacaktır.

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Geçmişte olduğu gibi günümüzde de hala bitkiler ve bitkisel bileşikler ile tedavi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Bilim dünyasındaki yapılan araştırmalar neticesinde fitoterapi uygulamaları artık daha da özele inerek bitki bünyesindeki bileşikler etki mekanizmalarını inceler hale gelmiştir. Araştırmacılar kanser gibi tedavisi henüz tam olarak bulunmamış hastalıklarda bitkisel bileşiklerin tek başına olmasada da destekleyici taraflarını bulmak adına çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Kanser vakalarındaki artış, ilaçların hastalara verdikleri yan etkiler, tedaviye cevap verme oranları baz alındığında doğal tedavi yöntemlerine olan ilgiyi artırmıştır.

Oleanolik asitin farmakoloji modellemesini, insan meme hücre hatlarının migrasyonu, proliferasyonu ve invazyonun inhibisyonunu tedavi etmek amacı ile yapmış oldukları çalışmada; oleanolik asitin yeni analoglarını tanımlamış ve Brak/ Paxillin/ Rac1 yolaklarının oleanolik asit anti-invaziv ve antimetastatik etkilerinde önemli bir yer tuttuğunu gözlemlemişlerdir [85].

Oleanolik asit apoptoz ilişkisi üzerine yapılan bir diğer çalışmada bileşiğin mitokondriyal ilişkili yolaklar vasıtasıyla apoptozise sebep olabileceği ve mitokondrial kaspazların ve pro apoptik Bax proteinlerinin salınımı teşvik ettiğini gözlemlemişlerdir [86].

Sitotoksik üzerine yapılan bir çalışmada ise oleanolik asitin bir türevi olan metil ester, hem apoptoz hem de reaktif oksijen türü üretimiyle konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde insan rahim boynu kanseri (HeLa) üzerinde etki gösterdiği keşfedilmiştir [87].

Oleanolik asitin anti kanser aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada kronik olarak oral uygulamalarda (dört hafta boyunca, haftada beş kez), sıçanlarda kolon karsinogenezinde azaltma gösterdiği ve oleanolik asidin tümörün başlatılmasını inhibe edebileceğini belirtmişlerdir [88]. Bir diğer çalışmada ise *In vivo* koşullar altında fare cilt kanseri hücrelerinin oluşturduğu tümörün teşvik edilmesi, hücreler üzerindeki birkaç genin düzensiz gen ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla kimyasal olarak indüklenen karsinogenezi inhibe ettiğini bildirmişlerdir. [89].

Oleanolik asitin anti tümör etkisinin bulunduğu, kültür ortamında oral epidermoid karsinoma ve kolorektal kanser HT29 hücre hattı gibi birçok hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür [90].

Oleanolik asit gibi triptenoid bir bileşik olan maslinik asit ile beraber yapılan bir çalışmada ise her iki asitin de A549, HI1299 ve HUVEC hücre hatlarında genotoksik etkileri üzerine etkileri Mikronükleus sayımı testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak hücrelerde mikronükleus sayısını arttırdığı ve hücre bölünmesini yavaşlatıp sitotoksik aktivitesini harekete geçirdiği ve hücre ölümüne neden olduğunu bulmuşlardır [91].

Bitkilerden elde edilen triterpenoid bileşiklerden biri olan betülinik asit üzerine yapılan araştırmada kansere karşı terapötik etkileri incelenmiş, bu bağlamda betülinik asit ve türevlerinin birçok kanser çeşidinde seçici toksisite göstermesi, farklı yolak ve moleküller üzerinde etki göstermesi ayrıca doğrudan doğruya mitokondriyi hedeflemesi, agresif ve özellikle tedaviye direnç gösteren bazı kanser türlerinde yararlı olabileceği tespit edilmiştir [92].

Yapılan bir çalışmada ise kakule ve mercanköşkü bitkilerinden elde edilen terpinen metabolitlerinin 0.5, 0.75 ve 1.0 mg/ml dozlarının rat uygulamaları sonucunda metabolitin tüm dozlarda hücrelerin yapısını etkileyerek canlılığını azalttığı Na^+ metabolizmasını değiştirdiği ve DNA hasarını indüklediği görülmüştür. Aynı çalışmada terpen çeşidi olan timolün nöro-toksik etkilerine de bakıldığında hafıza kayıplarına, kan beyin bariyerinde yıkımlara yol açtığı tespit edilmiştir. Timolün beyin asetilkolnesteraz (AChE) enzimini artırdığı Na^+ , K^+ , ATPaz aktivitesini inhibe ettiği ve ROS seviyesini yükselttiği görülmüştür [93].

Terpen türlerine ait bir çalışmada ise kemik iliği mezenkimal hücreleri ve ince bağırsak mukozasında bulunan hücreler üzerine yapılan deneyde timol, öjenol, mirsen gibi çeşitli terpenlerin bu hücreler üzerinde toksik etkiler sergilediği gözlenmiştir [94].

Seskiterpen türü olan ptaquilosid üzerine yapılan bir çalışmada lenfositlerde kardeş kromatid değişimini uyardığı ve yüksek düzeyde genotoksik olduğu bildirilmiştir [95].

Terpen çeşitlerinden olan guaiazulende yapılan çalışmada yüksek oranda sahip olduğu mitotik özelliği nedeniyle kanser araştırmalarında nöroblastom hücreleri ile sağlıklı hücreler kullanılarak karşılaştırılmıştır. Metabolitin yüksek dozları TOS'u yani (Total oksidatif seviyeyi) artırdığı ve bunun sonucunda sitotoksik etkileri gözlenmiştir. Poliferal kan lenfositleri üzerine bir çalışmada ise yine farklı dozları (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ve 400 mg/L) sitotoksitiye neden olduğu bildirilmiştir [96].

Model organizma olarak kullanılan ve insan ile % 75 oranında genetik benzerlik gösteren *D. Melanogaster* üzerinde yapılan çalışmada 0.01 g/mL, 0.05 g/mL, 0.01g/mL, ve 1 g/mL olmak üzere beş farklı dozda *Annona muricata* bitki ekstratı uygulanmış hem model organizma olarak *D. Melanogaster* öldürücü doz belirlenerek hemde insan meme hücresinde Buffy, CG₁₅₅₃₀ AKT-1 ve DR-PN gen ifade seviyeleri incenmiştir. Yapılan çalışmada CG₁₅₅₃₀ genin gen ifadesinde artış olduğu gözlemlenmiştir [97].



4. MALZEME VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hücre Hatları

MCF-7 ve MCF-10A hücre hatları Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre laboratuvarından temin edilen bir tür meme kanseri ve normal meme hücre dizisidir.

4.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

Tablo 3. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

	Kimyasal ve Reaktif	Ürün Firma Adı
Hücrelerin Rutin Bakımı	RPMI- 1640 Medium	Biological Industries, İsrail
	Fetal Bovin Serum(FBS)	Biological Industries, İsrail
	Gentamisin	Biological Industries, İsrail
	Trypsin- EDTA	Biological Industries, İsrail
	Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biological Industries, İsrail
Ticari Kitler	Dimetil Sülfoksit(DMSO)	Amresco®,ABD
	Memeli Hücresi RNA İzalasyon Kiti	GeneAll®,Kore
	XTT Analiz Kiti	Biological Industries, İsrail
	cDNA Sentez Kiti	GeneAll®,Kore
	Meyve Sineği RNA İzalasyon Kiti	Zymo Research, ABD
Meyve Sineği Bakımı	Agar	Oxoid™,İngiltere
	Yem Ekstrakt	Himedia, Hindistan

4.1.3. Kullanılan Makine ve Teçhizatlar

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Makine ve Teçhizat

Kullanım Amacı	Makine ve Teçhizat	Ürün Firma Adı
Hücrel Çalışma	CO ₂ İnkübatör	Nüve EC 160, Türkiye
	Laminar Akımlı Kabin	Nüve MN 090, Türkiye
	Inverted Mikroskop	BAB, Türkiye
	Mikroskop Kamerası	Leica, Almanya
	Stereo Mikroskop	Leica, Almanya
Moleküler Çalışma	PCR Cihazı	Thermo Hybaid, ABD
	Vorteks	IKA® Vortex, ABD
	Mini Santifüj Cihazı	Nüve NF 024, Türkiye
	Santrifüj Cihazı	Nüve NF 400, Türkiye
	Nanodrop Cihazı	Mecasys Obtizen NanoQ, Kore
Meyve Sineği Çalışması	ELISA Okuyucusu	BIOTEK ELX808, ABD
	Jel Yükleme Cihazı	Thermo Scientific, ABD
	Jel Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD, ABD
	Sinek İlaç Deneme Sistemi	Marangozda yapıldı
	Hassas Terazı	KERN, Almanya
Malzeme Depolanması	Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	IKA® C-MAG HS 7, ABD
	Buzdolabı(+4°C)	Vestel, Türkiye
	Buzdolabı(+4°C)	Vestel, Türkiye
	Derin Dondurucu(-80 °C)	ARCTIKO, Danimarka

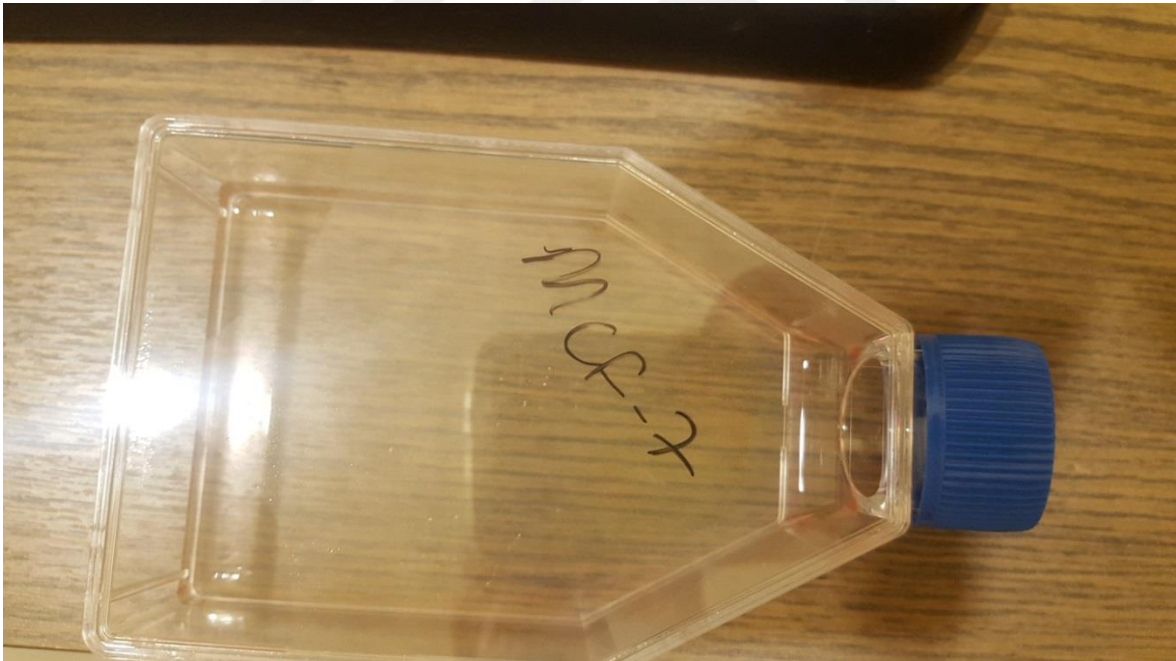
	Masaüstü Bilgisayar	Hewlett Packard(<i>Hp</i>),ABD
Diğer Cihazlar	Diziüstü	Hewlett Packard(<i>Hp</i>),ABD
	Dizüstü Bilgisayar	Lenova core i5, Hong Kong

4.2. Metod

4.2.1. Hücre Kültürü

4.3.1.1 MCF-7 ve MCF-10A Hücre Hattının Geliştirilmesi

Mevcutta bulunan MCF-7 Kanser hücre hattı %10 (v/v) Fetal Bovin Serum ve %1 (v/v) Gentamisin antibiyotiği ilave edilmiş %88 (v/v) RPMI-1640 besiyerinde 37°C’ de %5 karbondioksit inkübatöründe ve 75 cm²’ lik flasklarda üretilmiştir. Flask içerisine 12 mL taze medium eklendikten sonra flask yüzeyinin %80’ i hücreler tarafından kaplanmasıyla beraber hücreler tripsin-EDTA kullanılarak pasajlama işlemi yapılmıştır.



