



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA *Arum dioscoridis* BİTKİ EKSTRAKTININ
ANTI-KANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bermal BAŞBUĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

II. TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ

Gaziantep
2023



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA *Arum dioscoridis* BİTKİ EKSTRAKTININ
ANTI-KANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bermal BAŞBUĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

II. TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ

Gaziantep
2023

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA *Arum dioscoridis* BİTKİ EKSTRAKTININ
ANTI-KANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bermal BAŞBUĞ

Tez Savunma Tarihi: 22.09.2023

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Serap Sergül İNALÖZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ

II. Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Serap Sergül İNALÖZ

.....

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA

.....

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazılması sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

22.09.2023

Bermal BAŞBUĞ

TEŞEKKÜR

Ciddi emek ve özveri ile hazırladığım yüksek lisans tezimi tamamlamanın heyecanını ve gururunu yaşıyorum. Öncelikle Uşak Üniversitesi lisans eğitimim boyunca bilgileriyle ıslık tutan, akademik yolda yürümem için cesaretlendiren ve öncülük eden, çalışma prensibini, güzel ahlakını ve yüce gönüllülüğünü örnek alacağım çok saygıdeğer üstadım Sayın Prof. Dr. Recep LİMAN'a,

Gaziantep Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı üstlenen konu seçiminden, araştırmanın yürütülmesine dek beni sınırlamayıp özgür bırakan, yüksek lisans öğrencisinin yeterliğini göstermesine olanak tanıyan, tez çalışmamın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ'ne,

Bitki materyali, ekstrakt analiz işlemleri ve teşhisi ile ilgili yardımlarından dolayı II. danışman hocam Sayın Doç. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana emek veren hocalarım Gaziantep Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Serap S. İnalöz'e, Sayın Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜRKER'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülüna ERDEM KOÇ'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Büşra ŞEN'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hülya BİRİNCİ'ye,

Tez çalışmalarımın uygulama sürecinde katkılarını ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN'e, Sayın Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem KARACA'ya,

Güçlü psikoloji gerektiren COVID-19 ve deprem sürecinde destek olan, başarıma kendi başarısıymış gibi mutlu olan arkadaşlarım Nazife MERCAN'a, Müzeyyen BUDAK'a, Dilan ATAŞ'a ve Ozan GÜÇSÜZ'e,

Maddi ve manevi anlamda bana destek olan kıymetli aileme, kuzenim Belgen KAÇMAZ'a, her daim benimle olan bölüm arkadaşlarıma ve bitki toplama alanındaki yardımları için eniştem ve teyzeme tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu proje Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB) tarafından (BAP No: TF.YLT.22.53) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Pankreas Kanseri ve Gelişimi	5
2.1.1. Pankreas kanseri epidemiyolojisi	7
2.1.2. Pankreas kanseri risk faktörleri	8
2.1.3. Moleküler mekanizmaları	11
2.1.4. Moleküler patolojisi	13
2.1.5. Tanı ve tedavi yöntemleri	15
2.2. Pankreas Kanseri Hücre Hattı (PANC-1)	16
2.3. İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı (HEK293)	16
2.4. <i>Arum dioscoridis</i> (Araceae)	16
2.5. Fenolik Bileşikler	18
2.6. Apoptoz	18
2.7. İnflamasyon	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	27
3.3. Çözeltiler ve Hazırlanma Şekli	29
3.4. Bitki Örneği	30
3.5. Kullanılan Yöntemler	31
3.5.1. <i>Arum dioscoridis</i> bitki ekstraksiyonu	31

3.5.2. Toplam fenolik madde miktarı tayini.....	32
3.5.3. LC-MS/MS analizi	33
3.5.4. <i>in vitro</i> antioksidan aktivitenin belirlenmesi	34
3.5.4.1.DPPH radikali giderici aktivite tayini	34
3.5.5. Hücre kültürü	35
3.5.5.1. Hücrelerin çözündürülme ve büyütülme aşaması	36
3.5.5.2. Hücrelerin pasajlanması ve sayımı	36
3.5.5.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması	37
3.5.6. ADEE'nin stok solüsyonunun hazırlanması	37
3.5.7. ADEE'nin hücrelerde sitotoksikite testi (MTT)	38
3.5.8. Histopatolojik İnceleme	39
3.5.8.1. Işık mikroskobu için hücrelerin hazırlanması	39
3.5.8.2. Kesitlerin alınması ve boyanması	39
3.5.8.3. İmmünohistokimyasal incelemeler	40
3.5.8.4. İmmünohistokimyasal incelemeler	41
3.5.9. PANC-1 ve EK293 hücre hatlarından total RNA izalasyonu	42
3.5.10. cDNA sentezi	44
3.5.11. Kantitatif gen ekspresyon analizi (qRT-PCR)	44
3.5.12. Primerlerin çözündürülmesi ve hazırlanması	45
3.5.13. Semi- kantitatif protein ekspresyon (Western blot) analizi	46
3.5.13.1. Total proteinin izole edilmesi	46
3.5.13.2. Qubit ile protein konsantrasyon analizi	47
3.5.14. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi.....	47
3.5.15. Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi.....	48
3.6. İstatistiksel Analizler.....	50
4. BULGULAR.....	52
4.1. ADEE'nin Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları.....	52
4.2. LC- MS/MS ile ADEE'nin Fenolik İçerik Analiz Sonuçları	53
4.3. ADEE'nin <i>in vitro</i> Antioksidan Aktivite Sonuçları	56
4.4. ADEE'nin Sitotoksik Etkisinin Sonuçları.....	57
4.4.1. ADEE'nin PANC-1 pankreas kanser hücrelerine sitotoksik etkisi	57
4.4.2. ADEE'nin HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerine sitotoksik etkisi	59
4.5. Işık Mikroskobu Bulguları	60

4.6. İmmünohistokimya ve İmmünositokimya Bulguları	61
4.7. Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları.....	64
4.7.1. ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücre hattında hedef genlerin ifade düzeylerine etkisi	64
4.8. Semi- Kantitatif Protein Ekspresyon Analiz (Western blot) Sonuçları.....	71
4.8.1. ADEE'nin PANC-1 kanser hücrelerindeki etkisinin Western blot ile analizi	71
4.8.2. ADEE'nin HEK293 hücrelerindeki etkisinin Western blot ile analizi.....	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
6. KAYNAKÇA.....	84
EKLER.....	101
ÖZGEÇMİŞ	102

SİMGE ve KISALTMALAR

°C:	Santigrat derece
µL:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre
TNFR:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
ACTB:	β-aktin
Apaf-1:	Apoptotik Protein Aktive Edici Protein-1
ADEE:	<i>Arum. dioscoridis</i> etanol ekstraktı
BCL-2:	B hücre lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2)
bç:	Baz çifti
cDNA:	Complementary DNA/Komplementer DNA
c-kit:	KIT proto-onkogen receptor tirozin kinaz
cm:	santimetre
Ct:	Cycle threshold/Eşik döngüsü
DAB:	3,3'-Diaminobenzidine
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
dNTP:	Deoxynucleoside triphosphate
ER:	Endoplazmik retikulum
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase/Ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
H-E:	Hematoksilen – Eozin
IL-6:	İnterlökin-6
KRAS:	Kirsten rat sarcoma virus /Kirsten sıçan sarkom virüsü
M:	Molarite
mL:	Mililitre
mm:	Milimetre

mM:	Milimolarite
mRNA:	Messenger RNA/Haberci RNA
nm:	Nanometre
p53:	Tümör protein p53
PBS:	Phosphate-buffered saline/Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDAK:	Pankreatik duktal adenokarsinom
qPCR:	Quantitative polymerase chain reaction/Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik asit
rpm:	Rotations Per Minute/Dakikadaki Devir Sayısı
S:	Serin
VEGF:	Vascular endothelial growth factor/Vasküler endotelyal büyüme faktörü
β:	Beta
ϵ:	Epsilon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Pankreas yapısı ve pankreas hücreleri	5
Şekil 2. 2: Pankreatik kanserin gelişim modeli	7
Şekil 2. 3: PanIN'ın genetik değişikliklerini gösteren ilerleme modeli	12
Şekil 2. 4: Apoptoz sinyal yollarına ve bunları etkileyen hayatta kalma yanlısı, bağışıklık veya tümör mikro-ortam etkilerine genel bakış	21
Şekil 2. 5: Apoptozdaki yolakları hedef alan kanser terapötik yaklaşımlar	23
Şekil 3.1: LC-MS/MS metodunda kullanılan fitokimyasal standartlarının TIC kromatogramı	33
Şekil 4. 1: ADEE 'nin LC-MS/MS kromatogramı	56
Şekil 4. 2: IL-6 antikorunun ADEE'nin gruplar arası immünreaktivite etkisi	64
Şekil 4. 3: ADEE'nin, gruplar arasında TP53 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	65
Şekil 4. 4: ADEE'nin, gruplar arasında ERK1/2 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	65
Şekil 4. 5: ADEE'nin, gruplar arasında BAX genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	66
Şekil 4. 6: ADEE'nin, gruplar arasında CASP3 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	66
Şekil 4. 7: ADEE'nin, gruplar arasında BCL-2 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	67
Şekil 4. 8: ADEE'nin, gruplar arasında HMGB1 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	67
Şekil 4. 9: ADEE'nin, gruplar arasında MYC genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	68
Şekil 4. 10: ADEE'nin, gruplar arasında MTOR genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi	68
Şekil 4. 11: Semi-kantitatif olarak ADEE'nin belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda PANC-1 hücrelerinde (Grup 1 ve Grup 2) protein ekspresyonuna etkisi	71
Şekil 4. 12: Semi-kantitatif olarak ADEE'nin belirlenen IC ₅₀ konsantrasyonunda HEK293 hücrelerinde (Grup 3 ve Grup 4) protein ekspresyonuna etkisi	72

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: <i>Arum dioscoridis</i> sınıflandırması	17
Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler.....	25
Tablo 3. 2: Tezde kullanılan malzeme ve cihazlar.....	27
Tablo 3. 3: Kullanılan çözeltilerin hazırlanma şekli	29
Tablo 3. 4: Deney grupları	37
Tablo 3. 5: Hücre bloğu için kısa takip protokolü	39
Tablo 3. 6: DNaz muamelesi için gerekli reaksiyon bileşenleri	43
Tablo 3. 7: qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı	44
Tablo 3. 8: Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) deneyinde kullanılmak üzere 8 gen için Forward ve Reverse primer çiftleri	46
Tablo 3. 9: SDS jel elektroforezinde kullanılan ayırma jelindeki değerler	48
Tablo 3. 10: SDS-PAGE jel elektroforezinde kullanılan yükleme jelindeki değerler ...	48
Tablo 3. 11: Western blot tayini için kullanılan birincil antikorlara ait bilgiler	49
Tablo 3. 12: Western blot tayini için kullanılan ikincil antikorlara ait bilgiler	49
Tablo 4. 1: ADEE' deki fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg)	54
Tablo 4. 2: IL-6 antikorunun ADEE'nin gruplar arası immünreaktivite ortalama ve standart sapmaları	63
Tablo 4. 3: 8 genin ADEE'nin farklı gruplarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri ortalamaları ve standart sapmaları	70
Tablo 4. 4: ADEE'nin farklı gruplarda protein ekspresyon değerleri ortalamaları ve standart sapmaları	73

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3. 1: <i>Arum dioscoridis</i> (orijinal) arazideki resmi	30
Resim 3. 2: <i>Arum dioscoridis</i> referans materyali resmi.....	31
Resim 3. 3: <i>Arum dioscoridis</i> ekstresi, ultrasonikatör ve evaporatör.....	32
Resim 4. 1: a: 1,25 mg/ml ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi. b: 2,5 mg/ml ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi. c: 5 mg/ ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi	52
Resim 4. 2: Farklı konsantrasyonlardaki Gallik asit için gözlenen toplam fenolik madde miktarı deney sonuçları	53
Resim 4. 3: Farklı konsantrasyonlardaki ADEE' nin 1 saat sonra DPPH üzerine etkisinin gösterilmesi	57
Resim 4. 4: MTT Testi (PANC-1) a. PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. b. PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. c. PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 72 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	58
Resim 4. 5: MTT Testi (HEK293) a. HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. b. HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. c. HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 72 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.....	59
Resim 4. 6: A: PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'in histolojik görünümü (H-E, x400). B: PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'nin histolojik görünümü (H-E, x400). C: HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'ün histolojik görünümü (H-E, x400). D: HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'ün histolojik görünümü (H-E, x400)	61
Resim 4. 7: A: IL-6 antikorunun negatif kontrol boyaması (Timus, x200). B: IL-6 antikorunun pozitif kontrol boyaması (Timus, x200). C: PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1 boyaması (IL-6, x400). D: PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2 boyaması (IL-6, x400). E: HEK293 kontrol grubu olan Grup 3 boyaması (IL-6, x400). F: HEK293 uygulama grubu olan Grup 4 boyaması (IL-6, x400).....	62

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4. 1: ADEE'nin, antioksidan aktivite bulguları	56
Grafik 4. 2: PANC-1 hücre hattında ADEE'nin, canlılık üzerine etkisi	58
Grafik 4. 3: HEK293 hücre hattında ADEE'nin, canlılık üzerine etkisi	60



ÖZET

PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA *Arum dioscoridis* BİTKİ EKSTRAKTININ ANTI-KANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bermal BAŞBUĞ

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

II. Tez Danışmanı: Doç. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ

Eylül 2023, 117 sayfa

Malign özelliği yüksek olan pankreas kanseri, erken tanısının zor olması ve hızlı metastaz riskiyle ölüm oranı yüksek olan ciddi bir hastalıktır. Fenolik bileşikler kanserin başlama, ilerleme, anjiyogenez ve metastaz aşamalarında pek çok yolla etkili olabilmektedir. Çalışmamızda *Arum dioscoridis* etanol ekstraktının (ADEE) pankreas kanseri üzerindeki anti-kanserojenik etkilerinin, *in vitro* kültür ortamında PANC-1 hücreleriyle belirlenmesi hedeflendi. *A. dioscoridis* bitkisinin etanol ekstraksiyonu yapılmıştır. ADEE'nin toplam fenolik madde içeriği $2,4732 \pm 0,05$ µg GAE/mg ekstrakt olarak saptanmıştır. Anti-oksidan aktiviteyi tanımlamak amacıyla yapılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal yakalama yöntemiyle IC₅₀ değeri 76,494 µg/ml olarak saptanmıştır. LC-MS/MS'le ekstrakta en fazla miktarda bulunan fenolik bileşik sinarosid (4,948 mg/kg) olarak tespit edilmiştir. PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisi MTT'yle belirlenerek, hücrelere IC₅₀ dozlarında 48 saat ADEE uygulaması yapılmıştır. Western blot, qRT-PCR yöntemiyle kantitatif ekspresyon analizi ve inflamasyon tespitine ilişkin immünoreaktivite çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, *A. dioscoridis*'in, PANC-1 hücre hattında anti-proliferatif ve anti-enflamatuar etkilerinin tespit edilmesine rağmen, anti-kanser etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, *Arum dioscoridis*, İnflamasyon, PANC-1, Pankreas kanseri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCEROGENIC EFFECTS OF *Arum dioscoridis* PLANT EXTRACT ON PANCREATIC CANCER CELL LINE

Bermal BAŞBUĞ

Master of Science Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor: Asist. Prof. Nuray BOSTANCIERI

Second Thesis Advisor: Assoc. Dr. Remziye Aysun KEPEKÇİ

September 2023, 117 pages

Pancreatic cancer, which is highly malignant, is a serious lesion with a high mortality rate due to the difficulty of early diagnosis and the risk of rapid metastasis. Phenolic compounds can be effective in many pathways in cancer initiation, progression, angiogenesis and metastasis stages. The aim of our study was to determine the anticarcinogenic effects of *Arum dioscoridis* ethanol extract (ADEE) on pancreatic cancer using PANC-1 cells in *in vitro* culture medium. Ethanol extraction of *A. dioscoridis* was performed. The total phenolic content of ADEE was determined as 2.4732 ± 0.05 µg GAE/mg extract. The IC₅₀ value was determined as 76.494 µg/ml by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical capture method to define the anti-oxidant activity. The highest amount of phenolic compound in the extract was determined as cynaroside (4,948 mg/kg) by LC-MS/MS. The effect on cell viability in PANC-1 and HEK293 cell lines was determined by MTT and the cells were treated with ADEE at IC₅₀ doses for 48 hours. Western blot, quantitative expression analysis by qRT-PCR and immunoreactivity studies for inflammation detection were performed. As a result, it was observed that *A. dioscoridis* had anti-proliferative and anti-inflammatory effects in PANC-1 cell line, but no anti-cancer effect.

Key Words: Apoptosis, *Arum dioscoridis*, Inflammation, PANC-1, Pancreatic cancer.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser hücreleri, kendi proliferatif sinyallerini üretebilen, proliferasyonu inhibe edebilen taşıyıcı sinyallere dirençli ve apoptozisten kaçabilen hücrelerdir [1]. Anjiyogenez adı verilen yeni damarın oluşturulmasıyla kanser 2-3 mm³'ten daha büyük boyuta gelebilmektedir. Bu damarlanma ile oluşan tümör vaskülarizasyonu düzensiz, fonksiyonel olarak az gelişmiş, vaskülarizasyondur [2]. Tümörü besleyen damar oluşumu arttıkça boyutunda büyüme olur, tümörlü doku iç basıncı artmaya devam eder. Tümörün iç bölgelerine kemoterapötik ilaçların iletilmesi zorlaşır. Pankres kanseri, kötü prognozu nedeniyle ülkelerin genelinde iki cinsiyette de (erkekler-kadınlar) kanserin sebep olduğu ölümlerin önde gelen yedinci nedenidir. Teşhis edilen vaka sayısı ile ölüm oranı birbirine yakındır. 2017'nin başlarında, meme kanserini geride bırakarak Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kansere bağlı ölümlerin yalnızca kolon ve akciğer kanserinin ardından üçüncü önde gelen nedeni haline gelmiştir. Diğer kanserlere kıyasla, insidans ve mortalite açısından artış devam etmektedir [3].

Son yıllarda kimyasal ilaçların yan etkilerinin çok ciddi hasarlar oluşturmamasından dolayı alternatif tedavi ya da tamamlayıcı tıp yaklaşımları tercih edilmektedir. Bu sebeple araştırmacılar, fitoterapi ve etnofarmakoloji çalışmalarına daha çok yönelmişlerdir. Ülkemizde bulunan zengin tür çeşitliliği bu noktada büyük önem arz etmektedir [4]. *Araceae* ailesine ait olan *Arum dioscoridis* Sm., yayılışı ülkemizde öncelikli şehir olarak Adana ve yakındaki şehirler, Akdeniz'in Doğusu, Anadolu'nun Güneybatısıdır. Bitkinin yaprak kısmı kaynatılarak oluşan ekstrenin anti-kanserojenik etkisi olduğu konusunda çalışmalar yapılmıştır [5-7].