Şekil 5. MCF-7 Hücreleri

MCF-10A hücre hatları normal insan meme dokusu hücre hattı 75 cm²’ lik kültür kaplarında, %10’ luk fetal bovin serum eklenmiş RPMI 1640 besi yerinde ve DMEM / F12 37° C sabit sıcaklık ve %5’ lik karbondioksit sağlayan inkübatörde büyütülmüştür. Flask

yüzeyinin %80' lik kısmı hücreler tarafından kaplanması sağlandıktan sonra, mevcut hücreler tripsin kullanılarak pasajlanmıştır.

MCF-10A normal meme dokusu hücrelerin büyütülmesi için gerekli malzemeler

Tablo 5. Horse Serum 1000 ml/ DMEM/ F12 (Besiyeri İçin)

Horse serum	50 ml
Hidrokortizon	1 gram
İnsülin	100 mg
Epidermal büyüme faktörü(EGF)	0,2 mg
Penisillin/streptomisin antibiyotik	10 ml

4.3.1.2 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler hazırlanmış olan flask tabanında sıkışık bir duruma geldiğinde besi yeri ortamından yeteri kadar faydalanamaz ve çoğalmaları durmaktadır. Bu olaya kontakt inhibasyonu adı verilmektedir. Bu nedenle mevcut hücrelerin pasajlanması gerekmektedir. Hücre pasajı işlemi, elimizdeki hücrelerin yüzey alanında (substrat) yardımı ile ayrılması ve yeni kültür ortamlarına yani şişelere aktarılması anlamına gelir. Hücreler kültür ortamının yüzey alanını büyük oranda kapadıklarında, laminar akış kabini içinde tripsinizasyon yoluyla kaldırılır.

Bu işlemler yapılmasının akabinde, öncelikle hücreler mikroskop altında incelenmiştir. Mevcut hücreler %80 oranında flask taban yüzeyini kapladığı (ing. konfluent) görülmüştür. Flask içerisindeki 12 mL hücre mediumu çekilip, 5 mL Fosfat Tapolu Salin (ing. PBS) ile yıkanmıştır. Hücrelerin üzerine 2 mL tripsin-EDTA ilave edilip hücreler flask tabanından ayrılana kadar 37 °C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. Flask tabanından ayrılmış olan hücreler mikroskopta gözlemlenmiştir. Tripsinin ayrılan hücreler yüzeyindeki toksik etkisini inhibe etmek için 4 mL hücre mediumu eklenip ihtiyaç duyulan kadar sayıda hücre yeni bir kültür ortamına aktarılmıştır.

4.3.1.3. Tripan Mavisi ile Hücre Sayımı

Tripan mavisi boyasının aktivitesi, kromoforun negatif yüklü olduğu ve membran hasar görmediği sürece hücre ile etkileşime girmediği duruma bağlıdır [85]. Bu durumla beraber ölü olmayan hücreler tripan mavisi ile boyanmazken, ölü hücreler mavi renge boyanmaktadır.

Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücre solüsyonu tripan mavisi solüsyonu ile 10:1 oranında karışım kullanılarak karıştırma işlemi yapılır. Bu oran baz alınarak 250 µL hücre solüsyonu, 25 µL tripan mavisi solüsyonu ile karıştırılıp hemositometri yani thoma lamı üzerinde hücrelerin sayım işlemi yapılmıştır.

Tripan mavisi ile hücre sayım işleminde 1 mL’ deki hücre sayısı bulmak için, karelerdeki hücre sayısı ile seyreltme faktörü çarpımının 4×10^6 katıdır.

4.3.1.4. Sitotoksikite Analizi

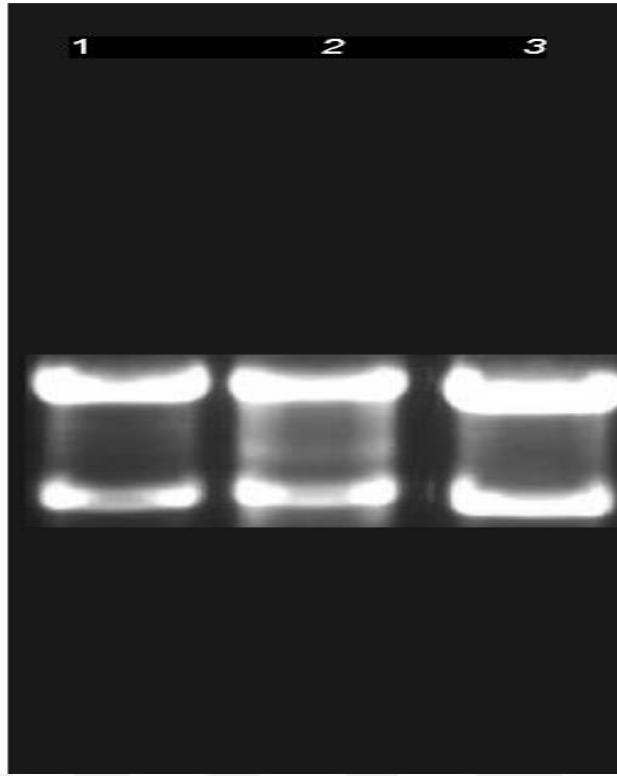
Hücre kültüründe büyütülen MCF-7 ve MCF-10A hücre hatlarında, Oleanolik asitin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini ve hücrelere uygulanacak dozunu belirlemek için sitotoksikite analizi yapılmıştır.

Oleanolik asit MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin sitotoksikitesi, Cell Proliferation XTT (2,3-Bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil) 2H-tetrazolyum) tabanlı sitotoksikite analiz kiti kullanılarak uygulanmıştır. Analizde kuyucuk başına 8×10^3 hücre gelecek şekilde hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Ekimi yapılan hücrelerde plakanın bir kolonu besi yeri kontrolü olarak ayrılmış olup bu bölgeye hücre ekimi yapılmamıştır. Hücre ekimden bir süre sonra ilgili bileşik seri dilüsyonlar şeklinde ekim yapılan kuyucuklara verilmiştir. Bu işlemi takiben 72 saat sonra formazan boyası eklenmiş XTT kimyasalı (Her 96 kuyucuklu plaka için 1 şişe XTT Reagent A ve 100 µL XTT Reagent B) her bir kuyucuğa eklenerek 5 saat inkübatörde bekletilmiştir ve 450 absorbans aralığında ELISA okuyucusundan faydalınarak optik yoğunluklar hesaplanmıştır. Oleanolik asit verilmemiş kontrol olarak ayrılmış kuyularda % 100 oranında büyüme olacağı varsayılmıştır. Analizde farklı ölçülerde bileşik içeren kuyulardaki büyüme buna oranlanarak tespit edilmiştir. Sonunda her bir bileşik konsantrasyonuna denk gelen büyüme oranı tespit edilip dirençliliğinin ölçüsü olan LC_{50} değeri hesaplanmıştır.

4.2.2. Kanser ve Normal Meme Hücre Hattında RNA İzasyonu

RNaz inaktivasyonu işlemi için kullanılacak tüm materyaller, dietil karbonat (DEPC) ile işleme alınmış, arıtılmış distile su ile sterilizasyon sağlanmıştır. Üretici protokolünde belirtilen toplam RNA izolasyonu için GeneAll® Hybrid-R™ RNA izolasyon kitinden faydalanılmıştır. Yaklaşık 1×10^6 ilâ 5×10^6 arasında farklılık gösteren hücreler üzerine 1 mL RiboEx™ eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücreler yıkıma uğradında üzerlerine 200 µL kloroform eklenip 12.000 g' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. (+4 ° C) Kolonun üst fazındaki 500 µL saydam süpernatant steril bir ependorfa alınmıştır ve 500 µL RBI Tampon ilâve edilmiştir. Pipetaj uygulamasını takiben karışım spin kolona (yeşil) aktarılmıştır ve 10.000 g' de 30 saniye santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL SWI Tampon eklenip 10.000 g' de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüp yenisi ile değiştirilmiştir. Spin kolon üzerine 500 µL RNW Tampon ilâve edilip 10.000 g' de 30 saniye santrifüj işlemi yapılmıştır. Örneğin içinde herhangi bir tampon kalıntısı kalmaması için 10.000 g' de 1 dakika boş santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. 1,5 mL etiketlemesi yapılmış ependorflara spin kolonlar aktarılmıştır. Son olarak 50 µL DNaz ve RNaz içermeyen distile su eklenip 10.000 g' de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi NanoDrop ve Agaroz Jelde tespit edildikten sonra cDNA sentezi ile deney devam edilmiştir.



Şekil 6. Hücrelerden Elde Edilen Total RNA (%1 Agaroz Jelde Yürütülmüştür).

4.2.2.1. cDNA Sentezi ve Ekspresyon Analiz

İzole edilen tek zincirli mRNA' nın, çift zincirli komplementer DNA' ya yani cDNA' ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu nedenle cDNA sentezi yapılır. Üreticinin protokolünde belirtilmiş olan toplam cDNA sentezi işlemi için GeneAll® HyperScript™ cDNA sentez kitinden faydalanılmıştır. Tüm cDNA sentezi işlemi sürecinde kullanılan malzemeler Dietilpropiyonat (DEPC) ve otoklava tabi tutulmuştur.

10 pg ve 500 ng arasında total RNA için gerekli hacimler kit protokolü çerçevesinde hesaplanmıştır. Bu hesaplara her bir örnek için; 1 µL dNTP ve 1 µL Oligo DT primer karışımı hazırlanmıştır. Tespit edilen RNA hacimleri üzerine bu karışım ilâve edilmiştir ve üzerine nükleaz free water (DNA ve RNA içermeyen su) eklenmiştir. PCR cihazında 5 dakika 65 °C' de inkübe edilip ardından 1 dakika buz blok üzerinde bekletilmiştir. Böylece cDNA ilk zincir sentezi gerçekleşmiştir.

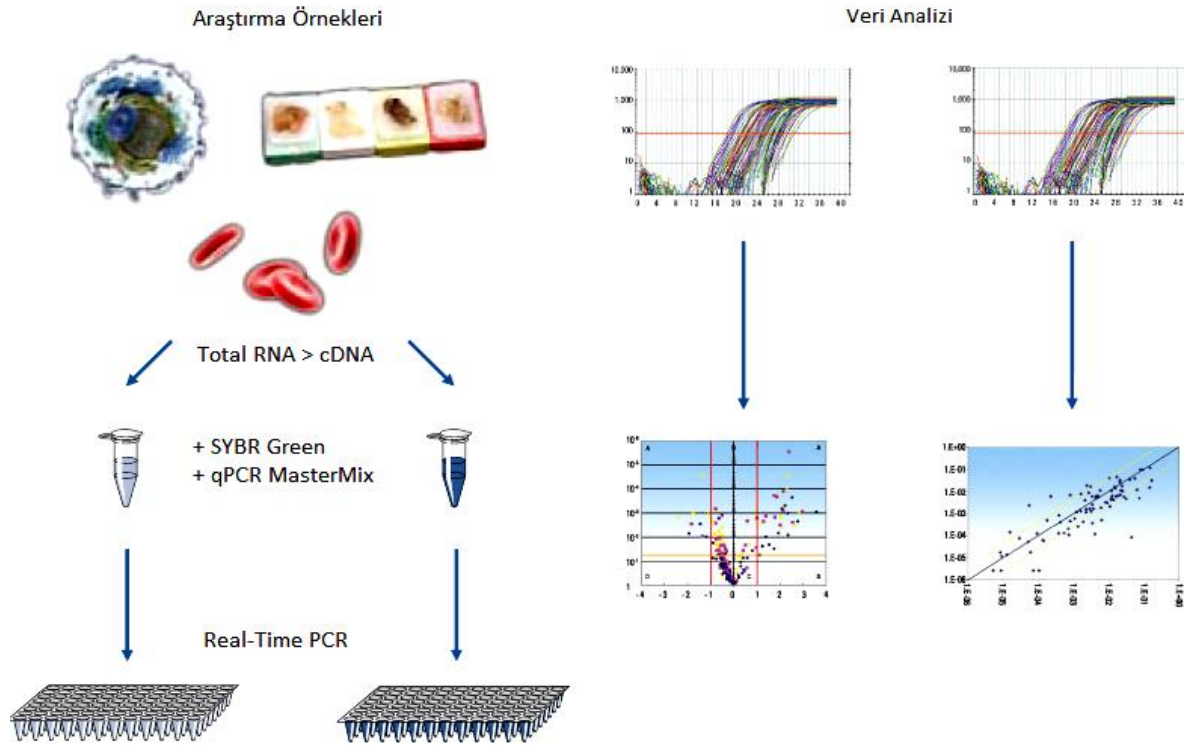
cDNA ikinci zincir sentezi için ayrı bir ependorf içerisinde; 2 µL RTaz Reaksiyon Tamponu (10x), 2 µL DTT (0.1 M), 1 µL HyperScript™ Reverse Transkriptaz ve 1 µL ZymAll™ RNaz inhibitör karışımı hazırlanmıştır. Elde edilen karışım daha önce yapılan cDNA sentezinde ile birleştirilmiştir. PCR cihazında; 55 °C' de 60 dakika, 85 °C' de 5

dakika inkübe edilmiştir. Birleştirilen ve PCR cihazında inkübe edilen cDNA ürünleri ekspresyon analizi için -20 °C’ de muhafâza edilmiştir.

Tablo 6. Amplifikasyon Koşulları

Pre-inkübasyon	65 °C, 5 dk
Bağlanma (<i>ing.</i> Annealing)	55 °C, 60 dk
Uzama (<i>ing.</i> Extension)	85 °C, 5 dk
Döngü Sayısı (<i>ing.</i> Cycle number)	40

Dizi işlemler sonu elde edilmiş olan cDNA’ ların gen ifade düzeyini (ing. ekspresion analysis) tespit edebilmesi için hizmet alımı kapsamında revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) düzeneği kurulmuştur. (Atlas Biyoteknoloji, Ankara) Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu işleminden faydanılarak mRNA ekspresyonunun kantitasyonu; kompetitif polimeraz zincir reaksiyonu ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu olarak iki ana basamakta gerçekleşmiştir. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon muhtemel basamakları Şekil 7’ de gösterilmiştir.

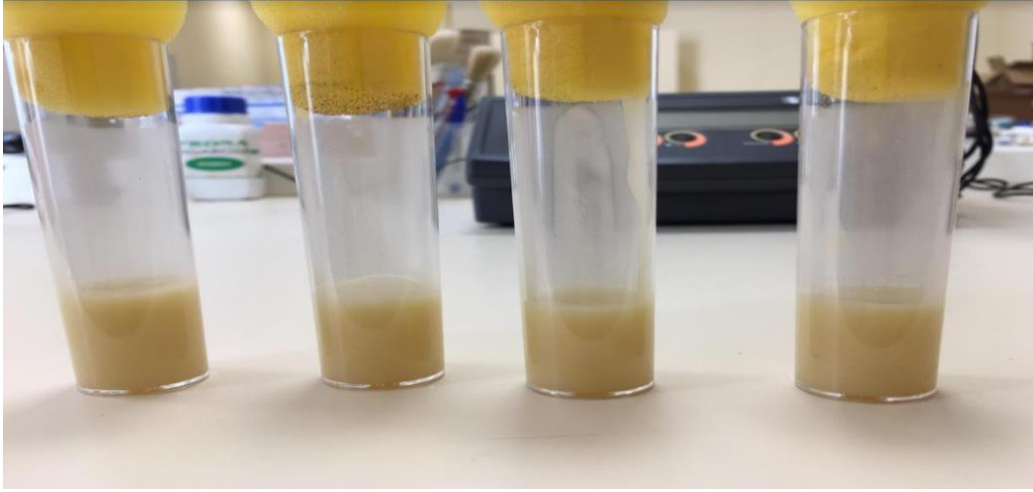


Şekil 7. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon Muhtemel Basamakları [86].

4.2.3. *D. melanogaster* Ortam Hazırlama ve Aktarma

Çalışmamızda sirke sineği diğer bir adıyla da meyve sineği olarak da bilinen *D. Melanogaster* model organizması kullanılmıştır.

Manyetik ısıtıcılı blok üzerinde kaynatılan 600 mL distile suya 3.5 gram agar ile 2 gram yeast ekstratı (maya özütü) ilave edilmiş, karışımda herhangi bir topaklanma olmaması için karıştırılmıştır. Karışım üzerine 50 gram mısır unu ve 50 gram toz şeker eklenerek 15 dakika kaynatılmıştır. Kaynama işlemi tamamlandıktan sonra soğumaya bırakılan besiyeri ortamının herhangi bir kontaminasyona maruz kalmaması için 3.5 mL propiyonik asit (veya sirke) eklenmiştir. Eter yardımı ile sinekler bayıltılmış ve besiyeri ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 8. *D.melanogaster* Besiyeri

Besiyerinde çoğaltılan larvalar üzerinde oleanolik asit doz denemeleri yapıp RNA izalasyonu için deneye devam edilmiştir.



Şekil 9. *D. melanogaster* Kültürü

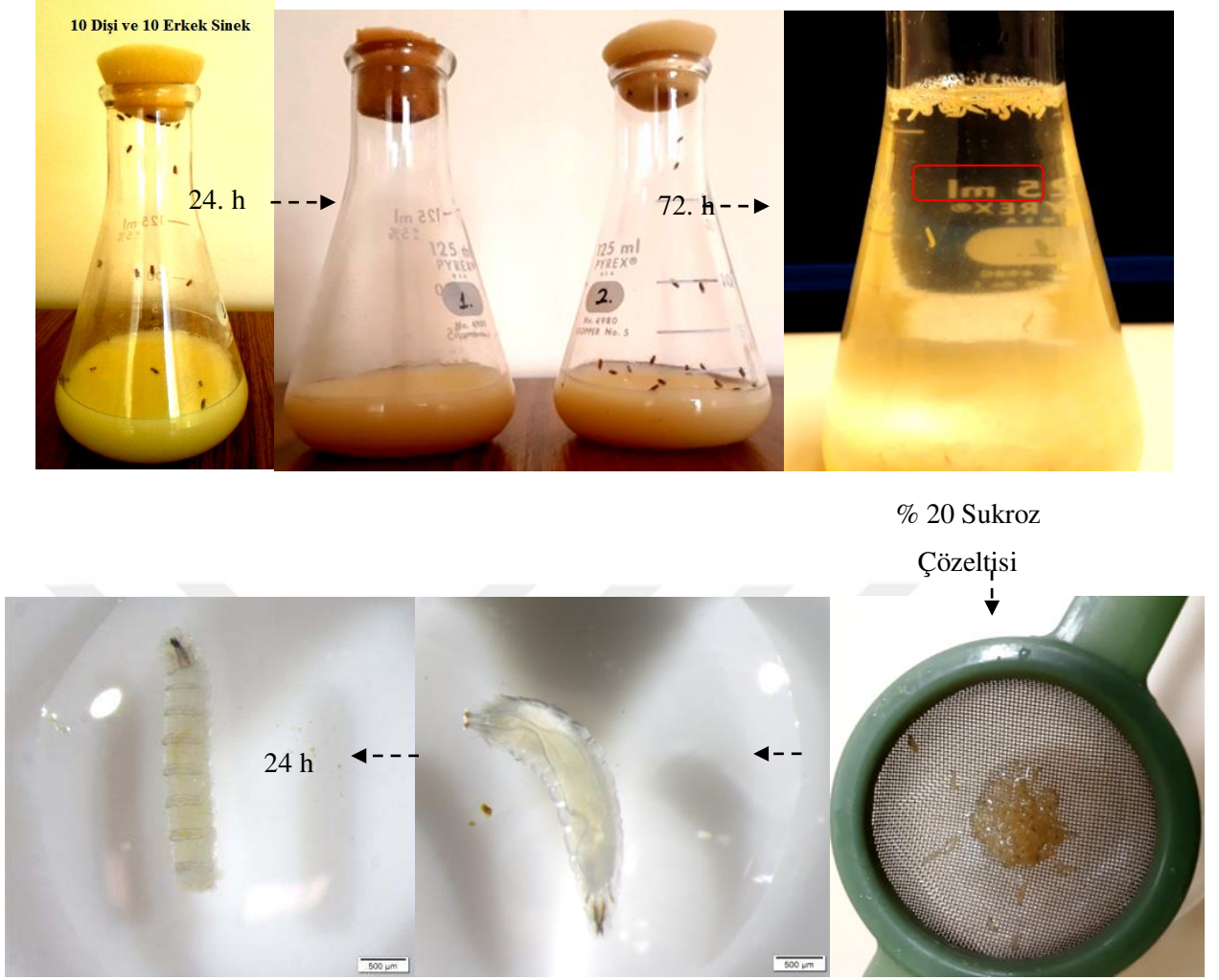
4.2.3.1. Oleanolik Asitin *D. melanogaster* Uygulamaları