2009 yılında yapılan bir çalışmada Uğuzlar ve ark. ülkemizde bulunan *A. dioscoridis* bitki ekstraktının Hyper Pressure Liquid Chromatography (HPLC) yöntemiyle analiz sonucu fenolik bileşikler varlığını öne sürmüşlerdir. *A. dioscoridis* bitki özütünün fenolik bileşik içeriğinin 1600 µg/g olarak yüksek miktarda varlığı ve antioksidan özelliklerinden dolayı kanser araştırmaları için kullanılmaya uygun olduğu tespit edilmiştir [8]. Kanser tüm evrelerinde fenolik bileşiklerin birçok yolla etkili olduğu bilinmektedir [9]. Yapılan bir çalışmada radikal süpürücü özellikleri ve toplam fenolik içeriği üzerine *A. dioscoridis*'in fenolik bileşik içeriklerinin etanol ekstraksiyon analiz sonucunda radikal süpürücü özelliğinin olduğu daha fazla çözünürlük gösterdiği bildirilmiştir [10].

A. dioscoridis özütü içerisinde bulunan fenolik bileşiklerden dolayı anti-kanser etkileri olduğu beklenmektedir. *Arum*'un alt türü olan *Arum palaestinum* ve *A. dioscoridis* potansiyel olarak anti-kanser etkiye sahiptir [11]. Tedavi yollarının geliştirilmesi açısından kanser oluşum mekanizmalarının anlaşılması, önem arz etmektedir. İnflamasyon da kanser oluşumunda yer alan önemli süreçlerdendir. İnflamasyon sürecinin 19. yüzyılda kanser oluşumu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Günümüzde de bu konuya olan ilgi artmıştır [12].

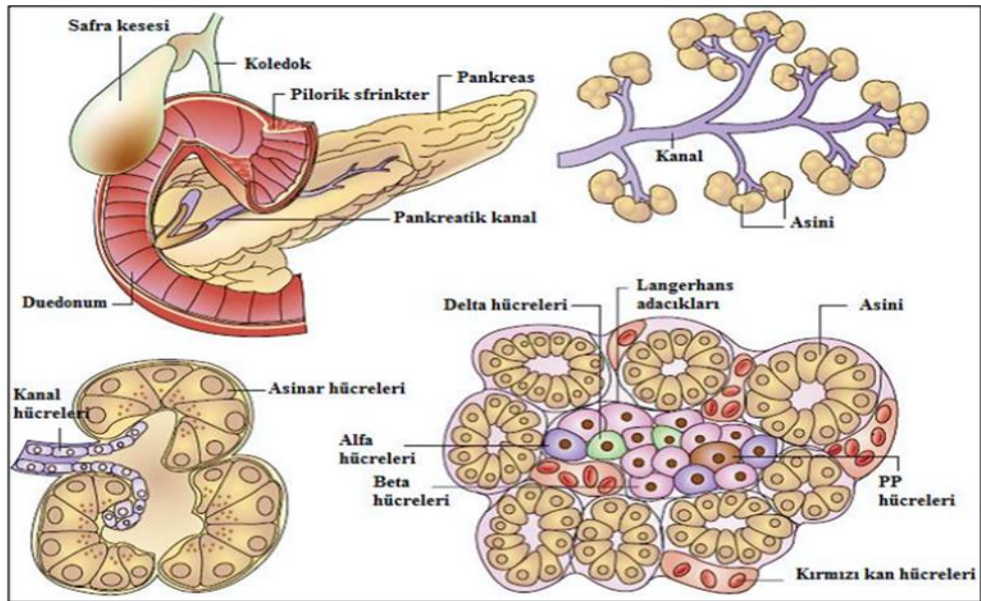
Literatürde bitkinin etanol ekstraktının PANC-1 hücre hattı üzerindeki etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *Arum* taksonlarına Avrupalı, Asyalı ve özellikle Türk halkı aşına iken, *A. dioscoridis* ile ilgili çok az çalışma tespit edilmiştir. Sunulan tezde, PANC-1 hücrelerinde *A. dioscoridis*'in sitotoksik etkisini, ADEE uygulaması sonrası aktive ve inhibe olan farklı sinyal yollarını m-RNA ve protein seviyesinde incelemeyi hedefledik. Ayrıca inflamasyon tespitine ilişkin pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını içeren IL-6'nın immünoaktivitesi incelendi. IL-6 ekspresyonu immünositokimya analizi sonucu ile belirlendi. Bu anlamda IC₅₀ dozunda ADEE uygulamasının olası anti-kanser etkilerini sinyal yolağının ana hattı olan ERK1/2, MYC, TP53, MTOR ve HMGB1 genlerinin ve apoptotik genler olan CASP3, BCL-2 ve BAX genlerinin ekspresyon düzeyleri çözümlenerek incelendi. ADEE'nin pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik etkisi CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Western-blot ile analizi sonucu belirlendi.

Yapılan bu tez kapsamında elde edilen bulguların özellikle pankreas kanseri gibi kanser hastalıklarının tedavisine yönelik yeni strateji ve hedef moleküllerin bulunmasına katkı sağlaması ön görülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri ve Gelişimi

Pankreas kanseri, şu ana kadar tedavi edilebilir bir kemo-tedavisi olmayan yıkıcı ve ölümcül bir insan malignitesidir. Pankreas dokusunda malign hücrelerin varlığından kaynaklanan hastalık, endokrin pankreasın %5'lik, ekzokrin pankreasın %95'lik kısmından köken alan malign neoplazmalardır. Duktal adenokarsinomlar pankreatik duktal epitelyumu örten hücrelerden kaynaklanır, kanserlerin en yaygın tipi olup tüm pankreas kanserlerinin %85'ini oluşturur. Pankreasın ekzokrin kısmı, sindirim enzimlerinin üretimini sağlayan ve onikiparmak bağırsağına salgılayan, kan damarları, sinirler ve bağ dokusu ile ilişkili duktal ve asinar hücreleri içeren kısımdır. Duktal hücreler, elektrolit ve su salgılanmasından sorumlu iken, asinar hücreler pankreasdaki ekzokrin kısmın enzim sekresyonundan sorumlu olan asinusları oluşturmaktadır. Endokrin pankreas ise dört çeşit hücreden meydana gelmektedir. Beta- β hücresi insülin ve amilin salgılar, Alfa- α glukagon salgılar, Delta- δ somatostatin salgılar ve Pankreatik polipeptit-PP pankreatik polipeptit salgılar. Bu hücrelerin kümelenerek birleşmesiyle Langerhans Adacıkları oluşur ve bu adacıklar bütün pankreasın yüzde 1-2'lik bölümünü teşkil eder [13]. (Şekil 2.1)'de gösterilmektedir.



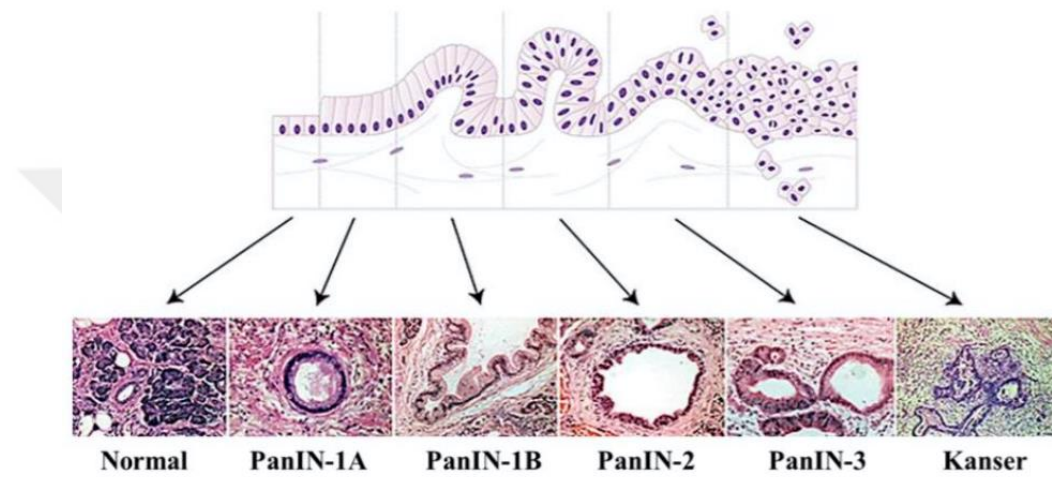
Şekil 2. 1: Pankreas yapısı ve pankreas hücreleri [14].

İnvaziv özelliği olan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC)'lar; invaziv olmayan öncü lezyonlardan, pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller musinöz neoplazi (IPMN) ve musinöz kistik neoplazi (MCN) gelişmesiyle meydana gelir. Non-invaziv lezyonlardan invaziv karsinomaya geçiş görülmektedir [15].

PanIN'ler, pankreasın küçük intralobüler kanallarından kaynaklanan hem fonksiyonel hem de sitolojik olarak çeşitli paternler gösteren mikroskobik (genellikle 1-4 mm) epitelyal neoplazmalardır. Yaş ile birlikte artan insidansa sahip ve yerleşimi pankreasın baş bölgesinde yaygın olarak görülen lezyonlarda, kübik epitel yapısında değişim söz konusudur. Epitelyal atipi derecesine göre minimal atipi, orta atipi ve yüksek atipi olmak üzere PanIN-1, PanIN-2 ve PanIN-3 şeklinde sınıflandırılmaktadır. Silindirik epitel hücreli PanIN-1, PanIN-1A ve papiller tip PanIN-1B olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. PanIN-2 yalancı çok katlı epitel hücreli ve PanIN-3 ise papiller ve kribriform yapılı olup, bazı durumlarda kanal lümeninde hüce kümeleri tomurcuklanmaktadır. PanIN-1 ve PanIN-2 normal pankreatik yapıda bulunduğu gibi, %60 ya da üzeri karsinomlu yapılarda da bulunduğu için klinik olarak önem arz etmemektedir. PanIN-3 invaziv karsinomlu durumlarda çok yaygın iken, karsinomsuz durumlarda çok nadir olarak bulunmaktadır. Klinik öneme sahip olan bu lezyonlar genetik değişikliklerin düzeyine bağlı olarak farklı histopatolojik paternlere ve farklı moleküler hastalıklara sahiptir.

IPMN'ler, sıklıkla uzun parmak benzeri papiller formda oldukça büyük müsin üreten epitelyal neoplazilerdir. Genellikle pankreas başında ortaya çıkmakla birlikte, boyutu 1 cm'den büyüktür. Displazi dereceleri, müsin sekresyonu, papiller oluşumu ve kanal genişlemesi (kist oluşumu) değişkenlik göstermektedir. Müsinöz kistik neoplazilerde karakterize edilen "overtipi" hiperselüler periduktal stromadan yoksundur. Displazi derecelerine ve invaziv karsinomla bir ilişkisinin olup olmamasına göre düşük, orta, yüksek dereceli displazi ve invaziv karsinom displazi olarak sınıflandırılmaktadır. Morfolojisine göre köken aldıkları bölgeler ana duktal tip (MD-IPMN) ve branşiyal duktal tip (BD-IPMN) olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Ana ve branşiyal kanalın gözlendiği durum olan kombine duktal tip de bulunmaktadır. İmmünohistokimyasal boyanma özelliklerine göre onkositik, gastrik, intestinal ve pankreatobiliyer olarak sınıflandırılır. Kökeni branşiyal duktal olan gastrik tip ana duktal kökenli olan diğer tiplerdir. [16]. Pankreasın ayırıcı over-tip stromalı musinöz kistik tümörleri MCN'lerdir. Hücrelerin müsin üretebilen epitelyal tabakalarında ortaya çıkarlar. Erkeklere nazaran kadınlarda daha çok görülmektedir.

Bu lezyonların pankreastaki kanallar ile bağlantısı yoktur. Pankreastaki yerleşim yeri gövde kısmı ve kuyruk kısmıdır. Çok nadir görülmektedir. Yaklaşık olarak 6-10 cm boyutları ve ortalama 2-35 cm geniş çapta büyüme eğilimindedir [17,18]. Histolojik incelemede; silindirik şekilli hücrelerden oluşmakta ve farklı derecelerde displazili epitelyal yapı görülmektedir. Displazi derecelendirmesi düşük MCN, orta MCN ve ileri MCN olarak üç ayrı grupta toplanmaktadır. Duktal adenokarsinomları oluşturmak üzere üçte birlik kısmı invaziv hale gelebilir [19-22].



Şekil 2. 2: Pankreatik kanserin gelişim modeli [23].

2.1.1. Pankreas kanseri epidemiyolojisi

Sağkalım oranları; tanı anında evreleme, yaş, pankreas kanser türü, doku kitlesinin boyutu, cinsiyet, iyileştirme metodları, sağlık yöntemlerinin bulunabilirliği ve farklılıklarına benzer diğer etkenlerden etkilenir. Yaşam biçimi de en etkili faktörlerden biridir [24]. Yılda 331.000 kişinin ölümüne sebep olduğu için dünya çapında yedinci önde gelen kanser türüdür. ABD gibi gelişmiş ülkelerde çok sık görülen kanser ölümleri arasında sıralamada baştan 3.'dür [25]. 2018'de GLOBOCAN sayım verilerinde 459.000'a yakın yeni pankreas kanseri hasta tespit edilmiştir. Bu vakalardan 432.250'ye yakın kişi ölümle sonuçlanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak kanser sebebiyle ölmüş olan bütün vakaların yüzde 4,5'idir. 2018 yılında ölüme neden olan 11. en yaygın kanser olarak sıralanmıştır. 2040 yılına kadar 355.000 yeni vakanın meydana geleceği tahmin edilmektedir. 5 yıllık %9 sağkalım oranına sahiptir. Mortalitesi ve insidansı, dünya çapında artmakta olan yaş ile ilişkilidir.

Standart Yaş Oranı (ASR) insidansı en düşük ortalama kişi oransal olarak 2,2:100.000 oranıyla Afrika ülkelerinde ve 7,7:100.000 oranıyla Avrupa ülkelerinde ve Kuzey Amerika' da görülmüştür [26,27]. Avrupa ülkelerinde yüksek sıklıkla görülmektedir. Orta Avrupa, Arjantin ve Kuzey Amerikada en yüksek insidans oranları gözlenmiştir. Doğu Asya ve Afrika ülkelerinde ise en düşük insidans oranları gözlenmiştir [28]. Kadınlarla kıyaslama yapıldığında erkeklerde daha fazla izlenmiştir. Kadınlarda 216 bin vaka (4/100 bin) erkeklerde ise 243 bin vaka (5,5/100 bin) gözlenmiştir. Pankreas kanserinin erkeklerde görülme frekansı özellikle Moldova ve Letonya'da (15.3), Doğu ve Orta Avrupa'da, en fazla gözlenmektedir. Batı Avrupa'da da (7.2) ile en yüksek pankreas kanserinin insidansına kadınlar sahiptir. Pankreas kanseri 55 yaşın altında nadiren görülmektedir. Popülasyon olarak yaşlı grubunun fazlalığından yaşlı büyük popülasyonun hastalığı olarak tanımlanmaktadır [29-31]. 2015 yılına ait Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerinden faydalanarak pankreas kanserine en sık görülen 10 kanser türünde 100.000 kişi içerisinde erkeklerde 6'ya yakın bir değer görülmüştür [32].

2.1.2. Pankreas kanseri risk faktörleri

Pankreas kanseri için risk faktörleri değiştirilemez (yaş, cinsiyet, bölge, kan grubu, aile öyküsü ve genetik yatkınlık, diyabet) ve değiştirilebilir (sigara, alkol, kronik pankreatit obezite, diyet faktörleri, enfeksiyon) olarak sınıflandırılır.

2.1.2.1. Değiştirilemeyen Risk Faktörleri

Yaş: Pankreas kanseri genellikle yaşlı erişkinlerde görülür ve 30 yaşın altındaki gençlerin hastalığa yakalanması nadirdir. Yeni tanı konulan hastaların yaklaşık %90'ı 55 yaşın üzerindedir ve bunların çoğu 70-80 yaşları arasındadır [33].

Cinsiyet: Dünyada pankreas kanseri insidansı kadınlarda erkeklere göre daha düşüktür. Gelişmiş ülkelerde bu fark daha da belirgindir. Bunun nedeni, kadınlarda steroid düzeylerinin erkeklere göre daha yüksek olması olabilir, bu da pankreas kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olabilir [34].

İrk: Pankreas kanseri insidansı dünyanın farklı yerlerinde değişir. Çin'de kanserin sağlık yükü giderek artmakta ve son yıllardaki büyüme hızı dünya ile paralellik göstermektedir.

2018 itibariyle, dünyadaki pankreas kanserli kişiler arasında en yüksek ASR insidansı Avrupa (7.7/10 milyon) ve Kuzey Amerika'da (7.6/10 milyon, Okyanusya'dır [6.4/10 milyon]). Afrika'daki tahmini insidans oranı (100.000 kişi başına 2.2) ile en düşüktür. ABD'nde, Asyalı Amerikalılar ve Pasifik Adalılar en düşük insidansa sahipken, Afrikalı Amerikalılar ise en yüksek insidansa sahiptir [35]. Ülkemizde 2003 veri sonuçlarına göre yıllık insidansı 100.000'kişide, erkek bireylerde 6,3 kadın bireylerde 3,6'dır [36].

Kan grubu: ABO kan grubu antijeni, kırmızı kan hücrelerinin tüm yüzeyinde bulunur. Pankreas kanseri gelişimiyle ilgili yapılan son çalışmalar, kan grubu antijenlerinin pankreas kanseri riskini etkilediğini göstermiştir. Diyabetli kişiler arasında A, AB veya B tipi kan grubuna sahip kişiler, O grubuna göre daha yüksek pankreas kanseri geliştirme riskine sahiptir. Mekanizma, kanser progresyonu ve metastazın teşviki ile ilgili olabilecek ABO kan grubu ile ilgili konakçı inflamatuvar sürecin düzenlenmesini içerebilir. ABO antijenini kodlayan gen, sICAM-1 ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi çeşitli plazma bileşenleri ile ilişkilendirilebilir. Bu proteinler, bağışıklık hücresi alımı için gerekli olan adezyon molekülleridir ve bu nedenle sistemik inflamasyona aracılık eder. ABO kan grubunu kodlayan genin, tümör oluşumu ve malignitede doğrudan bir rol oynadığını ve tümör hücresi immün sürveyansı, hücre yapışması, tümör apoptoz ve anjiyogenez ile ilgili olduğunu göstermektedir [37].

Genetik faktörler: Son yıllarda yapılan araştırmalar, pankreas kanserinin net bir aile temeline sahip olduğunu ve ailede pankreas kanseri öyküsünün hastalık riskini büyük ölçüde artırdığını bulmuştur. Esas olarak genetik ve edinilmiş gen mutasyonlarından kaynaklanır. Pankreas kanserinin %80'inden fazlası sporadik mutasyonlardan kaynaklanır, az sayıda vaka spesifik genetik mutasyonlar sebebiyle olmaktadır. Birinci derece akraba sayısındaki artışla birlikte ailesel pankreas kanseri riski katlanarak artmaktadır [38]. Japonya ve Çin'de bilim adamları tarafından 10q26.1, 13q22.1, 15q14, 12p11.21, 7q36.2, 21q22.3, 21q21, 3, 6p25.3, 5p13.1, 22q13.32'de kromozomal anormallikler keşfedilmiştir. Avrupa'daki en geniş genom koleksiyonunda, 7p12, 1p36.33, 8q21.11, 17q12 ve 18q21.32, kromozomal delesyonlar yeni Pankreas kanser duyarlılığı olarak tanımlanmıştır [39]. Kirsten sıçan sarkom virüsü /Kirsten rat sarcoma virus (KRAS), BRCA2, BRCA1, SMAD4, STK11, PRSS1, TP53, CDKN2A (P16) ve MMR'teki Nokta mutasyonları pankreas kanserinde en sık yer alan mutasyonlardır.