Çalışmada, oleanolik asidin 1, 5, 10, ve 20 mM konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanarak yabancı tip *D. melanogaster* III. Instar larvalarına uygulanmıştır. Mikroskop altında belirlenen 10 dişi ve 10 erkek sinek taze besiyerine aktarılmıştır. 25 °C sıcaklık ve %60 nem ortamında 24 saat

sinekler inkübe edilmiştir. Sineklerin yumurta bırakması gerçekleştikten sonra ergin sinekler taze besiyerinden uzaklaştırılmıştır. Taze besiyerinde bulunan yumurtalar III. Instar larvaları oluşurana kadar bekletilmiştir. (72 h) 100 mL % 20 sukroz çözeltisi larvalar üzerine eklenmiştir. Ucu kesilmiş serolojik pipet yardımıyla larvalar toplanmış ve bir örgü sepet içerisine aktarılmıştır. Örgü sepet içerisindeki larvalar 2 defa distile su (dH₂O) ile yıkanmıştır. Yıkanan larvalar belirlenen konsantrasyonlarda oleanolik asit içeren petriler içerisine aktarılmıştır ve 24 saat bekletilmiştir. Yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde mamaya katılarak yapılan uygulamalarda herhangi bir ölüm elde edilmediği için belirlenen konsantrasyonlarda madde larvalar üzerine doğrudan uygulanarak 24 saat sonunda, ölüm oranları, LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri belirlenmiştir. Kontrol grubunda larvaların üzerine distile su uygulanmıştır. LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri Probit analizi ile elde edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Oleanolik Asit Uygulanan *D. melanogaster* larvalarının LC₅₀ ve LC₉₉ Değerleri

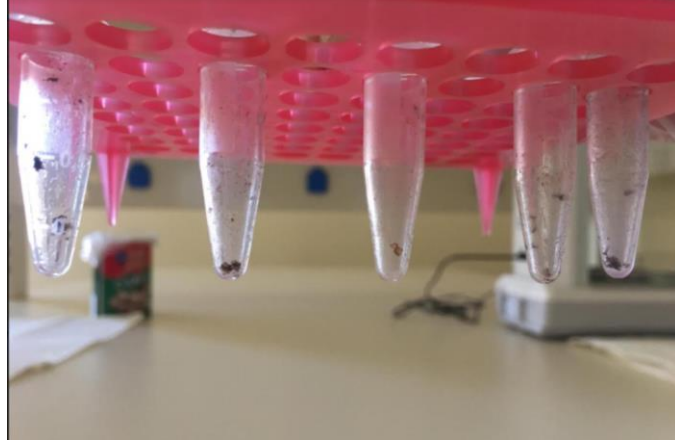
Süre (24 saat)	Birey Sayısı (N)	LC ₅₀ mM	LC ₉₉ mM	DF	C ²
Larva	50	10,4	32,5	2	53,498



Şekil 10. *D. melanogaster* larvaları [97].

4.2.3.2. *D. melanogaster* RNA İzalasyonu ve Gen Düzeyi Analizi

Belirlenen dozlarda yaşayan larvalardan, çalışılan genlerin ifade düzeylerinin belirlenebilmesi için oleanolik asit uygulamasını takriben RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir



Şekil 11. RNA İzalasyonu Öncesi Homojenize edilen Larva Örnekleri [97].

Böcekten RNA izolasyonunda LD₅₀ doz uygulaması sonucunda canlı böceklerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu hem kanser hatları hem de *D. melanogaster* için ticari RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır (Zymo Research). GAPDH ve BETA AKTİN genleri referans gen olarak kullanılmıştır. Gen ifadesinin gerçek zamanlı polimeraz reaksiyonu ile belirlenebilmesi için öncelikle genin transkriptinin, mRNA'sının, DNA' ya (komplementer DNA, cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. cDNA sentezi ticari kit kullanılarak yapılmıştır (WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity))

Qiagen ticari firması data bankasından (<https://www.qiagen.com>) ortak kanser genleri belirlenmiştir. Belirlenen genlerin *D. melanogaster* da karşıtını bulmak için www.flybase.org sitesine erişim sağlandıktan sonra QuickSearch bölümünden arama kategorisi olarak Orthologs kısmı seçilmiştir. Giriş türü olarak *Homo sapiens* çıkış türü olarak *D. melanogaster* belirlenmiştir. İlgili genlerin araması yapıldıktan sonra kaynaklardan en fazla taranan gen eşleşme kısmından benzerlik yüzdelerine göre genler belirlenmiştir.

Gen ekspresyonu için çalışılacak genler protein veri bankasından seçilmiş ve Tablo 8' de gösterilmiştir

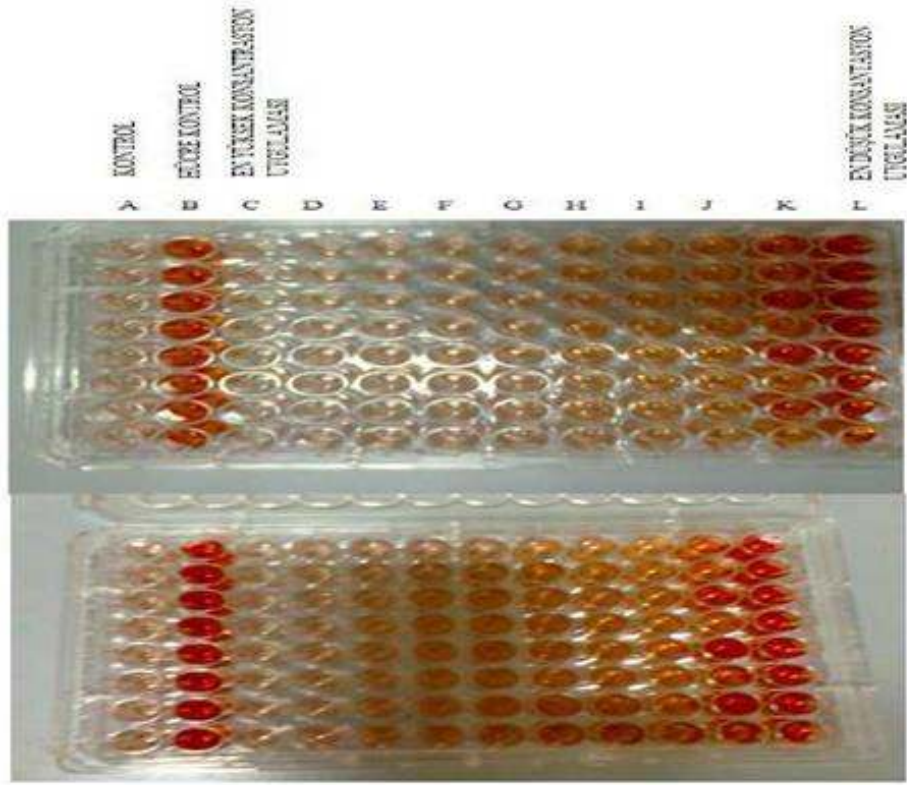
Tablo 8. *D. melanogaster* ve *Homo sapiens* Çalışılan Genler

<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>
CG ₁₅₅₃₀	BAD
BUFFY	BCL-2
AKT-1	AKT-1
Purine	H-Prune

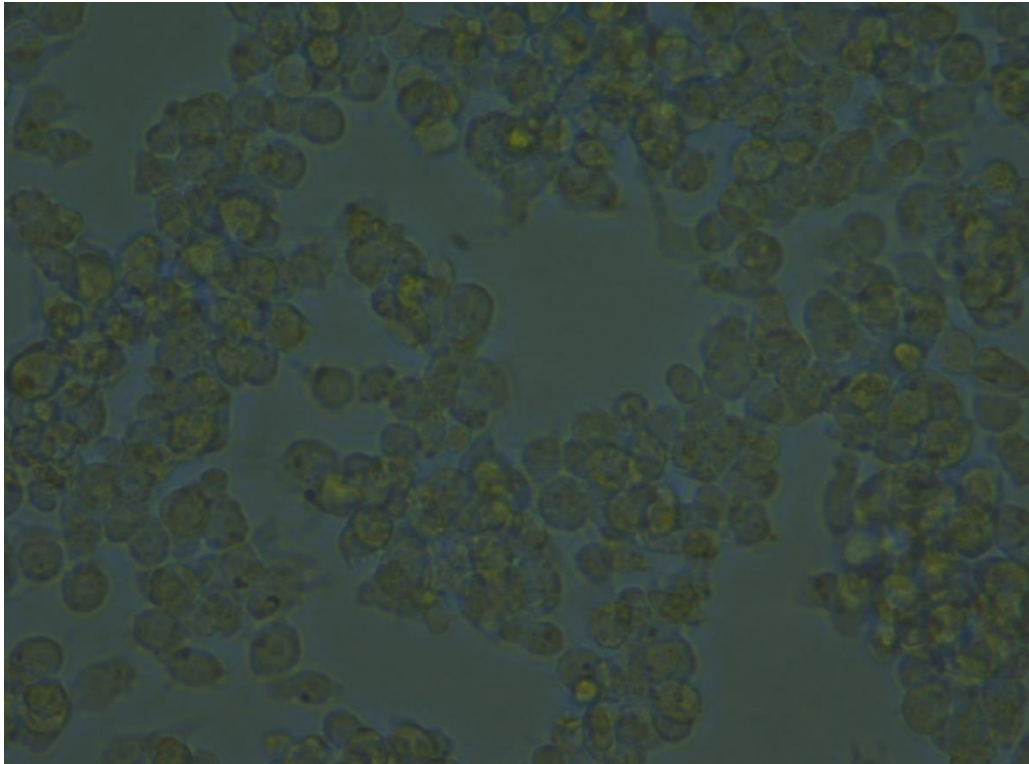
Analizler sonucunda her bir gen için ortalama Cp değerleri alınarak, ortalama kontrol gen Cp değerine oranlanarak göreceli gen ifade düzeyi hesaplanmıştır. Oleanolik asit uygulanmış hücrelerdeki bir genin kontrol gene göre Ct değerinden; aynı genin hücre hattındaki kontrol gene göre Ct değerinin çıkarılmasıyla $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edilmiştir. Gen ifadesi düzeyindeki değişimler, $\Delta\Delta Ct$ değeri ile belirlenmiştir. İki tekrar ile elde edilecek sonuçlar SPSS 16.0 programı ile değerlendirilmiş ve p değeri 0.05 düzeyinde olan farklılıklar “istatistiksel olarak anlamlı” kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