Pankreas kanseri kök hücrelerinde, esas olarak kromatin düzenleyici proteinlerdeki mutasyonlar sürecinde ve epitelyal mezenşimal geçişi /epithelial mesenchymal transition (EMT) kontrolünde ortaya çıkan belirgin epigenetik değişiklikler vardır. Ancak bu değişiklikler genetik dizideki değişiklikleri içermez. Yalnızca DNA ve kromatin yapısı ya da kimyasal değişiklikler söz konusu olduğu için bu değişiklikler hücrenin genel fenotipik durumunu etkiler. Bu fikirlere dayanarak, bazı araştırmacılar epigenetik düzenleme sürecini engellemenin yeni pankreas kanseri tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunup bulunmadığını araştırmaya başladılar [40].

Diyabet: Tip 1 diyabette hastalık süresi 10 yıldan fazla olan hastalarda pankreas kanseri riski 5-10 kat artmaktadır. 20 yıldan uzun süredir diyabet teşhisi konan diyabetli kişiler daha yüksek pankreas kanseri riski altındadır [41]. Son zamanlarda, bir çalışmada 7,5 milyon kişinin takibi sırasında 2002 pankreas kanseri vakası tespit edilmiştir. Diyabeti olmayan hastalarla karşılaştırıldığında, yeni diyabet tanısı konan hastalarda pankreas kanseri riski neredeyse 7 kat daha fazladır. Pankreas kanserili bu hastalarda diyabet tanısından 1 ay önce kan şekeri ve HbA1c seviyeleri önemli ölçüde yükselmiştir. Bu nedenle, HbA1c'nin pankreas kanserini tahmin etmek için potansiyel bir biyobelirteç olması beklenmektedir [42].

2.1.2.2. Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Sigara: Pankreas kanseri ile ilişkili faktörler arasında sigara, değiştirilebilir en önemli faktördür. Bir vaka-kontrol çalışması, sigara içenlerin pankreas kanseri riskinin %74 arttığını göstermiştir. Sigara dumanı özleri/ Cigarette smoke extracts (CSE) ve Nikotin ve Nikotin türevli karsinojenlere (NNN/NNK'ye) maruz kalan PDAC hücrelerinde kök hücre belirteçlerinin ifadesi önemli ölçüde artar. Araştırmalar, sigara dumanının ve bileşenlerinin pankreas hücrelerinin kök hücre özelliklerini artırabileceğini göstermektedir. Kök hücre özellikleri, kanser hücrelerinin kendini yenilemesini ve diğer hücre tiplerine farklılaşmasını sağlar. Spesifik mekanizma, CHRNA7'nin sinyal iletimine aracılık etmesini ve ERK1/2 yoluyla Fos11 ekspresyonunu aktive etmesini içerebilir, böylece hem Fos11 hem de PAF1'in promotörlerinin aktivasyonunu sağlar [43].

Alkol: 2010 yılında yapılan büyük bir çalışmada, 2 ay ve fazlası alkol tüketiminde riskin arttığı gözlemlenmiştir, fakat şarap veya bira ile bir ilişki gözlenmemiştir.

Günlük 3 ve fazlası yüksek alkol tüketimiyle pankreas kanseri riski artarken, düşük dereceli ve orta derecede alkol alımı arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir [44].

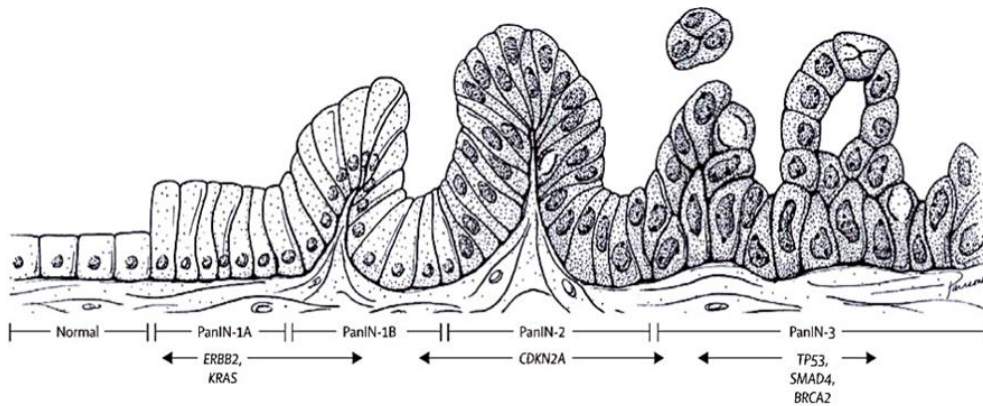
Kronik Pankreatit: Kronik pankreatitin pankreas kanseri için bağımsız bir risk faktörü olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Kronik pankreatit, pankreas fibrozisine ve adacık hücrelerinin kaybına neden olan pankreasın ilerleyici bir inflamatuvar durumudur [45]. Sık kronik pankreatit nöbetleri, pankreatik ekzokrin ve endokrin yetmezliğin yanı sıra hastalığın ilerlemesine ve sonunda anormal pankreas enzim salınımına yol açabilir. Kronik pankreatit ayrıca pankreas hücrelerinin endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozomal otofaji sistemlerini bozabilir. Hücrel DNA hasarına, kromozomal mutasyonlara ve onkogen aktivasyonuna yol açabilir.

Obezite: Hızla çoğalan kanser hücreleri için lipid oksidasyonu ve biyosentez, hücrenin hayatta kalması için gereklidir. Tümör olmayan doku ile karşılaştırıldığında, yağ artışı kanser hücrelerini daha canlı hale getirebilir. Epidemiyolojik kanıtlar obezitenin pankreas kanseri için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Yes ilişkili protein (Yes Associated Protein, YAP) geni ile obezite arasında bir halka ağı olan KRAS mutasyonu, pankreas kanseri oluşumuna katkıda bulunur. Genetiği değiştirilmiş fare hastalığı modeli tarafından KRAS mutasyonunun pankreas kanserinin ilk olayı olduğu doğrulanmıştır. Bununla birlikte, onkojenik KRAS mutasyonunun, pankreas tümör hücrelerinin aktive edilmiş aşağı akış efektör genine yol açan çevresel, besleyici ve metabolik stresörler (iltihap ve obezite) ile etkileşime girmesi gerekmektedir [44,47].

2.1.3. Moleküler mekanizmaları

Genetik çözümler, pankreas kanserlilerin mutant genlerinde dört önemli onkogen ortaya çıkarmıştır. Bunlar %90 oranıyla en fazla KRAS mutasyonu, TP53 gen mutasyonu, CDKN2A gen mutasyonu ve SMAD4 gen mutasyonudur (%50-80) [48,49]. PDAC en sık görülen pankreas kanseri tipi olduğu patolojik sonuçlara göre doğrulanmıştır. Pankreatik intraepitelyal yol ile gelişen PDAC, genetik ve epigenetik değişikliklere sebep olmaktadır. Pankreasın invaziv adenokarsinomunun çok fazla görülen neoplazmik öncüsü PanIN olarak kabul edilmektedir. Derecelendirmesi düşük olan PanIN 1 yaş artışıyla daha yaygın gözlenir, sıklıkla invaziv kanserli pankreasta derecelendirmesi yüksek olan PanIN 3 gözlenmektedir [50-52]. PDAC'de, KRAS mutasyonun aşağı akış regülasyon yolunda üç ana yol tanımlanmıştır.

İlk yolak PI3k/Pdk1/Akt, ikinci yolak Raf/Mek/Erk ve son olarak üçüncü yolak Ral guanin nükleotid değişim faktörüdür. Genellikle 12. kodondaki nokta mutasyonları nedeniyle %90 oranında gözlemlenen KRAS mutasyonları, KRAS proteininin aktivasyonuna ve nihayetinde aşağı akış yolunun daha fazla aktivasyonuna yol açar [53]. Bu mutasyon, PanIN'lerde bulunduğu için pankreas tümörögenezinde erken mutasyonlardan biri olduğunu düşündürmektedir. Malignite ile güçlü ilişkisi olan PDAC'de en fazla gözlenen üç ana gen mutasyonlarından tümör baskılayıcı genler (SMAD4, CDKN2A, TP53) tanımlanmıştır. Bunlardan CDKN2A'daki mutasyonları, yüksek olmayan seviyeli PanIN'lerin alt kümesinde ilk olarak protein işlev kaybı gözlenir. Derecesi yüksek olan PanIN'lerde ise TP53 ve SMAD-4 gen mutasyon ifadesindeki değişiklikler, geç gözlenen olaylardır [54]. SMAD-4, transforme edici büyüme faktörü- β 'dan (TGF- β) bir sinyal yayan proteinini kodlar. SMAD-2/3 aktivasyon sinyaline yanıt olarak TGF- β , TGF- β reseptör substratlarının fosforilasyonu yoluyla SMAD-4 ile birleşir ve gen hızını kontrol etmek için DNA ile etkileşerek sınırlandırılmış olur. PDAC'lerde, SMAD-4 gen mutasyonunun etkisizleştirilmesi ya da kaybedilmesine yol açar. Böylelikle SMAD-4 gen mutasyonundan bağımsız TGF- β sinyali, hücre döngüsü indüksiyonuna, apoptozun azalmasına, EMT, anjiyogenez, immün baskılama ve kanser hücresi indüksiyonuna yol açar. PDAC tümörlemesinde yer alan P13K/Akt, Ras/Erk, NF-kB ve p38-MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayan olay TGF- β 'nın çok fazla eksprese olmasıdır [55].



Şekil 2.3: PanIN'in genetik değişikliklerini gösteren ilerleme modeli [56].

2.1.4. Moleküler patolojisi

2.1.4.1. Pankreas kanserinde onkogenler

KRAS-2, pankreas kanserli hastalarda tanımlanan oransal olarak en fazla gözlenen (>%95) gen mutasyonlarıdır. Somatik olan KRAS-2 gen mutasyonu 12. kodonu etkiler ve nadiren 13. ve 61. kodonları etkileyen gen mutasyonlarıdır [57-59]. 12. kromozomun p kolunda yer alan KRAS2 geni, RAS aile üyelerinden bir proteini kodlar, bu protein guanozin trifosfat (GTP) ile ilişkilidir. Ayrıca fonksiyonel olarak hücre proliferasyonu, sağkalımı, hücrelerdeki hareketliliği ve hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde görev alır. Hücre membranının iç bölümünde yer alan RAS proteini, doğal olarak fizyolojik koşullar altında guanozin difosfat (GDP) ile bağlantılı olarak inaktiftir. Hücre dışı veya hücre içi uyaran sonucunda, GDP/GTP'nin aracı moleküller ile değişimi, aktif GTP-RAS bileşiklerini oluşturur ve bu kombinasyon, sinyal zincirinin aktivasyonunu başlatır. RAS/RAF/MAPK sinyal yolunda aktif olan RAS, RAF kinaz aktivitesini başlatır ve bu da mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK) aktive eder. Aktivasyon sonrası hücrelerde büyüme, proliferasyon, farklı hücre çeşidine dönüşme, göç, doku onarımı ve anjiyogenez gibi önem arzeden hücresel yollarda aktifleşir. Aktif KRAS geninin mutasyonu, KRAS proteininin GTPaz aktivitesini yukarı regüle ederek kalıcı fonksiyonel durumuna, GTP bağlanmasına ve ardından aşağı akış yönlü efektör sinyal yollarının PI3K-Akt sinyal yolu ve RAF-MAPK sinyal yollarının kontrolsüz aktivasyonuna sebep olur. Bu sebepten dolayı kritik kanserojen süreçlerinde olması gereken transkripsiyon faktörleri uyarılır [60-63]. Pankreas kanserinde genel onkogenik KRAS mutasyonları ortaya çıksa da, bazı hastalarda yabani KRAS tipi vardır. RAF-MAPK yolundaki KRAS gen mutasyonu ile ilişkili B-RAF proteinini kodlayan etkili mutasyonların (~%5) ya da diğer değişiklikler, hastalarda RAF-MAPK yolunun alternatif aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Pankreas kanserinde RAS'ın, apoptozu doğrudan inhibe ederek veya apoptozu inhibe eden genlerin ekspresyonunu artıran transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Sağkalımı sağlayan P13K-AKT sinyal yolağına katkısına ek olarak, bu yolu aktif tutan AKT1'in onkogenindeki mutasyondur. Bu sinyal yollarına ek olarak, hücre sağkalımını, yayılımı, kemoterapi direncini son olarakta anjiyogenezi destekleyen genleri düzenler. Tüm pankreas kanserli doku ve hücrelerde Transkripsiyon faktörü NF-kB'nin (Nükleer Faktör-kappa B) aracılık ettiği sinyal dizileri fonksiyonel olarak aktiftir.

Pankreas organının oluşumu ve gelişiminde önemli fonksiyona sahip olduğu bilinen Hedhehog ve Notch sinyal kaskadındaki efektörlerin pankreas kanserinin başlamasında rol oynadığı ileri sürülmüştür.

2.1.4.2. Tümör baskılayıcı genler

Pankreas kanseri gelişiminde, hücrelerin genomik instabilitede hayatta kalmalarını sağlayan bir diğer önemli olay, birkaç tümör baskılayıcı genin somatik mutasyonlar tarafından inaktivasyonudur. 9. kromozomun q kolunda bulunan CDKN2A geni, tümör baskılayıcı proteinler P16INK4A ve P14ARF'yi kodlar. P16INK4A proteini, retinablastoma protein fosforilasyonunu engellerken, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasında durmasına neden olur; p14ARF proteini, MDM2'yi nötralize eder. Böylece tümör baskılayıcı protein p53'ün her yerde bulunmasını ve bozulmasını önleyerek p53'ü stabilize eder. CDKN2A geni, promotör hipermetilasyonu ve homozigot delesyon gibi farklı mekanizmaların bir sonucu olarak pankreas kanseri vakalarının %95'inde fonksiyon kaybı gösteren en yaygın tümör baskılayıcı gendir. TP53 geni hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasının düzenlenmesi, G2/M geçiş bölgesinin sürdürülmesi ve apoptozun indüklenmesi ve DNA onarımı gibi birçok işleve sahip p53 tümör baskılayıcı proteini kodlar. TP53, pankreas kanseri vakalarının %75'inde fonksiyon kaybı göstermektedir. Pankreas kanserinde, bir diğer inaktive olan tümör baskılayıcı gen ise 18. kromozomun q kolunda yer alan SMAD4'tür. Pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %55'inde çoğunlukla homozigot delesyonlar nedeniyle fonksiyon kaybı gösterir. SMAD4 fonksiyonunun kaybı, SMAD4'e bağlı antiproliferatif ve proapoptotik TGF- β yolunu ortadan kaldırarak düzensiz hücre proliferasyonuna yol açar. Somatik gen mutasyonlarına ek olarak, pankreas kanserinde normal pankreas dokusu ile karşılaştırıldığında çok yüksek seviyelerde birçok büyüme faktörü ve bunların reseptörleri de eksprese edilir ve büyümeye, invazyona ve anjiyogeneze katkıda bulunur. Endotelial hücre proliferasyonunu, hayatta kalmayı ve dolayısıyla anjiyogenezi destekleyen VEGF'nin (vasküler endotelial büyüme faktörü) pankreas kanseri hücrelerinde ve dokularında aşırı eksprese edildiği de bilinmektedir. Promotör bölgede anormal CpG hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerin aktivite kaybı ve hipometilasyon yoluyla onkojenik genlerin aktivitesi gibi epigenetik değişiklikler de pankreas kanserinde yaygındır [64-65].

2.1.5. Tanı ve tedavi yöntemleri

Pankreas kanseri teşhisi: Teşhisi en zor kanser türlerinden biridir. Hastalığın non-spesifik semptomlar ve diğer birçok faktör nedeniyle, özellikle hastalığın ileri evrelerinde tanı ve tedavide güçlükler ortaya çıkmaktadır. Ameliyat öncesi tanı ve tedavi için çeşitli tümör belirteçleri ve görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır [66]. Tarama için gelişmiş olan manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve manyetik rezonans kolanjiyopankreatografi (MRCP)'nin endoskopik ultrasonografi (EUS) bulguları ile en iyi tanıyı sağladığı gösterilmiştir. BT ve MR + MRCP tercih edilir. ERCP tanının temeli olarak kabul edilse de invaziv olmaması nedeniyle günümüzde MRCP tercih edilmektedir [67]. Ancak endoskopik ultrasonografinin 2 cm'den küçük pankreas lezyonlarını saptamada bilgisayarlı tomografi (BT) ve MRG'ye göre duyarlılığı daha yüksektir. Endoskopik ultrason ayrıca pankreatik lezyonları daha iyi karakterize etmeye yardımcı olmak için ince iğne aspirasyonu ile birleştirilebilir [68]. Diğer bir önemli tanı yöntemi, çoğunlukla metastatik lezyonların varlığını saptamak için kullanılan pozitron emisyon tomografisidir (PET). Hastaya az miktarda radyonüklid glukoz enjekte edilir ve glikozun biriktiği bölge belirlenir. Kanser hücreleri daha fazla glikoz olduğu için, daha koyu ve daha belirgin görünmektedir. Önemli bir tanısal biyobelirteç olan serum kanseri antijeni 19-9 (CA 199), pankreas kanserinin rutin tedavisinde kullanılması için ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onay alınmıştır [69]. Aşırı eksprese edilmiş genlerin protein ürünleri, serum antijenle ilişkili adezyon molekülü 1 (CEACAM1), serum makrofaj inhibitörü sitokin 1 (MIC-1), apolipoprotein A1 gibi genomik ve epigenetik moleküler belirteçler sıklıkla kullanılır [70].

Pankreas kanserinin tedavisi: Cerrahi için 3 farklı yöntem vardır; serbest cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiden oluşmaktadır. Whipple prosedürü, pankreas kanseri için en iyi bilinen cerrahi tedavi yöntemidir. Son zamanlarda kullanılan yöntemle 5 yıllık sağkalım oranının yüzde 20'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir. Cerrahi operasyonun amacı, R1 rezeksiyona kıyasla çok daha iyi sağ kalım ile ilişkili olduğu için R0 rezeksiyon (eksizyon) elde etmektir [71,72]. Pankreas kanseri tedavisinde en sık kullanılan radyoterapi, radyasyon tedavisinin daha etkili olması nedeniyle genellikle kemoterapi ile birlikte verilir ve adjuvan (ameliyat sonrası) ve neo-adjuvan (ameliyat öncesi) tedavi olarak sınıflandırılır. Kemoterapi, pankreas kanseri hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini durdurmak için kullanılır.

Yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları gemsitabin, oksaliptatin, 5-florourasil, kapesitabin, irinotekan ve sisplatin'dir. Bu ilaçlar, reaktif bölgelerinin hücrenin DNA veya RNA'sındaki nükleotitlerle etkileşime girmesine izin veren bir çapraz bağlama mekanizmasına dayanır. Bu hücre döngüsünün bozulmasına ve kanser hücrelerinde apoptoza neden olur [73]. Pankreas kanseri teşhis ve tedavisinin zorluğu hedefe yönelik tedavinin ritmini belirlemede önemlidir. Kanser sağkalımını destekleyen spesifik genlere yönelik proteinleri ve mikroçevreleri hedef alan tedavi stratejileri hedeflenmelidir.

2.2. Pankreas Kanser Hücresi Hattı (PANC-1)

Elli altı yaşında bir erkek bireyden elde edilen pankreas kanseri hücre tipi PANC-1 (ATCC® CRL1469™), hücreleri yapışık özellikte epitel hücreleridir. Bu hücrelerin kromozom sayısı hipertriploididir. Karyotip'i 63'tür. Marker kromozomu 3 farklı kromozomdur. Ayrıca ufak bir dairesel kromozomu vardır. CDKN2A/p16 homozigot delesyonu, KRAS (12Asp) mutasyonu, TP53 (273.His) mutasyonu ve Doğal tip SMAD/DPC4 genine sahiptir. Pankreas kanseri hücre hattı (PANC-1) agresif ve oldukça fazla yayılım gösterme özelliğine sahip olan hücre hattıdır [74].

2.3. İnsan Embriyonik Hücre Hattı (HEK293)

Morfolojisi epitel olan HEK293 hücre hattı üretimi 1973 yılında yapılmıştır. Normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle bu üretim sağlanmıştır. İnsan embriyonik böbrek 293 (HEK293) hücreleri, normal insan hücreleri için yaygın olarak kullanılan standartlardan biridir [75]. Işık mikroskopundaki hücrelerin morfolojik yapısı birbirlerine ağa benzer bağlantılar ile bağlanmış yassı yapışık özellikte hücrelerdir.

2.4. *Arum dioscoridis* (Araceae)

Araceae, deniz seviyesinden 3000 m yüksekliğe kadar geniş bir ekolojik habitat aralığında yayılan, Yüzonsekiz cins içinde 3800 türe sahip büyük bir bitki familyasıdır [76]. *Arum dioscoridis*, *Araceae* familyasına ait olup yirmialtı türe sahiptir. Akdeniz, Kuzey Afrika ve Orta Asya'da yarı kurak, nadas alanlarında ve kıyı bölgelerinde bulunur [77]. Türkiye'de Ege, Akdeniz, Marmara, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ekim olmayan arazilerde, tarlalarda, yol kenarlarında ve bahçelerde doğal bir şekilde yetişir [78]. Arkeolojik kanıtlar *Arum*'un eski çağlardan beri insanlar tarafından kullanıldığını göstermektedir [79].

Bu türler genellikle 30-50 cm yüksekliğinde, çok yıllık, yumrulu ve otsu bitkilerdir. Yaprakları ok şeklinde, uzun saplı ve koyu yeşil renklidir. Çiçekler özel bir çiçeklenme oluşturur. Bu durumda dişi çiçekler altta, erkek çiçekler üstte yer alır [80]. Yörede "yılanpancarı", "karaabar", "kangal" ve "tırşik" adlarıyla da bilinir [81]. *Arum* cinsine ait bitkiler, toksisitelerine rağmen yüzyıllardır beslenme ve tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bu cinsin birkaç alt türü, özellikle potansiyel terapötik hedefler ve ilaç keşfi için modern araştırmalar tarafından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bazılarının bilinen ve iyi belgelenmiş geleneksel tıbbi ve diğer kullanımları olmasına rağmen, diğer türler mevcut araştırmalar tarafından hiçbir zaman incelenmemiştir. Şimdiye kadar en çok araştırılan *Arum diocoridis*, *Arum maculatum* ve *Arum palaestinum* olmak üzere birçok *Arum* alt türü çalışılmıştır [82]. *Arum L.* Türleri, kanser, mide asitliği, ateroskleroz ve diyabetes mellitus gibi çeşitli metabolik/kronik hastalıkları engellemek için halk arasında yaygın olarak kullanılmaktadır [83,84]. Ayrıca bu bitkiler geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmış ve günlük besin maddesi olarak tüketilmiştir. *Arum L.*'nin bir üyesi olan *A. dioscoridis*, geleneksel olarak Akdeniz gastronomisinde kullanılmaktadır [85]. Benekli *Arum*, tam buğday unu, yumurta, yapraklı sebzeler ve kaynayan yoğurtta pişirilen baharatlardan oluşan geleneksel bir Ürdün yemeğinin (Cha'acheel) hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır [86]. Doğu Akdeniz bölgesinde tırşik bitkisinin yaprakları da yenir. Taze yaprakları ve yumrusu sakız, müsilaj, nişasta, saponin ve konasin içerir. Bu bitkinin yaprakları acı bir tada sahiptir ve bu acı tadı gidermek için yapraklar kaynatılır, süzülür ve daha sonra pişirmeye hazırlanır. Bazı yörelerde zehirli olduğu için tüketilmemektedir [87]. Bitki ayrıca Karaman yöresinde "El Gabardan Çorbası" adı verilen yöresel bir yemek yapımında da kullanılmaktadır.

Tablo 2.1: *Arum dioscoridis* sınıflandırması

Regnum	<i>Plantae</i> / Bitkiler Alemi
Divisio	<i>Magnoliophyta</i> / Tohumlu bitkiler
Subclassis	<i>Magnoliidae</i> / Manolya altsınıfı
Familia	<i>Araceae</i> / Yıllanyastığıgiller
Genus	<i>Arum</i> / Yıllanyastığı
Species	<i>Arum dioscoridis</i> var. <i>dioscoridis</i> Sm./ Tırşikpancarı

2.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, yüksek farmasötik aktiviteye sahip önde gelen bitki sekonder metabolitlerinden biridir. Aromatik halkaya bağlı çoklu hidroksil gruplarına sahiptirler [88]. Fenolik bileşikler kimyasal yapılarına göre basit fenoller, flavonoidler, kumarinler, fenolik asitler (benzoik ve sinamik asit türevleri), stilbenler, hidrolize olabilen ya da kondanse tanenler, ligandlar ve ligninler olarak gruplara ayrılabilir [89]. Doğal bitkilerden elde edilen 8000 fenolik bileşik bulunmaktadır [90,91]. Çözücüler, yüksek verimde antioksidan bileşikler elde etmede önemli bir role sahiptir. Fenolik bileşikler, molekülün hidrojen bağlarını oluşturarak suya bağlanma yeteneğine sahiptir ve alkolde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Tüm fenolik maddeler veya bir fenolik sınıfı için özel bir çözücü sistemi bulunmamaktadır. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyon işlemi için kullanılan çözücüler etanol, metanol, su, aseton, etil asetatdır [92]. Fenolik bileşikler, bitki sekonder metabolitleri olarak morfolojik gelişim, fizyoloji ve tozlaşmaya geniş katılımları nedeniyle önemli metabolik içeriklerden biri olarak bulunmuştur. Fenoliklerin dikkate değer biyolojik terapötik özellikleri, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı ve kardiyovasküler hastalık gibi birçok rahatsızlığa karşı sağlığı koruyucu etkilere katkıda bulunur [93-96].

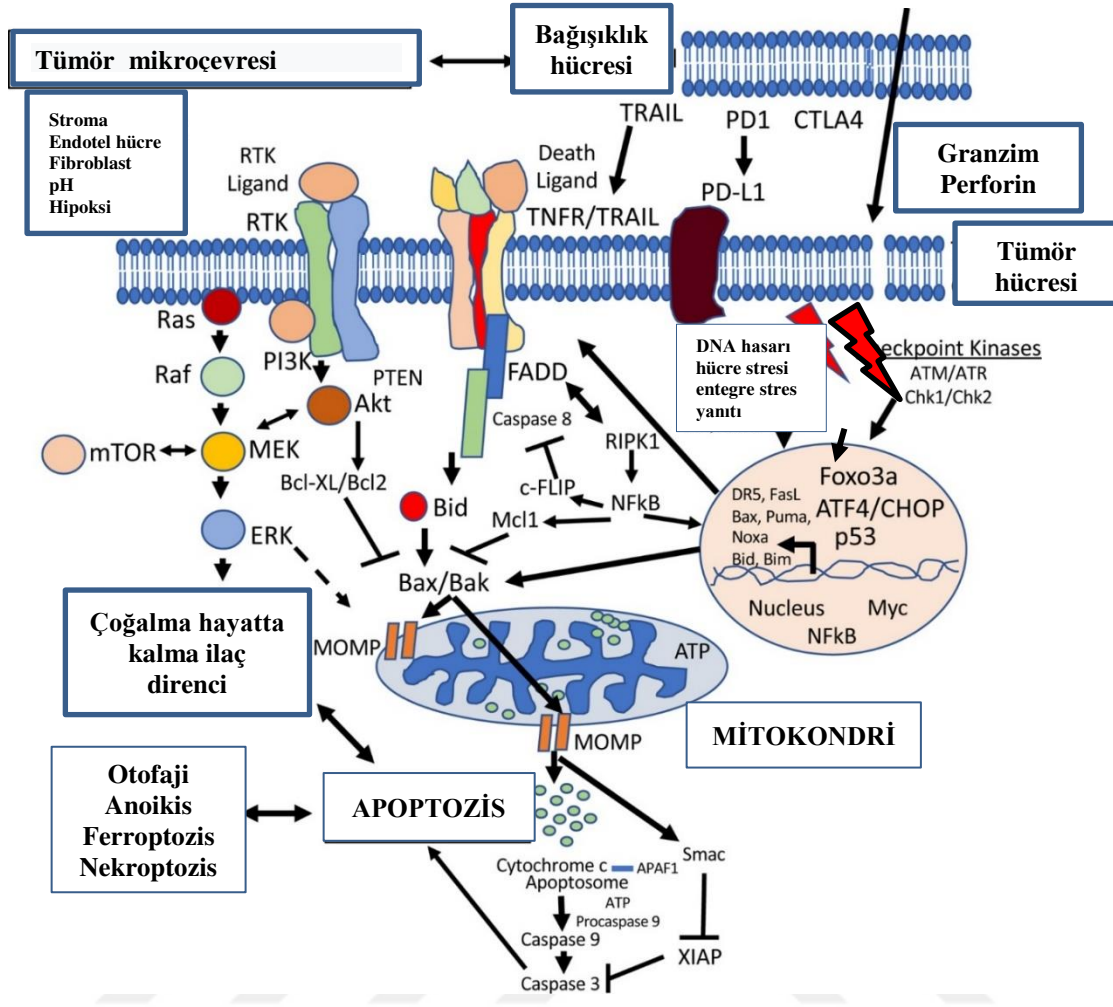
2.6. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz ile kanser hücrelerinin etkili bir şekilde ortadan kaldırılması, 30 yılı aşkın bir süredir klinik kanser tedavisinin temel dayanağı ve hedefi olmuştur. Etkili proapoptotik ajanların klinik çevirisi, ilaç keşfi, biyoyararlanım ve stabilite, tümör penetrasyonu, akut veya kronik normal doku toksisitesi, ilaç etkileşimleri, hedef dışı etkiler, tümör heterojenliği, dirençli klonların ortaya çıkmasıyla gelişmekte ve değişmektedir. Apoptozun, göstermiş olduğu çeşitli biyokimyasal özellikleri ve yapısal özelliklerinden dolayı 3 başlık altında (Nekroptoz, Otofaji ve Apoptoz) tanımlanmaktadır. Sistein proteaz olan kaspazlar, apoptozun gerçekleşme mekanizmasında önemli rol almaktadır. Söz konusu enzimler ilk olarak pro-formlar halinde sentezlenerek aspartat residülerinde bulunan peptid bağlarındaki bağlantısını kaybeder. Bu proteolitik kesimle enzimler birbirini aktifleştirir. Kaspazların birbirini ayırma ve aktifleştirme özelliğinden dolayı, proteaz kaskadı yoluyla bir amplifikasyon mekanizması meydana gelir. Böylelikle programlanmış hücre ölümünün uygun biçimde yürütülmesi sağlanmış olur.

Ayrıca kaspazlar, fazla sayıda substratları (nükleer laminler, DNaz inhibitörleri veya hücre iskelet proteinleri gibi) proteolitik kesime uğratarak yapısal değişikliğe sebep olur. Kaspazlar, Efektör (3,6,7), inflamatuvar (1,4,5,11,12,13,14) ve başlatıcı kaspazlar (2,8,9,10) olarak 3 farklı grupta toplanmaktadır. Kaspazların aktiflemesiyle DNA tamiri ve replikasyonda gerekli enzimler inaktive olur. DNA'da geri dönüşümsüz bir parçalanma meydana gelir. Kaspaz aracılı apoptoz için 2 farklı yolun aktive olduğu bilinmektedir. İlki hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla hücre ölümünden sorumlu dışsal (Ektrinsik) yol, ikincisi mitokondri aracılı apoptoz olan içsel (intrinsik) yoldur. BCL-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerine karşı proapoptotik protein ailelerini kontrol etme dengesi, mitokondriden sitokrom c salınımını düzenler [97,98]. Sitokrom c salınımıyla kaspaz aktivasyonu ile apoptozom oluşur [99,100]. Bu proteinlerin apoptoz ailesinin inhibitörleri (IAP) tarafından negatif olarak düzenler [101]. İçsel mitokondriyal apoptoz, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini (MOMP), sitokrom c salınımını, kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu teşvik eden mitokondriyal dış zarda bulunan proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini (örn. BAX veya BAK) içerir. Sitokrom c, APAF1'i bağlar ve ATP'ye bağlı bir işlemde multimerik apoptozom oluşur. Pro-kaspaz 9, apoptozoma bağlanır, bölünür ve aktive olur ve ardından kaspaz 3'ü aktive eder [102]. XIAP dahil olmak üzere IAP ailesinin üyeleri, kaspaz aktivasyonunu negatif olarak düzenler ve SMAC tarafından inaktive edilebilirler. BCL-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri (örn. BCL-2, BCL-XL, MCL1, Bcl-w, A1), proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerini inhibe eder. BIM, BAD, BID, PUMA ve NOXA gibi sadece BH3 proteinleri MCL1'i inhibe edebilir. İçsel apoptoz yolunda, mitokondriyal geçirgenliğin kaspaz aktivitesinden bağımsız olarak hücre ölümüne bağlılık noktasını temsil etmektedir (**Şekil 2.4.**).

Ektrinsik apoptoz yolu, hücre zarında FADD ve kaspaz 8 proteinleri ile ilgili ligand tarafından bağlanan trimerik bir TNF ailesi reseptörüdür (Fas-R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, TNF-R2). DISC ölümüne neden olan sinyal kompleksini oluşturmak için görevlidir. DISC'de kaspaz 8 veya 10 aktivasyonu, apoptoza yol açan sitokrom c seviyesinde ölüm sinyalini güçlendiren Tip II hücrelerde mitokondri ile çapraz bağlanma sağlayan Bid bölünmesiyle sonuçlanır. c-FLIP kaspaz 8'e bağlanır ve aktivasyonunu engeller. Prototipik büyüme faktörü ile aktive edilmiş reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), hücre zarında, PI3K ve Akt aktivasyonunu içeren aşağı akış olayları ile dimerik proteinler (EGFR, Her2, ERBB3 gibi ERBB ailesinin üyeleri) olarak gösterilir. RAS-MAPK yolu da şematize edilmiştir.

Bu hayatta kalma yanlısı yollar ayrıca hücre proliferasyonunu teşvik eder ve kısmen BCL-2 aile üyelerinin fosforilasyonu yoluyla içsel hücre ölüm yolu üzerinde olumsuz etki yapar. TNF ve TRAIL reseptörleri, çekirdekteki anti-apoptotik genleri transkripsiyonel olarak aktive eden ve böylece hücre ölümünü azaltan ve hücre hayatta kalmasını destekleyen NF-kappa B (NFkB)'yi aktive eder. Bağışıklık mekanizmaları, Interferon etkisine tepki olarak Natural Killer (NK) hücreleri tarafından üretilen TRAIL yoluyla ya da PD-L1 gibi hücre ölümü ligandlarının blokajı yoluyla hücre ölümünü aktive eder. Sitotoksik T-hücreleri veya NK hücreleri bağışıklık hücreleri de kanser hücreleri gibi hedef hücrelerde apoptozu indükleyen bir serin proteaz olan granzim üretir. Perforin adı verilen bir protein, granzim kaynaklı hücre ölümüne aracılık etmek için hedef hücrelerde porlar oluşturur. Tümör mikro ortamının stroma, fibroblastlar ve fiziksel faktörler dahil olmak üzere diğer çeşitli bileşenleri, hücre ölümü ve hücre hayatta kalma yollarını, ilaç tepkilerini değiştirecek şekillerde etkileyebilir. Endotel hücrelerini hedef alan ilaçlar, tümör hücrelerini besin maddelerinden yetersiz bırakarak hücre ölümüne yol açabilir. DNA hasarı tepkisi (ATM/ATR, Chk1/Chk2 gibi kontrol noktası kinazlarını içerenler) ve hücre stres yanıtı yolları (ATF4 ve CHOP aktivasyonuna yol açan entegre yanıtı), p53'e ek olarak hücre ölümünü indükleyen proapoptotik genleri nihai olarak aktive eder. p53 aktivasyonunu takiben kopyalanan genler arasında Bax, Puma, Noxa, DR5 ve FasL önemlidir. Ancak birçok kinaz inhibitörünün sonuçta Bim'in transkripsiyonel aktivasyonunu işaret ettiği de belirtilmelidir. Ek hücresel işlemler (otofaji, anoikis, ferroptoz, nekroz) apoptoz sinyal yollarıyla çapraz iletişim kurabilir ve proapoptotik ajanlarla kombinasyonlarda kullanılanlar dahil olmak üzere kanser terapötiklerinden etkilenir.