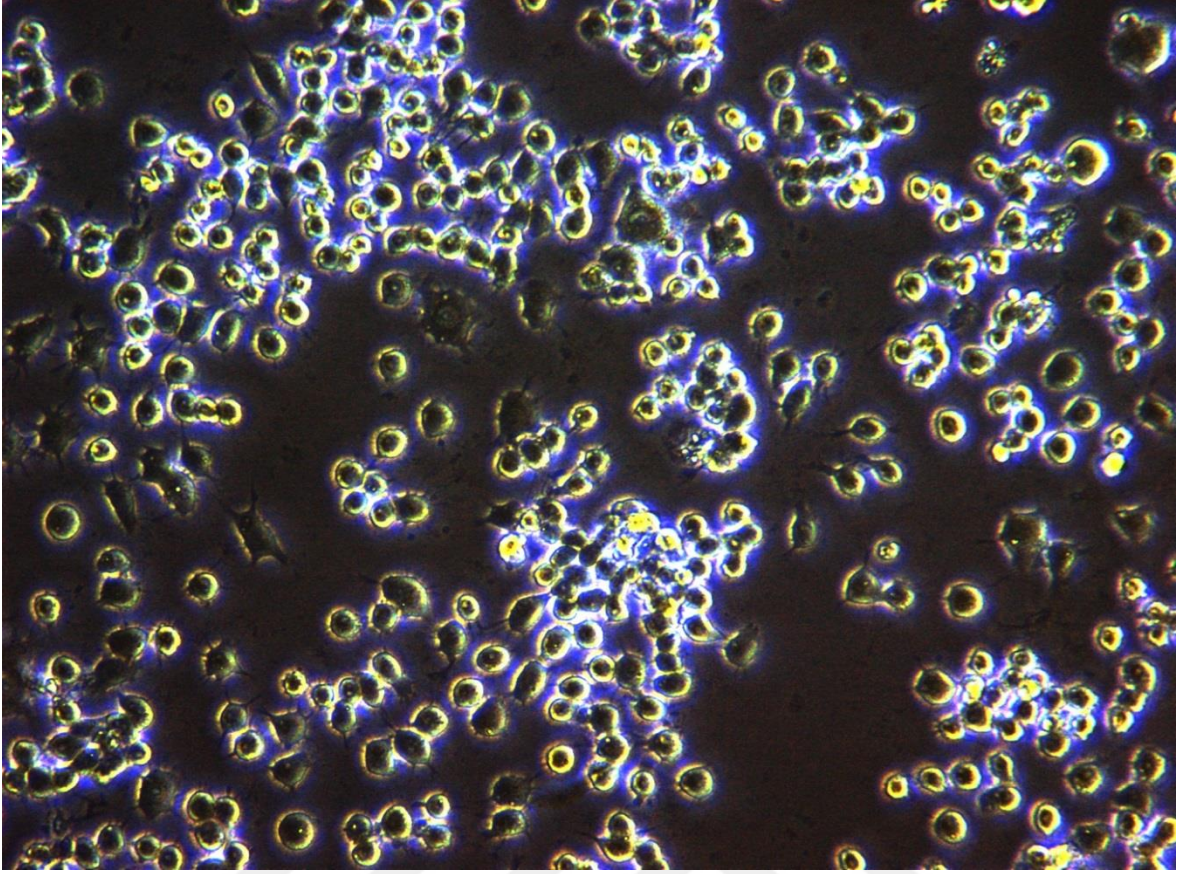
Kanser ve normal meme hücre hatlarına, Oleanolik asitin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini ve hücrelere uygulanacak konsantrasyon dozunu belirlemek için XTT yöntemi kullanılarak sitotoksisite analizi yapılmıştır. Şekil 12’ de XTT sonrası 96 kuyucuklu plakalar görülmektedir. Kontrol olarak belirtilen A sütununa hücre ekimi yapılmamıştır. Sadece medium kontrol olarak bulunmaktadır. B sütununda hücre kontrolü bulunmaktadır. Herhangi bir Oleanolik asit uygulaması yapılmamıştır. C sütununda en yüksek doz oleanolik asit uygulaması yapılmıştır. Ardından L sütununa kadar dilüsyon yapılmıştır. Plakalar uygulamanın ardından 72 saat 37 ° C, CO₂’ li etüvde bekletildikten sonra XTT kiti kullanılmıştır. Kontrol dahil olmak üzere her bir kuyucuğa XTT solüsyonu eklendikten sonra plakalar 4 saat 37 ° C, CO₂’ li etüvde bekletilmiştir. Ardından 96 well plate Elisa reader cihazında okutulmuştur. Sonuçlar 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Ardından her bir oleanolik asit hücreler üzerindeki LD₅₀ (IC₅₀) değeri hesaplanmıştır.



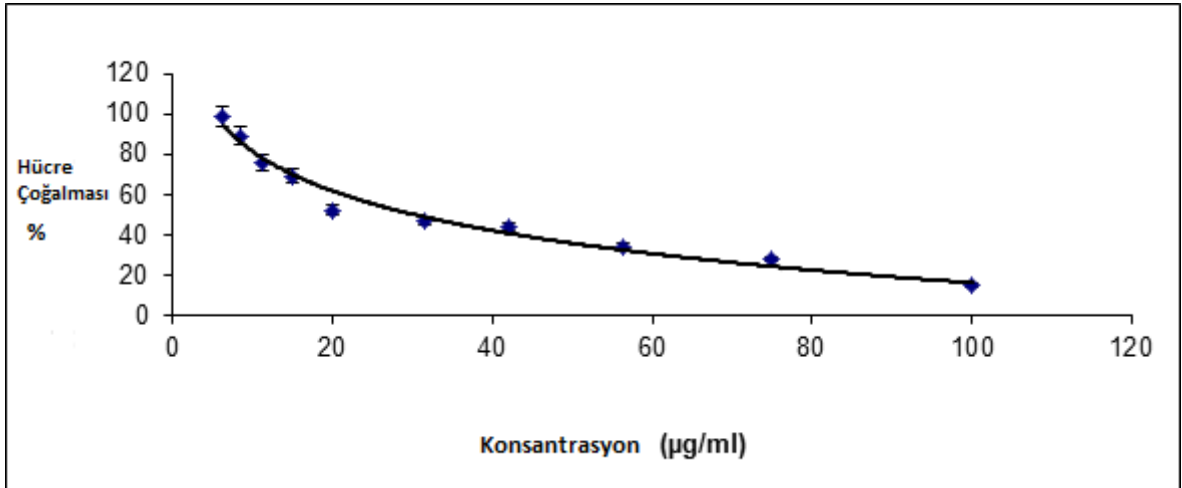
Şekil 12. Oleanolik asit hücreler üzerinde LC_{50} değerini belirlemek için yapılan XXT Analizi



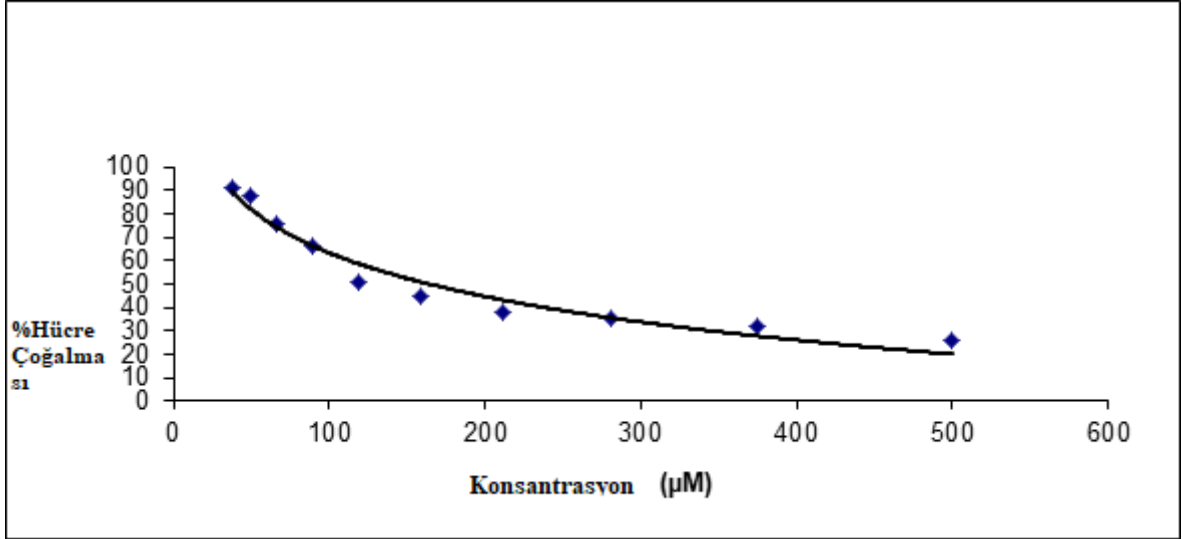
Şekil 13. Kontrol MCF-7 Hücre Hatları



Şekil 14. Oleanolik Asit Uygulaması Yapılmış MCF-7 Hücre Hatları

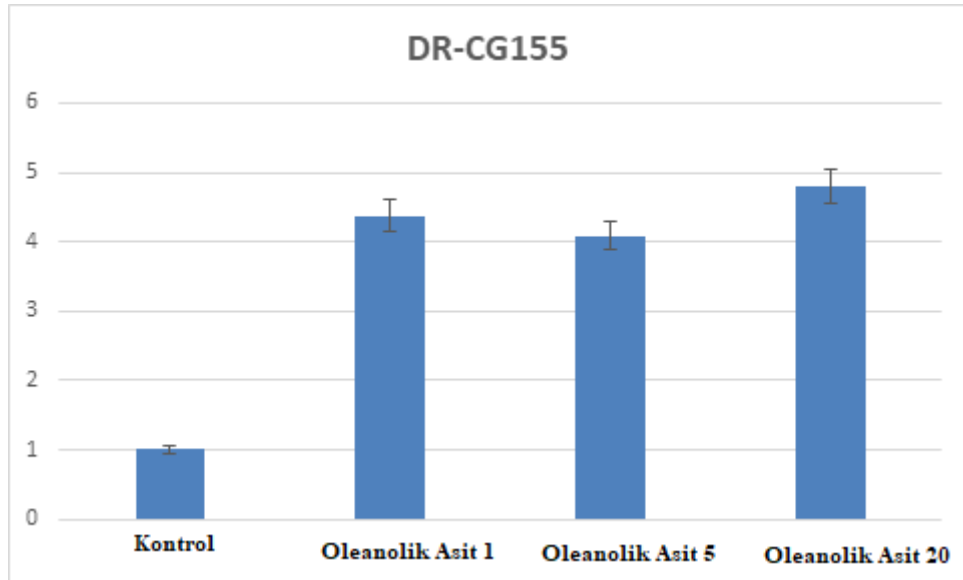


Şekil 15. Oleanolik asit MCF-7 kanser hücre üzerindeki toksisite grafiği (LD₅₀: 20µM)

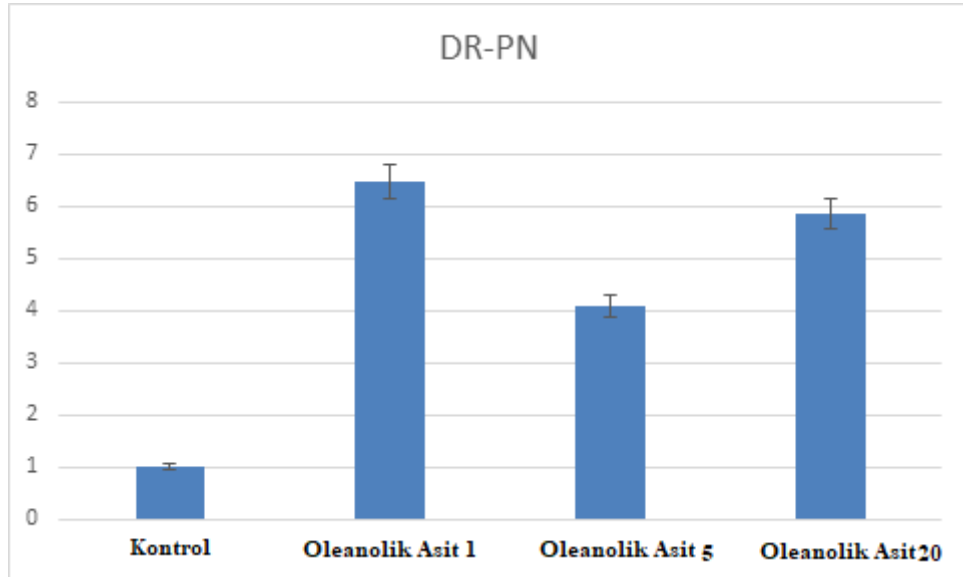


Şekil 16. Oleanolik asit MCF-10A normal meme hücre hattı üzerindeki toksisite grafiği (LD₅₀: 120 µM)

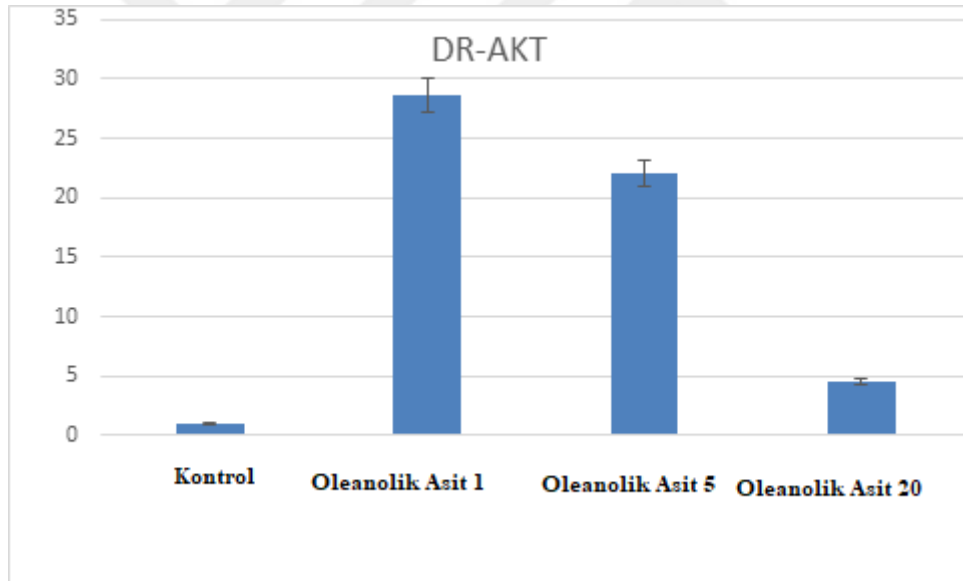
Oleanolik asitin *D. melanogaster* üzerinde CG₁₅₅₃₀ AKT-1, DR-PN gen ifade düzeyleri kontrol grubuna göre uygulanan bütün konsantrasyonlarında anlamlı olarak belirlenmiştir. Ancak DR-BUFFY gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. MCF-7 hücre hatlarında ise BAD, BCL-2, H-prune ve AKT-1 gen ifade düzeyi sonuçlarında ise H-prune ve BCL-2 genlerinde anlamlılık tespit edilmiştir.



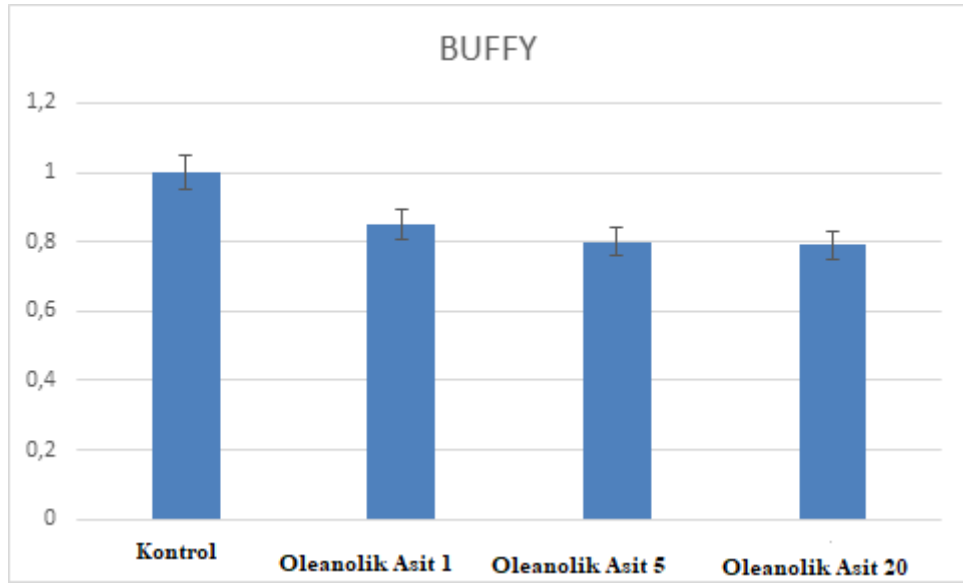
Şekil 17. *D. melanogaster* DR-CG₁₅₅₃₀ gen ifade düzeyleri



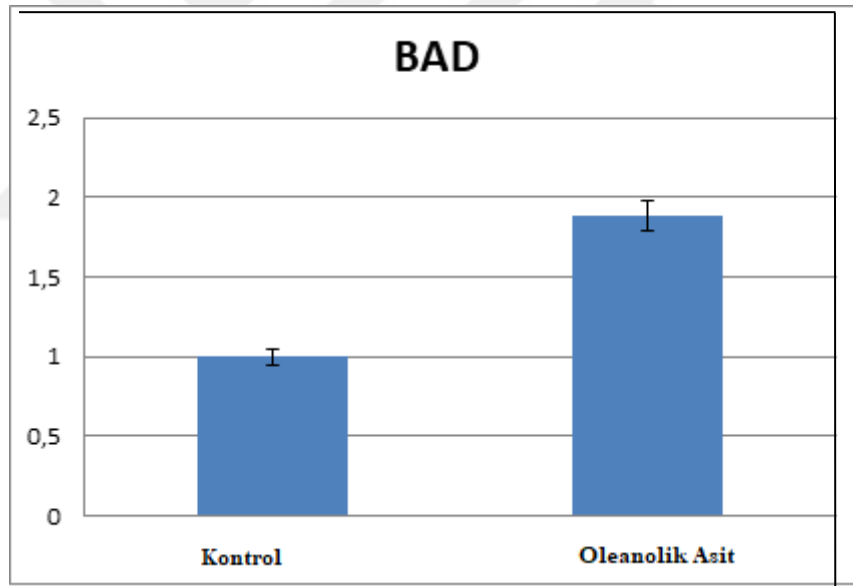
Şekil 18. *D. melanogaster* DR-PN gen ifade düzeyleri



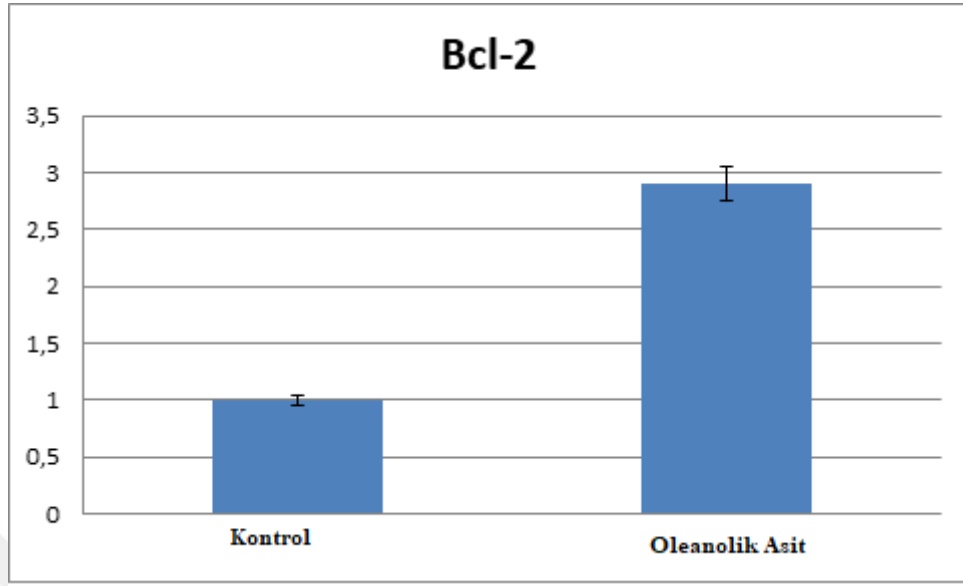
Şekil 19. *D. Melanogaster* DR-AKT1 gen ifade düzeyleri



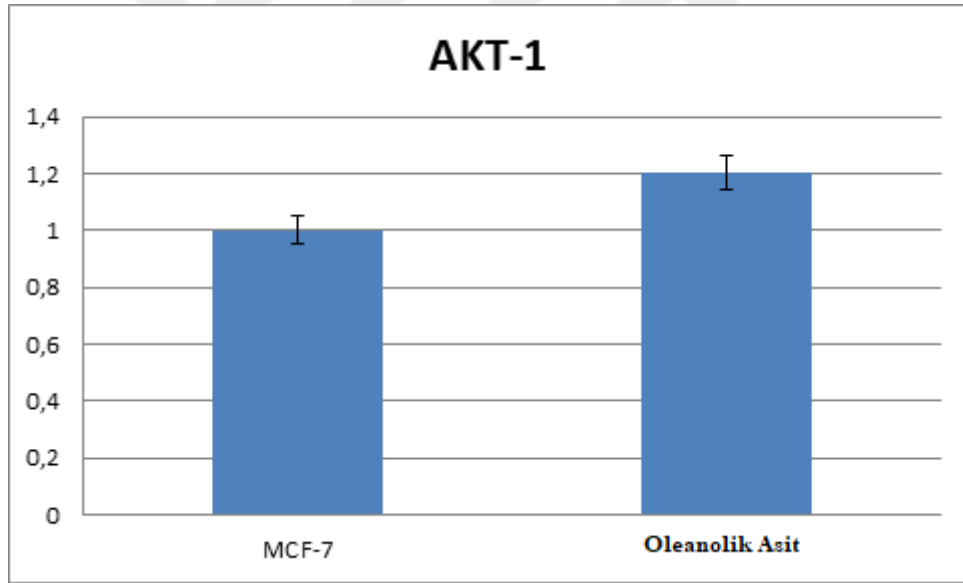
Şekil 20. *D.melanogaster* DR-BUFFY gen ifade düzeyleri



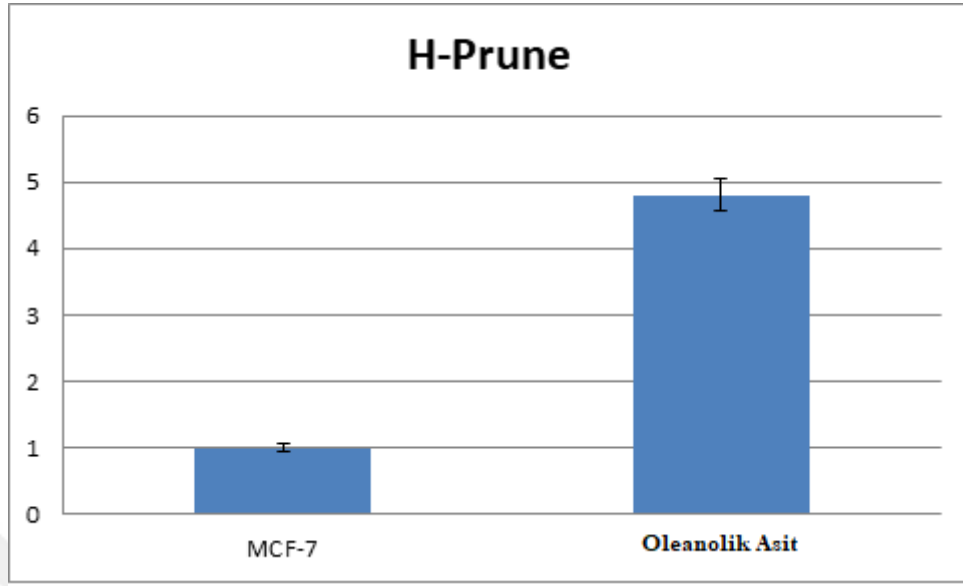
Şekil 21. MCF-7 hücre hatlarında BAD gen ifade düzeyleri



Şekil 22. MCF-7 hücre hatlarında BCL-2 gen ifade düzeyleri



Şekil 23. MCF-7 hücre hatlarında AKT-1 gen ifade düzeyleri



Şekil 24. MCF-7 hücre hatlarında H- Prune gen ifade düzeyleri

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmacılar kanser gibi henüz tam anlamıyla tedavisi olmayan hastalıklara karşı bitkisel ürünlerden faydalanma yolunda çalışmalarını sürdürmektedir. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de fitoterapi uygulamaları devam etmektedir. Gelişen teknoloji ile beraber bitki materyallerini doğrudan kullanmak yerine bitkilerden elde edilen primer ya da sekonder metabolitler araştırmacılar için bu tip hastalıklara etken madde olma potansiyeli olmaktadır [97].