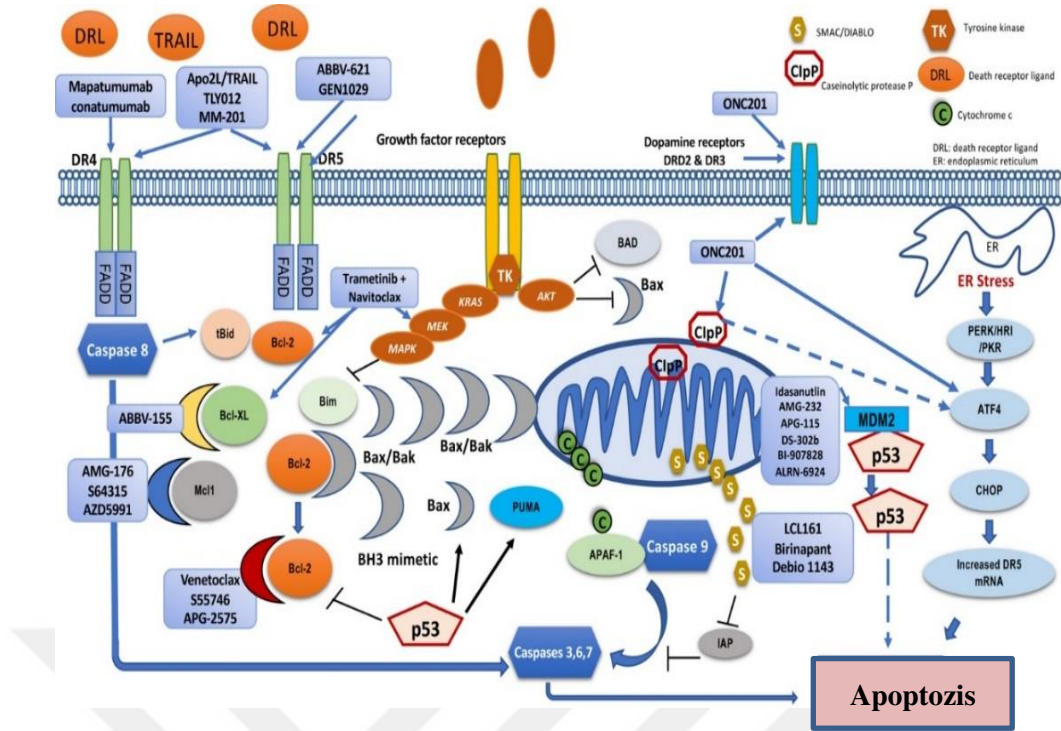
Şekil 2.4: Apoptoz sinyal yollarına ve bunları etkileyen hayatta kalma yanıtı, bağışıklık veya tümör mikro-ortam etkilerine genel bakış [102].

Ekstrinsik yolun aktivasyonu, proapoptotik ölüm reseptörlerini (DR'ler), TNF reseptör süper ailesinin (TNFR) transmembran protein üyelerini aktive eden hücre dışı sinyaller tarafından tetiklenir [103,104]. DR'ler TNFR1, Fas (CD95, APO-1), DR3, DR4 (TRAILR1), DR5 (TRAILR2) ve DR6 olarak tanımlanmıştır. İlgili ligandlarının bağlanması üzerine Fas, TNFR1-2, DR4-5, kaspaz-8 ve -10'u aktive eden ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC'yi) birleştirmek için Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinleri aşağı akış apoptoz kaskadında görev alır. Hücresel FLICE-inhibitör protein (c-FLIP) de DISC'ye alınabilir. Bazı hücresel ortamlarda kaspaz-8 ve -10 ile rekabet eder ve başlatıcı kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu inhibe eder (Şekil 2.5). DR4 ve DR5, mapatumumab, conatumumab, Apo2L/TRAIL, ABBV-621 ve GEN1029 gibi agonist antikörler, rekombinant TRAIL'in IgG1 (MM-201) ile füzyon proteini veya pegile rekombinant TRAIL (TLY012) tarafından aktive edilebilir.

BH3 mimetikleri, anti-apoptoz BCL-2 ailesi üyelerine (BCL-2, BCL-XL, MCL1) bağlanır. Dış mitokondriyal zar da gözenekler oluşturan BAX ve BAK'ın aktivasyonuna yol açarak sitokrom C'nin salınmasına yol açar. BCL-'nin seçici inhibitörleri 2 (venoclax, S55746, APG-2575), BCL-XL (ABBV-155) ve MCL1 (AMG-176, S64315), AZD5991) klinik deneylerde çalışılmaktadır. Büyüme sinyal yollarının modülasyonu ayrıca apoptozu indükler ve MEK inhibitörlerinin navitoclax (BCL-2/BCL-XL inhibitörü) ile kombinasyonları klinik deneylerde araştırılmaktadır. AKT ve MEK gibi hayatta kalma yanlısı yollar, BAD (BCL-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti) ve BIM (BCL-2 ile etkileşimli hücre ölümü aracısı) gibi proapoptotik proteinlerin fosforilasyonu ile apoptozu inhibe eder. Apoptozu indüklemek için p53 yolunu hedefleyen stratejiler, MDM2 inhibitörlerini (yani, idasanutlin, AMG-232, APG-115, DS-302b, BI-907828, ALRN-6924) içerir. Üç halkalı imipridon yapısına sahip olan ONC201'in dopamin reseptörleri DRD2 ve DRD3'e bağlandığı bulunmuştur. Mitokondriyal kazeinolitik proteaz P'nin (ClpP) yanı sıra entegre stres yanıt proteini ATF4 [105,106]'nin aktivasyonuna yol açar. ONC201 tarafından ATF4 aktivasyonu, CHOP'a bağlı DR5 yukarı regülasyonuna ve hücre ölümüne yol açar [107,108]. ClpP ve ONC201 tarafından devreye alınan diğer yollar arasındaki ilişki, bağlanma ATF4 aktivasyonunun yukarı akışı gibi görünse de (Lanlan Zhou ve WSE-D, yayınlanmamış) çalışma aşamasındadır. SMAC (ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü), sitokrom c ile birlikte mitokondriden salınır.

Sitokrom c, kaspaz 9 ve APAF-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ile apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptosis proteinlerinin (IAP) inhibitörleri kaspaz aktivasyonunu engeller ve bu da mitokondriden salınan SMAC veya Omi/HtrA2 tarafından bloke edilir. SMAC mimetikleri ve IAP inhibitörleri (örn. LCL161, birinapant, Debio 1143) klinik deneylere geçmiştir.

tBid: kesilmiş BH-3 etkileşimli alan ölüm agonisti; BCL-XL: B hücreli lenfoma ekstra büyük; MCL1: miyeloid hücreli lösemi 1; BAX: BCL-2 ile ilişkili X proteini; BAK: BCL-2 antagonisti/öldürücü; MDM2: fare çift dakika 2 proteini; DRL: ölüm reseptörü ligandı; ER: endoplazmik retikulum. PERK: PKR benzeri ER kinaz; ATF4: Transkripsiyon faktörü 4'ü aktive etmek; CHOP: CCAAT arttırıcı bağlayıcı protein homolog protein.



Şekil 2.5: Apoptozdaki yolları hedef alan kanser terapötik yaklaşımlar [109].

2.7. İnflamasyon

Enflamasyon genellikle kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. Kanserle ilişkili enflamasyondan sorumlu hücreler genetik olarak stabildir. Bu nedenle hızlı bir şekilde ilaç direncinin ortaya çıkmasına maruz kalmazlar. Enflamasyonun hedeflenmesi, hem kanserin önlenmesi hem de kanser tedavisi için önemli bir stratejiyi temsil eder. Tümör dışı inflamasyona, tümü kanser riskini artıran ve kötü huylu ilerlemeyi teşvik eden bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, obezite, tütün içimi, asbeste maruz kalma ve aşırı alkol tüketimi gibi birçok faktör neden olur. Kansere özgü veya kansere bağlı enflamasyon, kanseri başlatan mutasyonlar tarafından tetiklenebilir. Enflamatuvar hücrelerin toplanması ve aktivasyonu yoluyla malign ilerlemeye katkıda bulunabilir. Dışsal ve içsel enflamasyonlar, bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla sonuçlanabilir. Böylece tümör gelişimi için tercih edilen bir arka plan sağlar. 19. yüzyılda Rudolf Virchow tarafından gözlemlenen tümörlerde lökositlerin varlığı, iltihaplanma ve kanser arasındaki olası bağlantının ilk göstergesini sağlamıştır. Yine de, enflamasyonun tümörjenezde kritik bir rol oynadığına dair net kanıtlar ancak son on yılda elde edilmiştir [110]. Bununla birlikte, iltihaplanma kronik hale geldiğinde veya çok uzun sürdüğünde zararlı olabilir ve hastalığa yol açabilir.

Proinflatuar sitokinlerin, kemokinlerin, adezyon moleküllerinin ve inflamatuvar enzimlerin rolü, kronik enflamasyonla ilişkilendirilmiştir [111]. Kronik enflamasyonun, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, artrit, Alzheimer hastalığı, akciğer hastalıkları ve otoimmün hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara aracılık ettiği bulunmuştur [112]. Kronik inflamasyon, sürekli doku hasarı, hasara bağlı hücresel proliferasyon ve doku onarımı ile karakterizedir. Bu bağlamda hücre proliferasyonu genellikle hücre tipinde geri dönüşümlü bir değişiklik olan "metaplazi" ile ilişkilidir. Atipik hücre üretimine yol açan bir hücresel proliferasyon bozukluğu olan "displazi" bunu takip eder. Genellikle neoplazma bölgesine bitişik bulunduğu için önceki karsinom olayı olarak kabul edilir [113]. Birkaç yaygın tümörün sitokin ağı, inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve kemokinler açısından zengindir, ancak genellikle spesifik ve sürekli bağışıklık tepkilerinde yer alan sitokinlerden yoksundur [114]. IL-6, immün yanıt, inflamasyon ve hematopoezde önemli roller oynayan pleiotropik bir sitokindir. Monositler ve makrofajlar dahil olmak üzere çeşitli normal hücreler tarafından üretilir. Aynı zamanda meme, prostat, kolorektal ve yumurtalık kanseri gibi çoklu tümör dokusu tipleri tarafından da eksprese edilir. IL-6 ayrıca apoptoz, tümör büyüme hücresi proliferasyonu, migrasyon ve invazyon, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümör davranışının çeşitli yönlerinde önemli rol oynayabilir [115].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF.YLT.22.53 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada, kullanılan kimyasallar ve kitler (**Tablo 3.1**)’ te yer almaktadır.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kitler

KİMYASAL ADI	FİRMA
Triton® X-100, 100 ml	ALFA AESAR
IL-6 Polyclonal Antibody 100ul	BIOSS
Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit - Micropolymer IHCP 150 TEST (15 ML)	ABCAM
HYDROGEN PEROXIDE 35% EXTRA PURE 2,5 L	ISOLAB
DAB Substrate Buffer, 15 ML	BİOLEGEND
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck
DMSO	Merck
Troloks	Merck
Gallik asit	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Diagnovum RPMI 1640
RPMI 1640	Diagnovum
FBS (Fetal Bovine Serum)	Diagnovum
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Gibco
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
Trypan Blue Boyası	Sigma-Aldrich
cDNA Sentez Kiti (First Strand cDNA Synthesis Kit)	Thermo Fisher Scientific

SYBR Green qPCR Master Mix	Bio-Rad
Primer	Sentebiolab
BCL-2 Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
BAX Primer Antikor	Cell Signalling Technology
Caspase-3 Primer Antikor	Affinity Biosciences
β -Aktin Primer Antikor	Santa Cruz Biotechnology
Sekonder Antikor (Anti-Mouse IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology Sekonder
Antikor (Mouse Anti-Rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz Biotechnology
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Sigma-Aldrich
Bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Trisma Base	Sigma-Aldrich
Nitroselüloz Membran	Macherey-Nagel
Protein Marker	Thermo Fisher Scientific
Skim Milk Powder (Yağsız süt tozu)	Sigma-Aldrich
Clarity Max Western ECL Substrates	Bio-Rad
Clarity Western ECL Substrates	Bio-Rad
Tween 20	Sigma-Aldrich
Whatman Blotlama Kâğıdı (Extra Thick Blot Paper)	Bio-Rad
Metanol	Sigma-Aldrich
Glisin	Sigma-Aldrich
Etanol	ISOLAB
N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich

İzopropil Alkol (2-propanol)	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Coomassie-Brillant Blue G-250	Fluka
Fosforik Asit (H₃PO₄)	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin (BSA)	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit (H₂O₂)	Sigma-Aldrich
Amoyum Persülfat (APS)	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmada, kullanılan malzeme ve cihazlar (**Tablo 3.2**)’ te yer almaktadır.

Tablo 3.2: Tezde kullanılan malzeme ve cihazlar

MALZEME VE CİHAZ	FİRMA
Blotlama (Semidry Blotter) Cihazı	Bio-Rad
Görüntüleme Cihazı	Azure
Buzdolabı (+4°C)	Uğur
Çeker Ocak	Tolkim
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280, Siemens
Derin Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Premium U410
Distile Su (dH₂O) Üretme Cihazı	mp MINI Pure
Etüv	Memmert
Mikroplaka Spektrofotometresi	Epoch
15 mL ve 50 mL’lik Santrifüj Tüpleri	Labsolute/ Isolab
Hassas Terazî	Denver Instrument
Isıtıcı Bloğu	Lab Line

Karbondioksitli Etüv (İnkübatör)	Nuaire Nu-4750
Kar Üretme Cihazı	Scotsman
Magnetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A
Mikropipet Takımı	Nichipet
Güç Kaynağı	Thermo EC 135-90
Santrifüj	Aosheng 40
Nanodrop	Thermo Scientific Multiscan GO
Otoklav	HMC Hirayama
PCR	Bio-Rad C100 Thermal Cycler
pH Metre	Mettler Toledo
Pipet Uçları	Isolab
Real-Time PCR	BioRad
Serolojik Pipetler	Labsolute
Sıvı Azot Tankı	Taylor- Wharton LS750 Lab System
Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabin)	Nuaire 425-500E Esco Marka Class 2
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Sıcak Su Banyosu	Memmert
Ters (Inverted) Işık Mikroskobu	Zeiss Primovert
Vorteks	Wisd WiseMix VM-10/ Heidolph
T-25 Flask (Filtreli, steril)	Labsolute
T-75 Flasklar (Filtreli, steril)	Labsolute/ Corning
Vial (Cryogenic Tubes)	Isolab/ Corning
Strip Tüpler	Qiagen
6 Kuyucuklu Plaka	Labsolute
96 Kuyucuklu Plaka	Labsolute/ Greiner bio-one
1,5-2 mL'lik Tüp ve Rak	Eppendorf
Cell Scraper (Hücre Kazıyıcı)	Labsolute
UV-VIS Spektrofotometre	Beckman Coulter

3.3. Çözeltiler ve Hazırlanma Şekli

Çalışmada, kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı (**Tablo 3.3**)' te yer almaktadır.

Tablo 3.3: Kullanılan çözeltilerin hazırlanma şekli

ÇÖZELTİ ADI	İÇERİK
Lizis Buffer (%1 2- Merkaptotanol)	RNA izolasyonunda kullanılmak üzere 1 mL Lizis buffer üzerine 10 µL 2-Merkaptotanol eklenerek hazırlandı.
1X Lizis Tampon (1 mM PMSF içeren RIPA buffer)	Protein izolasyonunda kullanılmak üzere 1/10 oranında ddH ₂ O ile seyreltilen RIPA buffer üzerine 1 mM PMSF eklenerek hazırlandı.
Bradford (Commassie Brilliant Blue) Çözeltisi	100 mg Coomassie-Brilliant Blue G-250, 50 ml %95 etanol içinde eritildi ve 1 L'ye son hacme 110 ml %85 fosforik asit çözeltisi ilave edildi. Alüminyum folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında saklandı.
%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid	37,5 g akrilamid, 1 g bisakrilamid ve 128 mL dH ₂ O alınarak 37°C'de eritilir..
%10'luk SDS	1 g SDS tartıldı ve 9 mL distile suda çözüldü.
%10'luk APS	2 ml başına 0,2 g APS tartıldı ve 1,8 ml distile su içinde çözüldü.
%5'lik Bloklama Çözeltisi	5 g BSA alındı ve 95 mL TBST içerisinde çözdürüldü.
10X TBS Çözeltisi	30 gr Tris 80 gr NaCl, 2 gr KCl tartıldı ve 900 ml dH ₂ O içinde çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.4 olarak ayarlandı, distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
10X Transfer Çözeltisi	29 gr glisin, 58 gr Tris, 3.7 gr SDS tartıldı. 900 mL distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı, pH = 8.3'e ayarlandı.
1X TBST Çözeltisi	100 mL 10X TBS alınarak 900 mL dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı, ardından 1 mL Tween-20 eklendi.
10X Tris-Glisin Elektrophorez Çözeltisi	188 g glisin, 30.2 g Tris ve 100 mL %10 SDS eklendi, 1 L distile suda eritildi.
1 M Tris/ HCl Tamponu	121,14 g Tris 900 mL saf suda eritildi, 1 M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı ve distile su ile son hacmi 1 L'ye tamamlandı.
1,5 M Tris/HCl Tamponu	181,7 g Tris 900 mL saf suda eritildi, 1 M HCl ile pH: 8,8'e ayarlandı ve distile su ile son hacmi 1 L'ye getirildi.
1X Transfer Çözeltisi	10X transfer solüsyonundan 100 mL ekstrakte alındı, 700 mL distile su ve 200 mL metanol eklendi.
1X Tris-Glisin Elektrophorez Çözeltisi	100 ml 10X Tris-Glisin Elektrophorez solüsyonu alındı, son hacmi 900 ml distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

1X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

0.125 M Tris pH 6.8, %2 SDS, %10 (v/v) gliserol, %10 (v/v) β -merkaptoetanol, ve %0.01 (w/v) bromfenol mavisi) karıştırılarak hazırlandı. -20°C de saklandı.

PBS Hazırlama

100ml 1x PBS için 25x'lik Fosfat Tampon Solüsyonundan (PBS, 003002, İnvitrogen) 4 ml+ 96 ml distile su eklendi.

Crystal violet hazırlama

%0,1'lik crystal violet solüsyonu hazırlamak için 0,05 gr crystal violet (Carlo Erba, France) hassas terazi ile tartılarak 2,5 cc etil alkol (%96'lık) eklendi. 17,5 cc distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

%0,1'lik Triton X solüsyonu hazırlama

%0,1'lik Triton X solüsyonu için 10 ml PBS'ye 10 mikrolitre TritonX100 (Merck, 1.08603) solüsyonu eklendi.

3.4. Bitki Örneği

Araştırmamızda kullanılan *Arum dioscoridis* (Araceae) bitkisi, 2022 Mart-Haziran aylarında Kızılkas, Sarıçam/Adana'da toplandı. (11.03.2022-18.05.2022)
Koordinatlar 37°06'24.4"N 35°27'40.1"E ve 37°05'20.9"N 35°26'59.5"E.



Resim 3.1: *Arum dioscoridis* (orijinal) arazideki resmi.

Bitki örneklerinin teşhisi, Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Öğr. Gör. Dr. Ömer Koray YAYLACI tarafından gerçekleştirildi ve toplanan bitkiler teşhis edildi (**Resim 3.1**).

İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. BİROL MUTLU tarafından birer örnek kurutulup etiketlenerek İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'na INU 16380-2022 numarası verilerek herbaryumda referans materyali olarak saklandı (**Resim 3.2**).



Resim 3.2: *Arum dioscoridis* referans materyali resmi.

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. *Arum dioscoridis* bitki ekstraksiyonu

A. dioscoridis bitkisinin yaprak kısmı toplandıktan sonra 25 °C'de karanlıkta, nemsiz ortamda kurutuldu. Kurutulan bitki yaprakları küçük parçalar haline getirildi.

Numune 10 g hassas terazi ile tartıldıktan sonra 250 mL'lik erlenlere konularak üzerine 100 mL etanol (çözücü) eklendi. Ekstraksiyon işlemi ultrasonik-destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan numune ultrasonik banyoda (Cole Palmer) 40-45°C'deki steril distile su içerisinde 30 dakika bekletildi. Ekstraktı süzmek için Whatman No:1 filtre kâğıdından vakum filtrasyon yardımıyla süzöldü. Süzülen ekstraktlar, kullanılmış olan çözücü rotary evaporatör (Heidolph Laborota 4000) sayesinde düşük basınç ve 40°C'nin altında tamamen uçurulduktan sonra cam petrilere 37-40°C sıcaklıktaki etüvde kurutuldu. Hazırlanan ekstrakt 5 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek bulunduğu yerden kaldırıldı. Ekstrakte edildikten sonra işlemlerde kullanılıncaya kadar karanlıkta -20 °C'de buzdolabında saklandı.



Resim 3.3: *Arum dioscoridis* ekstresi, ultrasonikatör ve evaporatör.

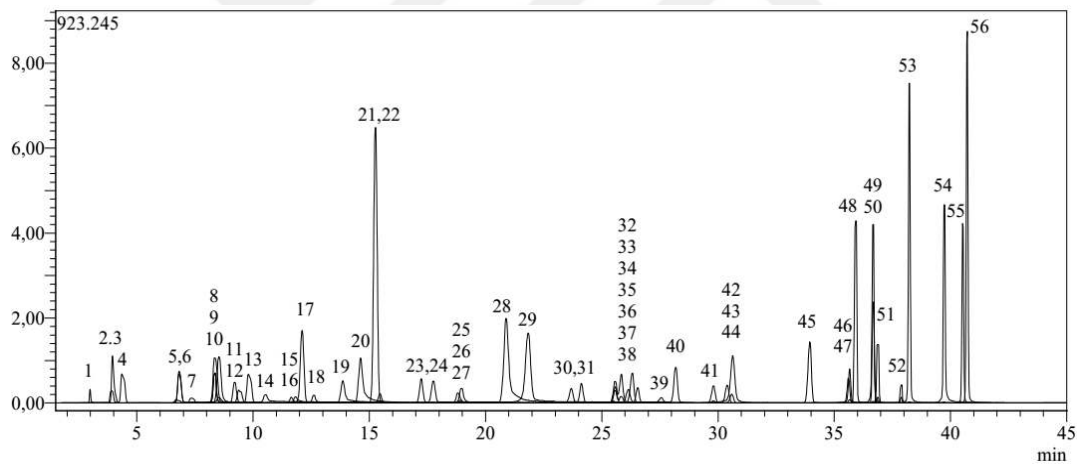
3.5.2. Toplam fenolik madde miktarı tayini

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler antioksidan kapasitesi ve bileşimi açısından önemlidir. Fenolik bileşiklerin tayin yöntemi, elektronların fenolik bileşiklerden ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdene transferine dayanmaktadır. 750-765 nm'deki spektrofotometre ile absorban değerinin ölçülmesiyle belirlenir.

Standart fenolik bileşik olarak çoğunlukla gallik asit kullanılır ve sonuçlar Gallik Asit Eşderi (GAE) olarak verilmektedir. Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen yöntemle göre; *A. dioscoridis* bitki etanolünün toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi ile belirlendi [116]. Bu prosedüre göre uygun dilüsyonlar yapıldı ve 200 µL ekstrakt solüsyonu ve 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş) eklendi. 800 µL %10 (w/v) Na₂CO₃ solüsyonu ilave edildi, tüpler karanlıkta 25 °C'de vortekste 120 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda absorbans, bir UV-Vis spektrofotometrede 765 nm'de belirlendi. Fenol içeriğinin toplam miktarı bir gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenerek ve gallik asit eşdeğeri olarak verildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve µg GAE *A. dioscoridis* etanol özü ile ifade edildi.

3.5.3.LC-MS/MS analizi

ADEE'nin içerisindeki fenolik bileşiklerin kantitatif tayini Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜBTAM)'nde Doç. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ tarafından LC-MS/MS yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: LC-MS/MS metodunda kullanılan fitokimyasal standartlarının TIC kromatogramı.

3.5.3.1.Kütle Spektrometre ve Kromatografi Şartları

53 fitokimyasalın kantitatif analizi, Shimadzu Nexera model UHPLC sistemi kullanılarak tandem akış spektrometresi ile yapıldı. Kullanılan ters fazlı HPLC sistemi, otomatik numune alıcı (model SIL-30AC), kolon fırını (model CTO-10ASvp), gradyan pompa sistemi (model LC-30AD) ve gaz gidericiden (model DGU-20A3R) oluşur. Agilent Poroshell 120 model EC-C18 (150 mm x 2.1 mm, 2.7 µm) kolon ile kromatografik ayırma yapıldı.

Sütun sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyenti mobil faz A (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit) ve mobil faz B (ultrasaf su+5 mM amonyum format+0.1% formik asit)'den oluşmaktadır. Şu şekilde bir gradiyent elüsyon profil kullanıldı: %20-100 B (0-25 dakika), %100 B (25-35 dakika), %20 B (35-45 dakika). Ayrıca mobil faz akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0,5 mL/dk. ve 5 µL olarak belirlendi. Kütle spektrometresi tayini için kullanılan LC-MS/MS sisteminde hem pozitif hem de negatif modda çalışan elektrosprey iyonizasyon kaynağı ile donatılmış Shimadzu LCMS-8040 model sıralı kütle spektrometresi kullanılmıştır. LC-ESI-MS/MS verileri alındı ve LabSolution yazılımı (Shimadzu) ile işlendi. Fitokimyasal konsantrasyonları ölçmek için MRM (çoklu reaksiyon izleme) kullanıldı. MRM yöntemi, farklı kritik iyon parçalanma iyon kaymalarının analizine dayalı olarak fitokimyasalların seçici tespiti ve miktarının belirlenmesi için uyarlanmıştır. Çarpışma enerjisi (CE), optimum biyokütle ayırma ve istenen parçalanma iyonlarının maksimum göçünü elde etmek için optimize edilmiştir. Kullanılan MS'nin çalışma koşulları: kurutma gazı akışı (N₂), 15 L/dk; Nebulizer gaz akışı (N₂), 3 L/dk; DL sıcaklığı, 250°C; Termal blok sıcaklığı 400°C'ye ve reaksiyon sıcaklığı 350°C'ye ayarlandı [117].

3.5.4.in vitro antioksidan aktivitenin belirlenmesi

3.5.4.1.DPPH radikali giderici aktivite tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal temizleme yöntemi, antioksidan aktiviteyi belirlemek için kullanılır. Metod, kararlı ve aktive edilmiş bir radikal olan DPPH'yi kullanır ve ölçümü, antioksidanın serbest radikal yakalama yeteneğini gösterir. *A. dioscoridis*'in konsantre ekstraktının antioksidan aktivitesi DPPH radikal süpürme aktivitesi, deneyi ile belirlendi.

Radikal reaksiyonunun mekanizması antioksidan-DPPH için şu şekildedir;



Koyu mor bir radikal olan DPPH, H⁺'yı bir antioksidandan uzaklaştırır ve onu renksiz bir α,-difenil-β-pikrilhidrazil molekülüne dönüştürür. DPPH, antioksidan madde tarafından indirgenir ve moleküldeki serbest elektron transferi nedeniyle rengi açılır. DPPH'nin antioksidan madde ile reaksiyonunun absorpsiyonu 515 nm'de maksimumdur. Antioksidandan DPPH serbest radikale proton transfer reaksiyonu 517 nm'de absorpsiyon değeri azalmaya neden olur.

Çalışmanın birinci aşamasında 250 ml'lik erlene 0,0237 g DPPH ve 5-10 ml metanol ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1 dakika homojen bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti daha sonra balona alınarak 100 ml'ye kadar metanol ilave edildi. Yayılan rengin absorbans değeri 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü ve değer A0 değeri olarak kaydedildi. Hazırlanan solüsyon çalışma ile aynı gün kullanıldı. Çözelti, kullanıma kadar karanlık bir yerde saklanır. ADEE metanol ile 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranında seyreltildi. Kontrol grubu için 0,1 ml metanol; 1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 dilüsyonlarla hazırlanan 0,1 ml'lik numune alınarak tüplere yerleştirildi. Üzerine 3,9 ml DPPH solüsyonu eklendi. Ortaya çıkan çözelti, 60 dakika boyunca karanlık bir yerde saklandı. Ortaya çıkan rengin absorbansı, 517 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometrede okundu.

Elde edilen absorbans değerinden örneklerin % süpürme kapasiteleri;

% DPPH = $[A_{60} / A_0] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı.

% İnhibisyon = $[100 - \%DPPH]$ formülü kullanılarak hesaplandı.

A0: Antioksidan içeren örneğin 0.dakikadaki absorbansı

A60: Antioksidan içeren örneğin 60. dakikadaki absorbansı

Sonuçlar, DPPH'nin %50'sini inhibe eden IC₅₀ konsantrasyon değeri, % DPPH inhibisyon-özüt konsantrasyonu grafiğinden elde edilen doğruya göre hesaplandı.

3.5.5. Hücre kültürü

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hücre kültürü ve histolojik boyama aşamaları yapıldı. Uygulama aşamalarının tümü, ortam koşulları sağlanarak, steril laminar hava akımlı kabinlerde ve biyogüvenlik önlemlerine dikkat edilerek gerçekleştirildi.

Kullanılan hücre hatları

Çalışmada kullanılan PANC-1 ve HEK293 hücre hatları ATCC'den (American Type Culture Collection) alındı.

Kullanılan etken madde ve özellikleri

Çalışmamızda kullandığımız *A. dioscoridis* bitkisi Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, bitki etanol ekstraktı haline getirilerek çalışmada kullanıldı.

Besiyerlerinin hazırlanması

Hücrelerin çoğalmalarını ve yaşamlarını sürdürebilmelerini sağlayacak ortam için PANC-1 ve HEK293 hücreleri %10 fetal sıgır serum (FBS) ve 10.000 U/mL Penisilin 10.000 ng/mL streptomisin eklenmiş DMEM besiyerinde kültüre edildi.

3.5.5.1. Hücrelerin çözündürölme ve büyütölme aşamaları

-80°C'de dondurulmuş olarak muhafaza edilen PANC-1 ve HEK293 hücreleri açılmaya başlanmadan laboratuvar ortamı hazırlık aşamaları kapsamında sıcak su banyosunun sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. Kriyotüpler -80°C'den direkt 37°C'de dengelenmiş su banyosunda yaklaşık 3 dakika içerisinde eritildi ve üzerine 5 ml taze besiyeri eklendi. Falkon tüplere aktarılan besiyer içerisindeki hücreler 5 dakika 300xg'den santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak atıldı. Pellet kısmına 5 ml %10 FBS, L-glutamin ve penisilin-streptomisin içeren taze besiyeri ile karıştırıldı. Süspanse hale getirilen hücreler 25 cm²'lik flakslara ekildi. Ekimi tamamlanan hücreler %5 CO₂ ihtiva eden 37°C inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra 2-3 günde bir kontrol edildi. Kontrol esnasında hücrelerin ve besiyerinin durumuna bağlı olarak, 1X DPBS ile yıkanarak besiyerleri değiştirildi.

3.5.5.2. Hücrelerin pasajlanması ve sayımı

Hücreler laminar flow kabininde 25 cm²'lik flakslara ekildikten sonra 37°C'de %5 CO₂ ile inkübatörde inkübe edildi. İnverted mikroskop (OLYMPUS Inverted Microscope) kullanılarak flaks doluluğu gözlemlenerek (%80-90 yoğunluk) pasaj işlemleri gerçekleştirildi. Flakslardaki besi ortamı pasaj işlemi sırasında uzaklaştırıldı. Fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkama yapıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden nazikçe ayrılması için 2,5 ml %0.25 Trypsin-EDTA ortama eklendi ve 37 °C %5 CO₂ inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. Böylece hücrelerin yüzer hale gelmeleri sağlandı. Hücrelerin üzerine tripsin reaksiyonunu durdurmak için 2,5 ml taze besiyeri eklendi. FBS içeren besiyeri kullanıldı. Tekrar 300xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Elde edilen hücreler 2 ayrı T25 flaska bölündü. Hücre pasajlama sayısı HEK293 hücre hattı için 49, PANC-1 hücre hattı için 11'dir.

Hücre sayımı

Hücre sayımı deneyde kullanılacak hücre miktarını belirlemek amacıyla yapıldı. Hücreler tripsinizasyon ile süspansiyon haline getirildikten sonra hücre sayımı aşamasına geçildi.

Oransal olarak değerlendirme ile toplam hücre süspansiyonunda mililitre başına hücre sayısını hesaplamak için 10 µl hücreye 10 µl Trypan mavisi eklenerek Thoma 35 lamına koyuldu ve üzeri lamel ile kapatıldı. Canlı hücre zarı negatif yüklüdür, bu halde trypan mavisi geçişine izin verilmez. Ölü hücre zarı pozitif yüklü olduğundan trypan mavisi kolayca içeriye girebilir. Trypan mavisi ile boyanan hücreler inverted mikroskop ile hücre sayım kriterlerine uygun şekilde sayım yapılarak oransal olarak çözelti için ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Sayımı yapılan hücreler deney planına ve yoğunluklarına göre 25 cm² ve 75 cm² 'lik flasklara ekilip %5 CO₂ ihtiva eden 37°C inkübatöre kültüre edildi.

Deney gruplarımız

Tablo 3.4: Deney grupları

Grup 1	Kontrol (PANC-1)
Grup 2	Deney (PANC-1 + ADEE 48 saat uygulama)
Grup 3	Kontrol (HEK293)
Grup 4	Deney (HEK293+ ADEE 48 saat uygulama)

3.5.5.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

%90 FBS ve %10 DMSO karıştırılarak bu çözelti içerisinde hücre dondurma ve stoklama işlemi gerçekleştirildi. -80°C'de soğuğa dayanıklı kriyovial tüplerde 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde dondurularak stoklar halinde saklandı.

3.5.6. ADEE 'nin stok solüsyonunun hazırlanması

Hazırlanan ADEE'den ml'de 120 mg/mL olacak şekilde DMSO ile çözüldü. Solüsyon önce steril ortamda hücre süzgeci filtreden geçirildi sonra steril 0.45 µm filtreden ve son olarak steril 0.22 µm filtreden geçirildi. Buzdolabında +4°C' saklandı. Deneyde kullanılan farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler, PANC-1 ve HEK293 hücreleri için DMEM besiyeri ile seyreltilerek stok çözeltilerden hazırlandı.

3.5.7.ADEE'nin hücrelerde sitotoksikite testi (MTT)

ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-dimetidiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi uygulandı. MTT testi, hücre canlılığını belirlemek için kolorimetrik bir yöntemle formazan kristallerini ölçerek hücre metabolik aktivitesine ve formazan tuzu tüketiminin etkisine dayanan bir testtir. 96 kuyucuklu plate'e, kuyucuk başına yaklaşık $5-10 \times 10^3$ hücre içeren 100 µl besiyeri içinde ekim yapıldı. 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyondan sonra eski besiyeri çıkarıldı. DMSO (%0,1'lik) ve EtOH (%1'lik) ile *A. dioscoridis*'nin konsantrasyonları 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml yapılacak şekilde belirlendi. Ana stoktan seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanan besiyerlerinden kuyucuklara 100 µl eklenerek 24-48 saat 37°C'de %5 CO₂ ortamda inkübatörde inkübasyon işlemine tabi tutuldu. İnkübatör işleminden sonra etken madde içeren medyum uzaklaştırıldı. Hücreler kuyucuk başına 100 µl 1X DPBS ile yıkandı, her oyuğa 10 µl 10X MTT içeren 100 µl DMEM-RPMI 1640 besi ortamı eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan MTT içeren besi ortamı uzaklaştırılarak yerine 50 µl DMSO eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra mor formazan kristallerinin tamamen çözülmesi beklendi. Sarı MTT boyasının mor formazona indirgenme miktarının spektrofotometrik ölçümü temeline dayanan bu yöntem ancak canlı hücrelerde bulunabilecek mitokondriyal bir redüktaz olan süksinat DHG aktivitesi ile NADH NAD'a dönerken MTT ise formazon kristaline döner. Bu indirgenme reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde gerçekleşebidiğinden sarı rengin mor renge dönüş miktarı ortamdaki canlı hücre sayısı ile koreledir. Başlangıçta sarı renkli olan MTT canlı kalan hücrelerin kullanımı ile mor renk alır. İnkübasyondan sonra mikropate okuyucuda renk değişimi spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile tayin edildi. Yüzde hücre canlılığı, artan *A. dioscoridis* konsantrasyonları ile PANC-1 ve HEK293 deney gruplarından elde edilen absorbans değerlerinin, kontrol grubundan elde edilen absorbans değerine bölünmesi ve 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

3.5.8.Histopatolojik inceleme

3.5.8.1.Işık mikroskobu için hücrelerin hazırlanması

İmmunositokimyasal boyama aşamasında PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarında ADEE uygulaması ile tümör patogenezinde bilinen pro-inflamatuar sitokin olan IL-6 yolağının nasıl etkilendiğini göstermek amaçlandı. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübasyon koşullarında 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün kontrol grubuna taze besiyeri, deney gruplarına MTT yöntemiyle belirlenen dozlarda ADEE ile hazırlanmış taze besiyeri uygulandı. 48 saat inkübasyondan sonra besiyerleri hücre bloğu hazırlamak için öncelikle hücre kazıyıcı (cell scapers) ile mekanik olarak hücreler yerlerinden kaldırıldı. 4 dk. 4000 rpm devirde santrifüj edildi. Pellet kısmına 3 ml %96'lık etanol ilave edildi. 15-30 dk. bekletildi. Kurutma kâğıdı üzerine hücreler alındı. Daha sonra (Tablo 3.5)'deki işlemler uygulandı. Hücreler parafin bloklara gömülerek hücre bloğu hazırlandı.

Tablo 3.5: Hücre bloğu için kısa takip protokolü

Kimyasal	Süre
%80 Etanol	10 dk.
%96 Etanol	8 dk.
%96 Etanol	10 dk.
Xylene I	10 dk.
Xylene II	10 dk.
Parafin I	10 dk.
Parafin II	10 dk.
Gömme	1 dk.

3.5.8.2.Kesitlerin alınması ve boyanması

Leica RM 2245 mikrotomunda (Almanya) bloke edilen hücrelerden 4-5 µm kalınlığında kesitler pozitif yüklü lamlara yerleştirildi. 80 °C'ye ayarlanmış etüvde 20-25 dk. bekletildi. Hematoksilen – Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı.

Ksilen ile 15 saniye çalkalandı. 3x1 dk. ksilende, 3x1 dk. %100 etanolde bekletildi, 1 dk. distile su ile yıkama işlemi yapıldı. Hematoksilen 5-6 dakika bekletildi. 2 dk. distile su ile yıkama işlemi yapıldı. 5 saniye %1'lik hidroklorik asitte (100 ml etanol, su 1 ml HCL) çalkalandı. 2 dk. yıkama işlemi yapıldı.