Kanser gibi hastalıklarda bilim insanları tedaviye ek olarak hem kanseri önlemek hem de kanser gelişimini geciktirmek için doğal ürünlerin klinik çalışmalarını yapmaktadır. Özellikle son yıllarda artan vaka sayıları, ilaçların hastalar üzerinde oluşturduğu yan etkiler, tedavi maliyetlerin yüksek olması ve artan ilaç dirençlerine karşı bitkisel kaynaklı doğal bileşenlere olan ilgi artmaktadır. Oleanolik asit gibi doğal metabolitlerin kanser önleme gibi çeşitli farmakolojik etkileri son yıllarda büyük ilgi çekmiştir. Günümüzde kanser ile tedavisinde kullanılan yöntemlere ek destekleyici terapötik ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır [98].

Yapılan çalışmada, oleanolik asitin insan meme hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri belirlenmiş ve aynı zamanda iyi bir model organizma olan *Drosophila melanogaster* larvaları üzerine öldürücü etkisi araştırılmıştır. Çalışmada oleanolik asidin 1, 5, 10, ve 20 mM konsantrasyonlarında çözeltiler yabanıl tip *D.melanogaster* III. Instar larvalarına uygulanmıştır. 10 dişi ve 10 erkek taze besiyerinde 25 °C ve % 60 nem ortamında 24 saat inkübe edilmiştir. Konsantrasyonlarda bulunan maddeler doğrudan larvalar üzerine uygulanmıştır ölüm oranları LC₅₀ ve LC₉₉ değerleri 10,4 mM ve 32,5 mM olarak belirlenmiştir.

Oleanolik asitin *D. melanogaster* üzerindeki uygulamasında hem normal hem de malign(kötü huylu) hücrelerde hücre profilerasyonu, hayatta kalma, metabolizma ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonlarını düzenleyen AKT-1 geni üzerinde anlamlı kabul edilmiştir. Yine oleanolik asidin *D. melanogaster* üzerinde CG₁₅₅₃₀ ve PN gen ifade düzeyleri kontrol gruplarına göre uygulanan bütün konsantrasyonlarda anlamlı olarak belirlenmiştir. Ancak DR-BUFFY gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlılık görülmemiştir.

MCF-7 hücre hatları üzerine yapılan çalışmada ise BCL-2 ailesinin bir üyesi olan programlanmış hücre ölümünü düzenleyen BAD ve AKT-1 geninde anlamlılık göstermemiştir. Ancak lenfositlere benzer bazı hücrelerin apoptotik ölümünü engelleyen BCL-2 ve hücre motilitesinin indüksiyonu yoluyla kanser ilerlemesini ve metastazı uyaran H-Prune genlerinde anlamlılık tespit edilmiştir.

Gyeong-Ji Kim ve ark.' larının oleanolik asit üzerine yapmış oldukları çalışmada farelerde prostat kanseri hücre hatlarında DU₁₄₅, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ve u87 insan glioblastoma hücrelerinin canlılığı, apoptotik aktiviteleri ve hücre döngülerini incelemiştir. Çalışma sonra oleanolik asit ile tedavilerin tüm hücre dizilerinde profilereasyonu inhibe ettiği, sitotoksik etkileri için IC₅₀ değerlerinin DU₁₄₅, MCF-7 ve u87 hücre hatlarında 112.57, 132.29 ve 163 ug/mL olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca oleanolik asitin tedavilerde hücre tipine bağlı olarak hücre ilerlemesini ve apoptozu etkilediğini belirtmişlerdir [99].

Yapılan tez çalışmasında elde edilen verilen ışığında ileride protein düzeyinde ve farklı kanser hücre hatlarında da Oleanolik asitin etkilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Billing, J. and Sherman, P.W., 1998. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly Review of Biology*, 73 (1), 3-49.
- [2]. Tapsell, L.C., Hemphill, L., Cobiac, L., Sullivan, D.R., Fenech, M., Patch, C.S., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M. and Williams, P.G., 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Medical Journal of Australia*, 185 (4), 1-24.
- [3]. Eichorn, S.E. and Evert, R.F., 2016. *Raven Bitki Biyolojisi*. Çeviri Editörü: İsmail Türkan, Palme Yayıncılık.
- [4]. Sumner, J., 2000. *The Natural History of Medicinal Plants*. Timber press.
- [5]. Dr. Özlem Şarışen-Dr. Deniz Çalışkan, *STED*, 2005, Cilt:14, S:8, ss:185-187.
- [6]. Erdoğan, E.A., 2012. Using fields of plant essential oils and potential genetic effects. *Lokman Hekim Journal*, 2 (2), 21-24.
- [7]. Van Breemen, R.B., Fong, H.H.S. and Farnsworth, N.R., 2008. Ensuring the safety of botanical dietary supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (2), 509-513.
- [8]. Wink, M., 2009. Chapter 1 Introduction. *Annual Plant Reviews* 39,1-20.
- [9]. Başer, K.H.C., Kırimer, N., Koşar, M. ve Tunalier, Z., 2005. *Farmakognozi III. Uygulamaları El Kitabı*, 13-15.
- [10]. Kırca, A., Özkan, M. and Cemeroğlu, B., 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97, 598-605.
- [11]. Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52 (9), 665-667.
- [12]. Rodriguez-Rodriguez R. Oleanolic Acid and Related Triterpenoids from Olives on Vascular Function: Molecular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2015;22:1414–1425. doi: 10.2174/0929867322666141212122921
- [13]. Pollier, J., & Goossens, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry*, 77, 10-15.
- [14]. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 1995;49:57–68. doi: 10.1016/0378-8741(95)90032-2.
- [15]. Yan S., Huang C., Wu S., Yin M. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 2010;24:842–848. doi: 10.1016/j.tiv.2009.12.008.
- [16]. Senthil S., Chandramohan G., Pugalendi K.V. Isomers (oleanolic and ursolic acids) differ in their protective effect against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int. J. Cardiol.* 2007;119:131–133. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.07.108.
- [17]. Zhang F., Daimaru E., Ohnishi M., Kinoshita M., Tokuji Y. Oleanolic acid and ursolic acid in commercial dried fruits. *Food Sci. Technol. Res.* 2013;19:113–116. doi: 10.3136/fstr.19.113.
- [18]. Sporn, M.B., Liby, K.T., Yore, M.M., Fu, L., Lopchuk, J.M., Gribble, G.W., 2011. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *J. Nat. Prod.* 74, 537–545.
- [19]. Banik R.M., Pandey D.K. Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* 2008;27:241–248. doi: 10.1016/j.indcrop.2007.09.004.
- [20]. Wang C. *Dietary Chinese Herbs*. Springer; Vienna, Austria: 2015. *Crataeguspinnatifida* Bge. (Shanzha, Hawthorn Fruit) pp. 355–361.
- [21]. Yim T.K., Wu W.K., Pak W.F., Ko K.M. Hepatoprotective action of an oleanolic

- acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. *Phyther. Res.* 2001;15:589–592. doi: 10.1002/ptr.878.
- [22]. Fang X., Wang J., Yu X., Zhang G., Zhao J. Optimization of microwave-assisted extraction followed by RP-HPLC for the simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid in the fruits of *Chaenomeles sinensis*. *J. Sep. Sci.* 2010;33:1147–1155.
- [23]. Janicsák G., Veres K., Kakasy A.Z., Máthé I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 2006;34:392–396. doi: 10.1016/j.bse.2005.12.004.
- [24]. Caligiani A., Malavasi G., Palla G., Marseglia A., Tognolini M., Bruni R. A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chem.* 2013;136:735–741. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.011.
- [25]. Razboršek M.I., Vončina D.B., Doleček V., Vončina E. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia.* 2008;67:433–440. doi: 10.1365/s10337-008-0533-6.
- [26]. Yin M.-C., Lin M.-C., Mong M.-C., Lin C.-Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:7697–7701. doi: 10.1021/jf302529x.
- [27]. Liu, J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 57-68.
- [28]. Heinzen, H., de Vries, J.X., Moyna, P., Remberg, G., Martinez, R., Tietze, L.F., 1996. Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. *Phytochem. Anal.* 7, 237–244.
- [29]. Kubo, I., Matsumoto, A., 1984. Secreted oleanolic acid on the cuticle *Olea europaea* (Oleaceae); a chemical barrier to fungal attack. *Cell. Mol. Life Sci.* 40, 937–938.
- [30]. Szakiel, A., Grzelak, A., Dudek, P., Janiszowska, W., 2003. Biosynthesis of oleanolic acid and its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture. *Plant Physiol.*
- [31]. Mendes Leal, A. S. 2012. Preparation and biological evaluation of new triterpene derivatives of ursolic and oleanolic acids. Doctoral Dissertation, Faculty of Pharmacy University of Coimbra, 289, Coimbra, *Portugal*. *Biochem.* 41, 271–275.
- [32]. Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., Lupiáñez, J. A., & Cascante, M. (2009). Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Letters*, 273(1), 44-54.
- [33]. Yan S, Huang C, WU S, Yin M. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in Vitro* 2010;24:842-848.
- [34]. Lu Y, Wan X, Xu Y, Liu J. Repeated oral administration of oleanolic acid produces cholestatic liver injury in mice. *Molecules* 2013; 18:3060-3071.
- [35]. Gupta, J., Siddique, Y.H., Beg, T., Ara, G. and Afzal, M., 2009. Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes. *Biology and Medicine*, 1 (2), 87-99.
- [36]. Phillips, D.R., Rasbery, J.M., Bartel, B., Matsuda, S.P.T., 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 305–314.
- [37]. Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, S.P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261–291.
- [38]. Abe, I., 2007. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1311–