5 saniye %1'lik amonyakta (99 ml distile su, 1ml amonyak) bekledi. 2 dk. yıkama yapıldı. Eozin 1-2 dk. bekledi. 1 dk. yıkama işlemi yapıldı. 2x1 dk. etanolde bekletildi. 3x1 dk. ksilen bekletildi. Lamlara 2 damla entellan damlatılıp 45 derecelik açıyla lameller kapatıldı. Tüm gruplara ait hücre bloğu kesitlerinde Hematoksilen Eozin boyama işlemi Kamera entegreli ışık mikroskopunda 100x, 200x ve 400x büyütmelemlerde (Olympus DP26-CU;Leica MD750) ile fotoğraflandırıldı.

3.5.8.3.İmmünositokimyasal incelemeler

Leica RM 2245 mikrotomunda (Almanya) bloke edilen hücrelerden 4-5 µm kalınlığında kesitler pozitif yüklü lamlara yerleştirildi. Alınan kesitler 70 °C'ye ayarlanmış etüvde 1-2 saat bekletildi. İmmünositokimyasal incelemenin diğer adımlarını aşağıdaki prosedürler izledi.

1. Lamlar 3x5 dakika ksilen içinde bekletildi.
2. %100'lük alkolde 5 dk. bekletildi.
3. PBS 5-10'er dakika aralıklarla geçirildi.
4. Hücrelerin etrafı PAP Pen ile işaretlendi.
5. Hücreler 3x5 dk. PBS ile yıkandı.
6. Hücreler, 1/200 µl seyreltilmiş primer IL-6 antikorı (100 µL poliklonal anti-IL-6 antikorı, BS-4539R) ile 2 saat boyunca sıcak suda buharıyla bekletildi.
7. PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
8. Biyotinlenmiş sekonder antikor, hücrelere 30 dakika süreyle uygulandı.
9. PBS ile 3x5 dk. yıkama işlemi yapıldı.
10. 30 dakika 1- 2 damla streptavidine maruz bırakıldı.
11. PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
12. Hücreler 100 µl DAB kromojen ile (kahverengi bir renk görünene kadar) 5-6 dakika boyandı.
13. Lamların yıkama işlemi PBS yapıldı ve 3-4 dakika boyunca Mayers Hematoksilen ile boyama işlemine tabi tutuldu.
14. Lamlara yeniden yıkama işlemi yapıldı ve 10 saniye alkol ardından 10 saniye ksilende bekletildi.
15. Lamlara 2 damla entellan damlatılıp 45 derecelik açıyla lameller kapatıldı.

3.5.8.4.İmmünohistokimyasal incelemeler

Spesifik immünoreaktiviteyi kontrol etmek için antikor ile negatif ve pozitif kontrol boyaması yapıldı. IL-6 antikoru için pozitif doku olarak timus dokusu kullanıldı ve negatif kontrol olarak primer antikor uygulaması yapılmadan PBS solüsyonu kullanıldı. Bloke edilen timus dokusundan 4-5 µm kalınlığında kesitler pozitif yüklü lamlara yerleştirildi ve 70 °C'ye ayarlanmış etüvde 1-2 saat bekletildi. İmmünohistokimyasal incelemenin diğer adımlarını aşağıdaki prosedürler izledi.

- 1.** Lamlar 3x5 dakika ksilen içinde bekletildikten sonra azalan alkol serisinden (100-90-80-70) saf su ve PBS sırasıyla 5'er dakika aralıklarla geçirildi.
- 2.** Antijen kurtarma aşaması için lamlar %10 sitratlı tampon çözeltisi ile 700 watt'a 1-2 dk. ısıtma 1-2 dk. soğutma aşaması 6-7 defa tekrarlandı.
- 3.** Tüm lamlar aynı solüsyonda 15 dakika soğutulma işlemine tabi tutuldu.
- 4.** Hücrelerin etrafı PAP Pen ile işaretlendi.
- 5.** Hücreler 3x5 dk. PBS ile yıkandı.
- 6.** Hücrelere %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi.
- 7.** PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- 8.** Hücreler 15-20 dakika protein blok (large UV blok) işlemine maruz bırakıldı.
- 9.** Hücreler, 1/200 µl seyreltilmiş primer IL-6 antikoru (100 µL poliklonal anti-IL-6 antikoru, BS-4539R) ile 2 saat boyunca sıcak suda buharıyla bekletildi.
- 10.** PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- 11.** Biotinlenmiş sekonder antikor, hücrelere 30 dakika süreyle uygulandı.
- 12.** PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- 13.** 30 dakika 100 µl streptavidine maruz bırakıldı.
- 14.** 3 PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- 15.** Hücreler 100 µl DAB kromojen ile (kahverengi bir renk görünene kadar) 5-6 dakika boyandı.
- 16.** Lamların yıkama işlemi PBS yapıldı ve 3-4 dakika boyunca Mayers Hematoksilen ile boyama işlemine tabi tutuldu.
- 17.** Lamlara yeniden yıkama işlemi yapıldı ve 10 saniye alkol ardından 10 saniye ksilende bekletildi.
- 18.** Lamlara 2 damla entellan damlatılıp 45 derecelik açıyla lameller kapatıldı.

Tüm gruplara ait hücre bloğu kesitlerinde IL-6 immünreaktivitesi, kamera entegreli ışık mikroskobunda 200x büyütmede (Olympus DP26-CU;Leica MD750) her bir gruba ait preparatta, rastgele seçilen 10 alanda histolojik skoruyla (HSCORE) değerlendirildi [118]. Skorelama, kesitlerde immünoreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi (Pi) ve boyanma derecesi (i) baz alınarak gerçekleştirildi. Boyanmanın şiddeti; 0, boyanma yok; 1+, zayıf fakat tespit edilebilir boyanma; 2+, orta ya da belirgin boyanma; 3+, yoğun boyanma şeklinde skorlandı. Ortalama HSCORE değeri, her bir yoğunluk kategorisine ait boyanmış hücre yüzdesinin yoğunluk ile çarpımı şeklinde hesaplandı. Her bir gruba ait ortalama skorları istatistiksel analizlerde kullanıldı.

Çalışmamızda kullandığımız ADEE, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, q-PCR ve Western blot yöntemleri çalışıldı.

3.5.9. PANC-1 ve HEK293 hücre hattından total RNA izolasyonu

Öncelikli olarak *A. dioscoridis*'nin PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarında hedef genlerin ifade düzeylerindeki değişikliği saptamak için RNA izolasyonu yapıldı. Yaklaşık 4×10^5 hücre olacak şekilde, 5 ml besiyeri içerisinde 25 cm² flakslara ekildi. 24 saat inkübasyonda inkübe edildi. İnkübe edildikten sonra flakslara PANC-1 hücre hattı için 210 µg/ml ve HEK293 hücre hattı için 430 µg/ml konsantrasyonlarında ADEE uygulanarak 48 saatlik sürede inkübasyona bırakıldı.

RNA izolasyonu TRI-Reagent solüsyonu (Sigma, 93289) kullanımı ile gerçekleştirildi.

- ADEE içeren besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler 2 kez 1X DPBS ile yıkandıktan sonra her kuyucuğa 1 ml TRI-Reagent solüsyonu eklendi. Pipetleme yapılarak 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı ve buz kasetlerin üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
- 250 µl kloroform eklendi. Tüpler ters çevrilerek karıştırıldıktan sonra 30 saniye vortekslendi ve 10 dakika buz kasetler üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından karışım +4°C'de 15 dakika 14000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra, süpernatant yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- 400 µl soğuk izopropanol karışım üzerine ilave edildi ve 10 dakika buz kasetlerin üzerinde inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından karışım +4°C'de 14000xg'de 10 dakika santrifüjlendi.

- Santrifüj edildikten sonra süpernatant çıkarıldı ve 1 mL soğuk %70 etanol pelete eklendi, tekrar 14000xg'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlendi. İşlem 2 defa yapıldı.
- Santrifüj işleminin ardından süpernatant çıkarıldı ve kalan RNA pelleti kurumaya bırakıldı.
- DNaz muamelesi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.
- Kurutulduktan sonra, RNA peleti 50-100 µl nükleaz içermeyen dH₂O ile çözüldü.
- RNA konsantrasyonu ve saflık tayini nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.
- RNA -80°C'de saklandı.

DNaz muamelesi

Bu yöntem, RNA preparasyonlarını kirleten genomik DNA'yı çoğaltarak ve yanlış pozitif yanıtlara neden olabilmesiyle RT-qPCR testlerinde hatalı sonuçları önlemek amacıyla yapılmaktadır. onuçlar daha güvenilirlerdir [119]. Yapılan çalışmada bütün gruplar için örneklerin DNaz ile muamelesi (**Tablo 3.6**)'da belirtilmiştir.

Tablo 3.6: DNaz muamelesi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
RNA	5 µg
DNaz I (RNaz içermeyen)	1 µl
10X reaksiyon buffer	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	20 µl' ye tamamlanana kadar

0.2 ml'lik tüplere hazırlanan karışım (**Tablo 3.6**)'a göre, Biorad T100 Thermal Cycler cihaza yerleştirildi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 1 µl 0.5 mM EDTA eklenerek DNaz enziminin inaktivasyonu sağlandı. RNA örnekleri Monarch RNA CleanUp kit ile cleanup yapıldı.

3.5.10. cDNA sentezi

Toplam RNA'dan cDNA sentezi, mevcut kit protokolüne göre First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1612, Fermentas Thermo Fisher Scientific, Hudson, NH, ABD) kullanılarak yapıldı. Bir tüpte 500 ng RNA, 1 µl 100 µM random hexamer primer, 2 µl 10 mM dNTP karışımı eklenir. Daha sonra 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 2 µl 20 U M-MuLV ters transkriptaz enzimi, 1 µl Ribocock dNTP 20 µl Ribocock 20 µl Ribocock µl Nükleaz içermeyen Ribocock RNA tozu ilave edilerek 25 °C'de 5 dakika sentezi tamamlanır. 37°C'de 60 dk. 70°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA, 1:1 oranında sulandırılarak PCR için kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.5.11. Kantitatif gen ekspresyon analizi (qRT-PCR)

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak ADEE 'nin, ERK1/2, MTOR, BCL-2, CASP3, BAX, MYC, TP53 ve HMGB1 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla gerçek zamanlı kantitatif PCR (q-PCR) analiz çalışması yapıldı.

Tüm RT-qPCR deneyleri, CFX96 Touch Real-Time PCR sistemi ve SYBR Green Master Miks (iTaQ Universal SYBR Green Supermix, BioRad-1725121) cihazları kullanılarak yapıldı (**Tablo 3.2**).

Tablo 3.7: qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşeni	Hacim
SYBR Green Master Miks	5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,2 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,2 µl
cDNA	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	3,6 µl
Toplam	10 µl

Her reaksiyon, aynı plaka üzerinde iki kopya halinde gerçekleştirildi. RT-qPCR, 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, ardından 95 °C'de 15 saniye ve 59 °C'de 30 saniye 39 döngü amplifikasyon uygulandı. PCR amplifikasyonundan hemen sonra, 65 °C ile 95 °C arasında 0,5 °C/sn'lik bir sıcaklık geçiş hızı ile 95 °C'de 10 saniye boyunca erime eğrileri oluşturuldu.

Her hücrede eksprese olan ve değişiklik gözlenmeyen gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) geni referans gen olarak kullanıldı. Ct değerleri, Real Time PCR cihazı (Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR) kullanılarak hesaplandı. Gen ekspresyonlarındaki rölatif değişim karşılaştırmaları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemine göre analiz edildi.

3.5.12.Primerlerin çözündürülmesi ve hazırlanması

Liyofilize primerler 3000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve 100 µmol/µl konsantrasyonda nükleaz içermeyen suda çözüldü. Her gen için forward ve reverse primerinden 10 µM'lik alt stoklar hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) analizinde kullanılmak üzere BAX, BCL-2, CASP3, TP53, MYC genleri için primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information) platformu kullanılarak dizayn edildi. GAPDH, MTOR, HMGB1 ve ERK1/2 genleri için primerler ise çizelgede belirtilen referanslardan alınmıştır (**Tablo 3.8**).

Tablo 3.8: Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR) deneyinde kullanılmak üzere 8 gen için Forward ve Reverse primer çiftleri

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'→3')	Referans
<i>GAPDH</i>	Forward	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	[120].
	Reverse	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	
<i>BAX</i>	Forward	CCAAGAAGCTGAGCGAGTGT	Gen ID: 581
	Reverse	GCTGGCAAAGTAGAAAAGGGC	Self Dizayn
<i>BCL-2</i>	Forward	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	Gen ID: 596
	Reverse	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	Self Dizayn
<i>CASP3</i>	Forward	TGTCGATGCAGCAAACCTCA	Gen ID: 836
	Reverse	CCTTCTTCACCATGGCTCAGA	Self Dizayn
<i>TP53</i>	Forward	CAGACCTATGGAACTACTTCCTG	Gen ID: 7157
	Reverse	GCATTCTGGGAGCTTCATCT	Self Dizayn
<i>MYC</i>	Forward	CAGATCAGCAACAACCGAAA	Gen ID: 4609
	Reverse	GGCCTTTTCATTGTTTTCCA	Self Dizayn
<i>ERK1/2</i>	Forward	TCAAGCCTTCCAACCTC	[121].
	Reverse	GCAGCCCACAGACCAAA	
<i>MTOR</i>	Forward	TTCGTGCCTGTCTGATTCTC	[122].
	Reverse	ATCCCGATTTCATGCCCTTC	
<i>HMGB1</i>	Forward	TATGGCAAAAGCGGACAAGG	[123].
	Reverse	CTTCGCAACATCACCAATGGA	

3.5.13.Semi- kantitatif protein ekspresyon (Western blot) analizi

ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücre hatlarında CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin ifade düzeylerindeki değişikliğini saptamak için Western blot analiz çalışması yapıldı. ACTB (Beta-aktin) geni housekeeping gen olarak kullanıldı.

3.5.13.1.Total protein izolasyonu

25 cm² flasklara 5 ml besiyeri içerisinde yaklaşık 4x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübasyon sonrası flasklara PANC-1 hücre hattı için 210 µg/mL ve HEK293 hücre hattı için 430 µg/mL konsantrasyonlarında ADEE uygulanarak 48 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

1. Uygulama yapılan ve yapılmayan hücre gruplarının besiyeri uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi soğuk PBS ile yapıldı.
2. Hücreler soğuk PBS ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı.
3. Hücreler, 1500 rpm'de 4 dk. santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldı, Ripa Lizis Buffer ile hücre pelleti 2×10^7 /ml oranına uygun miktarda çözüldü.
5. 4°C'de 60 dk. 1500 rpm'de çalkalandı.
6. Süre sonunda 16000 g'de 20 dk. 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pellet atıldı.
7. Hücre lizatları -20°C'de işlem süresince saklandı.

3.5.13.2. Qubit ile protein konsantrasyon analizi

Elde edilen hücre lizatının protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Qubit™ Protein Assay Kit (Catalog number: Q33211) kullanıldı. Ölçüm kitin mevcut protokolüne göre gerçekleştirildi. 200:1 oranında Protein BR Assay Buffer: Protein BR Reagent hazırlandı. Standartlar için 190 µl, örnekler için 199 µl olacak şekilde bu karışımdan 0.5 ml ependorf tüplere eklendi. Sonrasında standartlar sırasıyla 10 µl olacak şekilde, her bir protein örneğinden de 1 µl olacak şekilde karışıma eklendi, pipet yardımıyla karıştırıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra standartlar ve örnekler Qubit 2.0 Fluorometer'de ölçüldü.

3.5.14. SDS jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Deneyin amacına göre hangi yüzdelik jeli hazırlamamız gerektiği belirlendikten sonra SDS-PAGE elektroforez için jel hazırlandı. SDS jeli ayırma jeli (**Tablo 3.9**) ve yükleme jeli (**Tablo 3.10**) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Her bir örnekten 30-50 µg protein (total hacim 20 µL) jele yüklendi. Örnekler jele yüklemeden önce içine 4X SDS-PAGE yükleme tamponu (0.125 M Tris pH 6.8, %2 SDS, %10 (v/v) gliserol, %10 (v/v) β-merkaptoetanol, and %0.01 (w/v) bromfenolmavisi) ve 1:50 oranında β-merkaptoetanol ilave edildi. 95°C ısıtma bloğunda 5 dk. proteinler denatüre edildi ve örnekler 10 dk. boyunca buz üzerinde bekletildi.

Denatüre olan örnekler yükleme jeline yüklendikten sonra 110 Voltta yaklaşık 15 dakika elektroforezde yürütüldü. Örnekler ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 150 volta çıkarılarak 60 dakika daha yürütülmeye devam edildi.

Tablo 3.9: SDS jel elektroforezinde kullanılan ayırma jelindeki değerler

Bileşenler (1 jel için)	%12 (mL)
Distile Su	1,6
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	2,0
Tris pH:8,8 (1,5M)	1,3
SDS (%10)	0,05
APS (%10)	0,05
TEMED	0,002
Toplam	5

Tablo 3.10: SDS-PAGE jel elektroforezinde kullanılan yükleme jelindeki değerler

Bileşenler (1 jel için)	%5 (mL)
Distile Su	0,68
Akrilamid-Bisakrilamid (%30)	0,17
Tris pH:6,8 (1 M)	0,13
SDS (%10)	0,01
APS (%10)	0,01
TEMED	0,001
Toplam	1

3.5.15. Jeldeki proteinlerin membrana transfer edilmesi (blotlama), bloklanması ve görüntülenmesi

SDS poliakrilamid jeli üzerinde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler blotlama cihazı kullanılarak nitroselüloz membrana transfer edildi. Blotlama prosedürü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Jel boyutunda kesilen nitroselüloz membran, blotlama işleminde kullanılmadan önce 5 dk. boyunca 1X Transfer buffer ile muamele edildi.

Blotlama cihazı içerisine sıra ile 1 parça blotlama kâğıdı, nitroselüloz membran, jel, 1 parça blotlama kâğıdı konularak 2,5 Amper, 25 Volt'da 30 dk. süre ile proteinler transfer edildi. Membran 1 saat (h) oda sıcaklığında bloklama çözeltisi ile muamele edildi. Bloklama çözeltisi olarak 1X TBS-T ile hazırlanan %5'lik BSA kullanıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra membran 3 kez 10 dk. boyunca 1X TBS-T ile yıkandı. Membran 4°C'de 1 gece bloklama çözeltisi içerisinde hazırlanmış birincil antikorlar ile (**Tablo 3.11**)'deki gibi dilüe edilerek inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında membran 3 kez 10 dk. boyunca 1X TBST ile yıkandı. Membran 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi içerisinde hazırlanmış ikincil antikor ile (**Tablo 3.12**)'daki gibi dilüe edilerek inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında membran 3 kez 10 dk. boyunca 1X TBST ile yıkandı. Antikoru kimyasal sinyal oluşturmalarını sağlamak amacıyla ECL reagent substratları (BIORAD, Clarity Max Western ECL Substrate/Clarity™ Western ECL Substrate) kullanıldı. Membranın kemilüminesans görüntüsü Azure c600 Gel Imaging System cihazı kullanılarak elde edildi.