- 1331.
- [39]. E.J., Matsuda, S.P.T., Bartel, B., 1993. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc.Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11628–11632.
 - [40]. Saimaru, H., Orihara, Y., Tansakul, P., Kang, Y.-H., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 2007. Production of triterpene acids by cell suspension cultures of *Olea europaea*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 784–788.
 - [41]. Fukushima, E.O., Seki, H., Ohyama, K., Ono, E., Umemoto, N., Mizutani, M., Saito, K., Muranaka, T., 2011. CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 52, 2050–2061.
 - [42]. Han, J.-Y., Kim, H.-J., Kwon, Y.-S., Choi, Y.-E., 2011. The cytochrome P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol.* 52, 2062–2073.
 - [43]. Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N.E., England, R., 1985. Gas chromatography–mass spectrometry of oleanane- and ursane-type triterpenes – application to *Chenopodium quinoa* triterpenes. *Phytochemistry* 24, 2063–2066.
 - [44]. M.I., Voncina, D.B., Dolec̃ek, V., Voncina, E., 2008. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. *Chromatographia* 67, 433–440.
 - [45]. Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2009. Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1273–1282.
 - [46]. Wang, X., Ye, X.-l., Liu, R., Chen, H.-L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.-D., Wang, Z., Li, W.-l., Hai, C.-X., 2010. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem.-Biol. Interact.* 184, 328–337.
 - [47]. Klaassen, C.D., Reisman, S.A., 2010. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 57–65.
 - [48]. Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J., 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* 23, 394–411.
 - [49]. Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U., 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 20, 880–892.
 - [50]. Laszczyk, M.N., 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.* 75, 1549–1560.
 - [51]. Suh, N., Honda, T., Finlay, H.J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N.E., Xie, Q.-W., Nathan, C., Gribble, G.W., Sporn, M.B., 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* 58, 717–723.
 - [52]. Suh, N., Wang, Y., Honda, T., Gribble, G.W., Dmitrovsky, E., Hickey, W.F., Maue, R.A., Place, A.E., Porter, D.M., Spinella, M.J., Williams, C.R., Wu, G., Dannenberg, A.J., Flanders, K.C., Letterio, J.J., Mangelsdorf, D.J., Nathan, C.F., Nguyen, L., Porter, W.W., Ren, R.F., Roberts, A.B., Roche, N.S., Subbaramaiah, K., Sporn, M.B., 1999. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiatin antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res.* 59, 336–341.
 - [53]. Yin M.-C., Lin M.-C., Mong M.-C., Lin C.-Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. *J. Agric. Food Chem.* 2012;60:7697–7701. doi: 10.1021/jf302529x

- [54]. Jiang Q., Yang X., Du P., Zhang H., Zhang T. Dual strategies to improve oral bioavailability of oleanolic acid: Enhancing water-solubility, permeability and inhibiting cytochrome P450 isozymes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016;99:65–72. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.013.
- [55]. Jeong D.W., Kim Y.H., Kim H.H., Ji H.Y., Yoo S.D., Choi W.R., Lee S.M., Han C., Lee H.S. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* 2007;28:51–57. doi: 10.1002/bdd.530.
- [56]. Keller A, “*Drosophila melongaster*’s history as a human commensal” *Current Biology, Curr Biol.*,17(3): R77-81, 2007
- [57]. Graf, U. and Singer, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de-Contaminacion Ambiental*, 8 (1), 15-27.
- [58]. Bernards, A. and Hariharan, I.K., 2001. Of flies and men-studying human disease in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11 (3), 247-278.
- [59]. Prokop, A., 2016. Fruit flies in biological research. *Biological Sciences Review*, 28 (2), 2-5.
- [60]. Uysal, H., Şişman, T. ve Aşkın, H. 2006. *Drosophila* Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri. Erzurum, Türkiye, *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, 53 pp. ISBN:975-442-111-0.
- [61]. Wurgler, F.E and Vogel, E.W.,” In vivo mutagenicity testint using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in Chemical Mutagens, Principles and Medhods for their detection” Würgler FE and Vogel EW(editors). Vol.10., *Plenum Press*, 1-73.pp., New York, (1986)
- [62]. Ashburner, A.. *Drosophila: A Laboratory Manual* COLD Spring Harbor” *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.1331 pp. New york 1989
- [63]. Yeşilada, E., Gelegen L.,” *Drosophila melanogaster*’in Ömür Uzunluğu Üzerine Kadmiyum Nitratın Etkisi”, *Turk J Biol*,24, 593-599, (2000).
- [64]. McMillanı., Fitz-Earl M., Rabson D.S., Quantitaive genetics of fertility I, Life time egg production of *Drosophila mealnogaster*”, *Theortical, Genetics* 65:349-353,(1970).
- [65]. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C ve ark. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):505-27.
- [66]. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases (review). *Oncol Rep.* 2015 Jan;33(1):3-18
- [67]. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin Oncol.* 2016;7(1):54-86.
- [68]. Balikesir *Sağlık Bil Derg Cilt*:5 Sayı:3 Aralık 2016
- [69]. Kinhikar RA, Pawar AB, Mahantshetty U, Murthy V, Dheshpande DD, Shrivastava SK. Rapid Arc, helical tomotherapy, sliding window intensity modulated radiotherapy and three dimensional conformal radiation for localized prostate cancer: a dosimetric comparison. *J Cancer Res Ther.* 2014 ;10(3):575-82.
- [70]. Mian M, Tinelli M, DE March E, Turri G, Meneghini V, Pescosta N, Berno T ve ark. Bortezomib, Thalidomide and Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma? *Anticancer Res.* 2016;36(3):1059-65.
- [71]. Lee CH, Hyun MK, Jang EJ, Lee NR, Kim K, Yim JJ. Inhaled corticosteroid use and risks of lung cancer and laryngeal cancer. *Respir Med.* 2013;107(8):1222-33.
- [72]. Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 2013;140(12):2457-61

- [73]. Jung YW, Hysolli E, Kim KY, Tanaka Y, Park IH. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(2):125-30
- [74]. Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Lee HC, Hsu DM, Lin HL, Chen CC ve ark. Targeting cancer stem cells for treatment of glioblastoma multiforme. *Cell Transplant*. 2013;22(4):731-9.
- [75]. Takeuchi A, Eto M, Tatsugami K, Yamada H, Yokomizo A, Shiota M, Itsumi M ve ark. Renal cancer treatment with recipient lymphocyte infusion enhanced the antitumor effect of nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Immunol*. 2015;32(2):131-9.
- [76]. Ali S, Mondal N, Choudhry H, Rasool M, Pushparaj PN, Khan MA, Mahfooz M ve ark. Current Management Strategies in Breast Cancer by Targeting Key Altered Molecular Players. *Front Oncol*. 2016;6:45.
- [77]. Bandhavkar S. Cancer stem cells: A metastasizing menace! *Cancer Med*. 2016;5:649–655. doi: 10.1002/cam4.629.
- [78]. Bishayee A. Editorial: Current Advances in Cancer Prevention and Treatment by Natural Products. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2012;13:115–116. doi: 10.2174/138920112798868629.
- [79]. Manach C., Hubert J., Llorach R., Scalbert A. The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009;53:1303–1315. doi: 10.1002/mnfr.200800516.
- [80]. Bishayee A., Sethi G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. *Semin. Cancer Biol*. 2016;40–41:1–3. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.08.006.
- [81]. Orlikova B., Legrand N., Panning J., Dicato M., Marc D. Anti-Inflammatory and Anticancer Drugs from Nature. *Adv. Nutr. Cancer*. 2014;159:123–143.
- [82]. Tuorkey M.J. Cancer Therapy with Phytochemicals: Present and Future Perspectives. *Biomed. Environ. Sci*. 2015;28:808–819. doi: 10.1016/S0895-3988(15)30111-2.
- [83]. Russo M., Spagnuolo C., Tedesco I., Russo G.L. Phytochemicals in cancer prevention and therapy: *Truth or dare? Toxins*. 2010;2:517–551. doi: 10.3390/toxins2040517.
- [84]. Hussain S.S., Kumar A.P., Ghosh R. Food-based natural products for cancer management: Is the whole greater than the sum of the parts? *Semin. Cancer Biol*. 2016;40–41:233–246. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.06.002.
- [85]. Elsayed, H. E., Akl, M. R., Ebrahim, H. Y., Sallam, A. A., Haggag, E. G., Kamal, A. M., & El Sayed, K. A. (2015). Discovery, optimization, and pharmacophore modeling of oleanolic acid and analogues as breast cancer cell migration and invasion inhibitors through targeting Brk/Paxillin/Rac1 axis. *Chemical Biology & Drug Design*, 85(2), 231-243.
- [86]. Amara, S., Zheng, M., & Tiriveedhi, V. (2016). Oleanolic acid inhibits high saltinduced exaggeration of Warburg-like metabolism in breast cancer cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 74(3), 427-434.
- [87]. Song, X., Liu, C. C., Hong, Y. R., & Zhu, X. C. (2015). Anticancer activity of novel oleanolic acid methyl ester derivative in HeLa cervical cancer cells is mediated through apoptosis induction and reactive oxygen species production. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(4), 896-902.
- [88]. Oguro, T., Liu, J., Klaassen, C. D., & Yoshida, T. (1998). Inhibitory Effect of oleanolic acid on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-Induced gene expression in mouse skin. *Toxicological Sciences*, 45(1), 88-93.

- [89]. Tokuda, H., Ohigashi, H., Koshimizu, K., & Ito, Y. (1986). Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation: ursolic and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett*, 30, 143-151.
- [90]. Lee, K. R., Kozukue, N., Han, J. S., Park, J. H., Chang, E. Y., Baek, E. J., ... & Friedman, M. (2004). Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2832-2839.
- [91]. Afacan, C. (2018). Zeytin Meyvesi Metabolitleri Maslinik Asit ve Oleanolik Asitin Antitümöral Etkilerinin ve Etki Mekanizmalarının Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi. Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep*.
- [92]. Ataş MN, Ergen A. Betülinik asit ve antikanser etkileri. *Experimed* 2020; 10(3): 128-34.
- [93]. Baldissera, M.D., Souza, C.F., De Matos, A.F.I.M., Doleski, P.H., Baldisserotto, B., Da Silva, A.S. and Monteiro, S.G., 2018. Blood-brain barrier breakdown, memory impairment and neurotoxicity caused in mice submitted to orally treatment with thymol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 62, 114-119.
- [94]. Ortega, M.T., Jeffery, B., Riviere, J.E. and Monteiro-Riviere, N.A., 2016. Toxicological effects of pet food ingredients on canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and enterocyte-like cells. *Journal of Applied Toxicology*, 36 (2), 189-98.
- [95]. Gil da Costa, R.M., Oliveira, P.A., Bastos, M.M., Lopes, C.C. and Lopes, C., 2014. Ptaquiloside-induced early-stage urothelial lesions show increased cell proliferation and intact β -catenin and e-cadherin expression. *Environmental Toxicology*, 29, 763-769.
- [96]. Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A. and Rocha, S.M., 2014. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. *Food Chemistry*, 156, 204-211.
- [97]. *Annona muricata* Bitki Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hattında ve *Drosophila melanogaster* Model Organizma Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik Ve Biyomühendislik Anabilim Dalı *Yüksek Lisans Tezi*
- [98]. Ataş MN, Ergen A. Betülinik asit ve antikanser etkileri. *Experimed* 2020; 10(3): 128-34.
- [99]. Gyeong-Ji Kim(2018)Apoptosis :an International Journal on Programmed Cell Death, 01 Jun 2012, 17(6):612-626

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Fakülte	Ziraat Fakültesi
Bölümü	Tarımsal Biyoteknoloji
Mezuniyet Yılı	2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	-
Mezuniyet Tarihi	Devam Ediyor

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	
Programı	Program Adı
Mezuniyet Tarihi	

Makale ve Bildiriler	
Doç.Dr. Serap Yalçın Azarkan , Doç.Dr. Fahriye Ercan , Şerif Yasin Köksal Investigation of the Toxic Effect of Oleanolic Acid On the Model Organisms Drosophila Melanogaster. 6. Uluslararası Akademik Araştırmalar Kongresi (23 – 25 Ağustos 2021/ Online) (İCAR) Makale id= 30	