Tablo 3.11: Western blot tayini için kullanılan birincil antikorlara ait bilgiler

	Marka/ Kod	Bloklama Solüsyonu	Bloklama Süresi	Seyreltme Oranı	Antikor ile İnkübasyon	Protein Büyüklüğü
β-Aktin	Santa Cruz/ sc-69879	%5 BSA	Oda sıcaklığında 60 dakika	1:5000	+4 °C'de 12 saat	43 kDa
CASP3	Affinity Biosciences/ AF6311	%5 BSA	Oda sıcaklığında 60 dakika	1:2000	+4 °C'de 12 saat	37 kDa
BCL-2	Santa Cruz/ sc-7382	%5 BSA	Oda sıcaklığında 60 dakika	1:1000	+4 °C'de 12 saat	26 kDa
BAX	Cell Signaling Technology/ #2774	%5 BSA	Oda sıcaklığında 60 dakika	1:1000	+4 °C'de 12 saat	20 kDa

Tablo 3.12: Western blot tayini için kullanılan ikincil antikorlara ait bilgiler

İkincil Antikor	Marka/ Kod	Seyreltme Oranı	İnkübasyon süresi
Mouse Anti- Rabbit	Santa Cruz/ sc-2357	1:5000	Oda sıcaklığında 60 dakika
Anti- mouse	Santa Cruz/ sc-516102	1:5000	Oda sıcaklığında 60 dakika

3.6. İstatistiksel Analizler

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edilmiş, normal dağılım değişkenlerin üzerine 2 farklı faktörün düzeylerinin etkisinin değerlendirilmesinde 2 yönlü Varyans analizi uygulandı. Anlamlı bulunan interaksiyon etkileri LSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Analizlerde SPSS for Windows 22 yazılımı kullanıldı, p değerinin 0,05 den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Ayrıca, ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücrelerine 48 saat uygulanması sonrası ERK1/2, MTOR, HMGB1, P53, MYC, BAX, BCL-2 ve CASP3 genlerin ifade düzeyleri, Ct değerleri sonuçları baz alınarak yorumlandı. Real Time PCR sonrası gen ekspresyonu sonuçları her bir örneğe ait ilgili genin Ct değeri, o örneğin referans geninin Ct değerinden çıkarılarak delta Ct (ΔCt) değerleri hesaplandı. ADEE uygulanan örneğin ΔCt değerinden ADEE uygulanmayan kontrol grubu örneğinin ΔCt değeri çıkarılarak delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değerleri standart sapmalarıyla hesaplandı. Bu değerler Excel programına girildi ve ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta (Gen Ct - Referans Ct)}$) formülüyle analizleri yapıldı. Livak tarafından önerilen bu yöntem ile ADEE uygulanmayan kontrol grubu genleri ve ADEE uygulanan hücrelerdeki genlerin ifade düzeyleri karşılaştırıldı [124]. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden elde edilen verilere göre Graphpad Prism 8 yazılım programı kullanılarak grafikler çizildi ve istatistiksel değerlendirmesi yapıldı. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. $p > 0,05 = ns$ (not significant) önemsiz, $*p < 0,05 =$ (significant) önemli, $**p < 0,01 =$ (very significant) çok önemli, $***p < 0,001$ (highly significant) yüksek derecede önemli, $****p < 0,0001$ (very highly significant) çok yüksek derecede önemli olarak değerlendirildi.

Western blot metodu ile analizi gerçekleştirilen proteinlerin kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı kullanılarak semi-kantitatif olarak belirlendi. Deneyler 5'er kez tekrarlanarak hedef protein, housekeeping protein olan Beta (β)-aktin ile karşı normalize edildi. Elde edilen verilere göre Graphpad Prism 8 yazılım programı kullanılarak grafikler çizildi. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

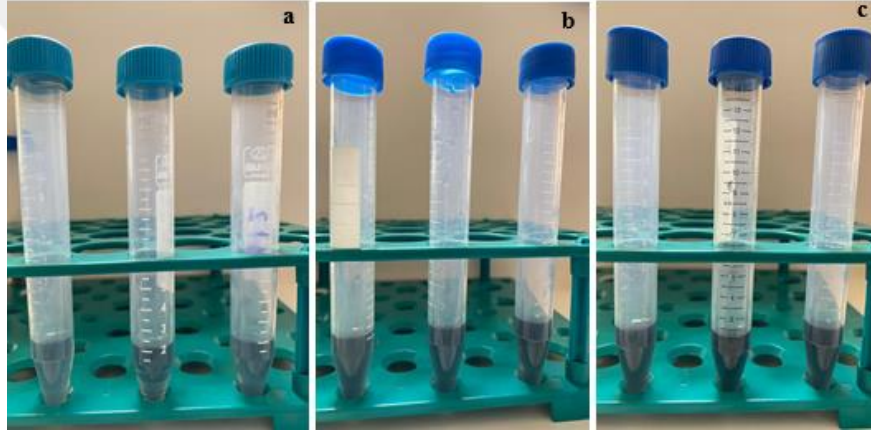
İmmünohistokimya metodu ile analizi gerçekleştirilen IL-6 proteininin H-skor yöntemiyle belirlendi. Deneyler 5'er kez tekrarlanarak PANC-1 ve HEK293 hücreler arasında ADEE uygulanmayan kontrol grubu IL-6 varlığı ve ADEE uygulanan hücrelerdeki inflamasyon düzeylerinde karşılaştırma yapıldı. Elde edilen verilere göre Graphpad Prism 8 yazılım programı kullanılarak grafikler çizildi. Unpaired t-testi yapılarak p değerleri belirlendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



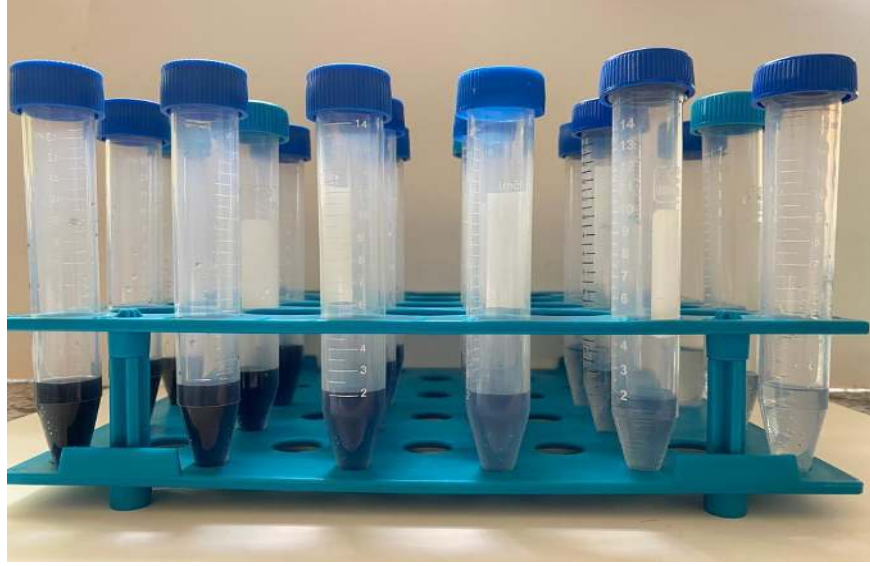
4. BULGULAR

4.1. ADEE'nin Toplam Fenolik Madde Miktar Sonuçları

Bitki örnekleri 10:100 w/v etanol ekstraksiyonu yapıldı. Evaporatörde yoğunlaştırıldı, sıvı ekstreden çözücü uzaklaştırıldı, etüvde 3-5 gün bekletildi ve kalan katı kısımlar hassas terazide tartılarak ortalamaları alındı. Ekstredeki madde miktarının 600 mg olduğu bulundu. 5 ml DMSO ile çözdürüldü. 120 mg/ml olarak konsantrasyon yoğunluğu hesaplandı. ADEE'nin toplam fenolik madde miktarı Gallik asit konsantrasyonu- absorbans kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğruya göre ($y=0,6628x+2,9305$ ve $R^2 = 0,9244$) $2,473 \pm 0,05$ µg GAE/mg ekstrakt olarak saptandı.



Resim 4.1. a: 1,25 mg/ml ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi. **b:** 2,5 mg/ml ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi. **c:** 5 mg/ ADEE'nin 2 saat sonra toplam fenolik madde miktarı etkisinin gösterilmesi



Resim 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki Gallik asit için gözlenen toplam fenolik madde miktarı deney sonuçları.

4.2. LC-MS/MS ile ADEE'nin Fenolik İçerik Analiz Sonuçları

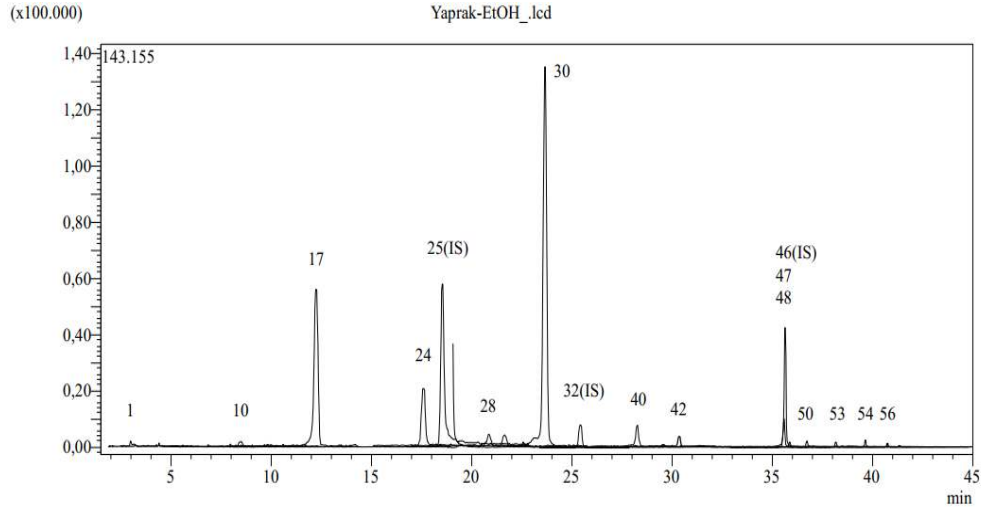
A. dioscoridis toprak üstü yaprak kısmından hazırlanan etanol ekstresinin içerisinde bulunan fenolik bileşikler ve bazı diğer bileşikler LC-MS/MS analizi ile belirlendi (**Tablo 4.1** ve **Şekil 4.1**). Sonuçlar incelendiğinde yaprak etanol ekstresinde Asetat, Amentoflavon, Apigenin, Luteolin, Naringenin, Kuersetin, Kinik asit, Kafeik asit, Sinarosid, Astrogalin, Kumarin, p-Kumarik asit, Protokatequik aldehit ve Cosmosiin ekstrede miktarı ölçülebilen maddeler olduğu gözlemlendi. En fazla değere sahip bileşiğin Sinarosid olduğu bunu sırasıyla p-Kumarik asit, Kinik asit, Kafeik asit ve Kuersetin takip ettiği görüldü. Bunun yanı sıra Akonitik asit, Gallik asit, Epigallokateşin, Protokatequik asit, Katehin, Gentisik asit, Klorojenik asit, Epigallokateşin gallat, 1,5-dikaffeoilkinik asit, 4-OH Benzoik asit, Epikatehin, Vanilik asit, Siringik asit, Vanilinin, Siringik aldehit, Daidzin, Epicatehin gallat, Picid, Ferulik asit, Sinapik asit, Rutin, Mikuelianin Salisilik asit, İzokuersitrin, Hesperidin, O-Kumarik asit, Genistin, Rosmarinik asit, Ellajik asit, Nikotiflorin, Kuersitrin, Fisetin, Daidzein, Krisin, Kemferol, Genistein ve Hesperetin ekstredeki miktarlarının hesaplanmayacak düzeyde olduğu görüldü.

Tablo 4.1: ADEE’ deki fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg)

#	Analiz	Yaprak-EtOH
1	Kinik asit	0,528
2	Fumarik asit	
3	Akonitik asit	
4	Gallik asit	
5	Epigallokateşin	
6	Protokatekuik asit	
7	Katehin	
8	Gentisik asit	
9	Klorojenik asit	
10	Protokatekuik aldehid	0,041
11	Tannik asit	
12	Epigallokateşin gallat	
13	1,5 dikaffeoilkinik asit	
14	4-OH Benzoik asit	
15	Epikatehin	
16	Vanilik asit	
17	Kafeik asit	0,457
18	Siringik asit	
19	Vanilinin	
20	Siringik aldehit	
21	Daidzin	
22	Epikatehin gallat	
23	Picid	
24	p-Kumarik asit	0,81
25	Ferulik asit- D3-IS	N.A.
26	Ferulik asit	
27	Sinapik asit	
28	Kumarin	0,027
29	Salisilik asit	
30	Sinarosid	4,948
31	Miquelianin	
32	Rutin-D3-IS	N.A.
33	Rutin	

Tablo 4.1: ADEE’ deki fenolik bileşiklerin miktarları (mg/kg) devamı

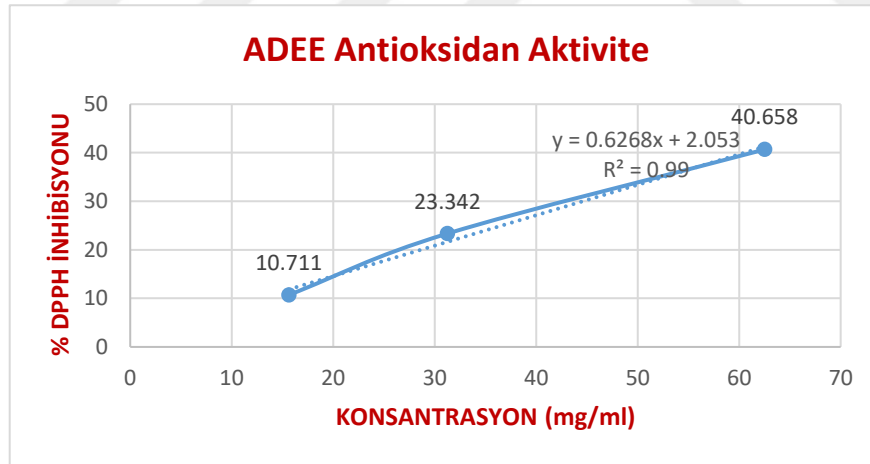
34	İzokuersetin	
35	Hesperidin	
36	O-Kumarik asit	
37	Genistin	
38	Rosmarinik asit	
39	Ellajik asit	
40	Cosmosiin	0,176
41	Kuersitrin	
42	Astragalin	0,018
43	Nikotiflorin	
44	Fisetin	
45	Daidzein	
46	Kuersitrin D3-IS	N.A.
47	Kuersetin	0,387
48	Naringenin	0,006
49	Hesperetin	
50	Luteolin	0,122
51	Genistein	
52	Kemferol	
53	Apigenin	0,004
54	Amentoflavon	0,005
55	Krisin	
56	Asetat	0,003



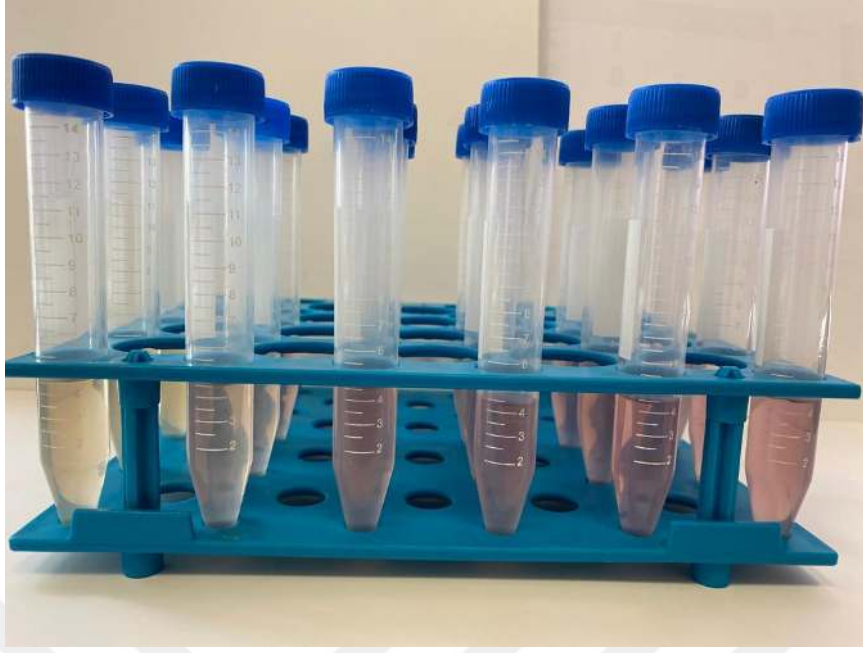
Şekil 4.1: ADEE ‘nin LC-MS/MS kromatogramı

4.3. ADEE’nin *in vitro* Antioksidan Aktivite Sonuçları

ADEE’de DPPH’nin %50’sini inhibe eden IC_{50} konsantrasyon değeri, % DPPH inhibisyon-özüt konsantrasyonu grafiğinden elde edilen doğruya göre ($y=0,6268x+2,053$ ve $R^2 = 0,99$) $IC_{50} = 76,494 \mu g /ml$ olarak saptandı. DPPH radikali giderici aktiviteye sahip olduğu görüldü.



Grafik 4.1: ADEE’nin, antioksidan aktivite bulguları



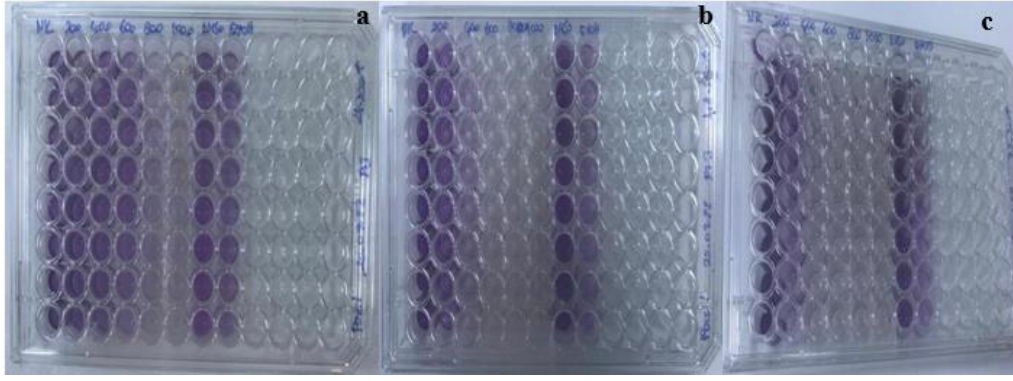
Resim 4.3: Farklı konsantrasyonlardaki ADEE' nin 1 saat sonra DPPH üzerine etkisinin gösterilmesi.

4.4. ADEE'nin Sitotoksik Etkisinin Sonuçları

ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücrelerindeki etkisi, konsantrasyon (Kontrol-200-400-600-800-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ve zaman (24 48 ve 72 saat) sürelerle bağımlı olarak hücre MTT ile değerlendirildi. PANC-1 ve HEK293 hücre hattı için IC_{50} veri sonuçları Microsoft Excel 2016 programı ile belirlendi.

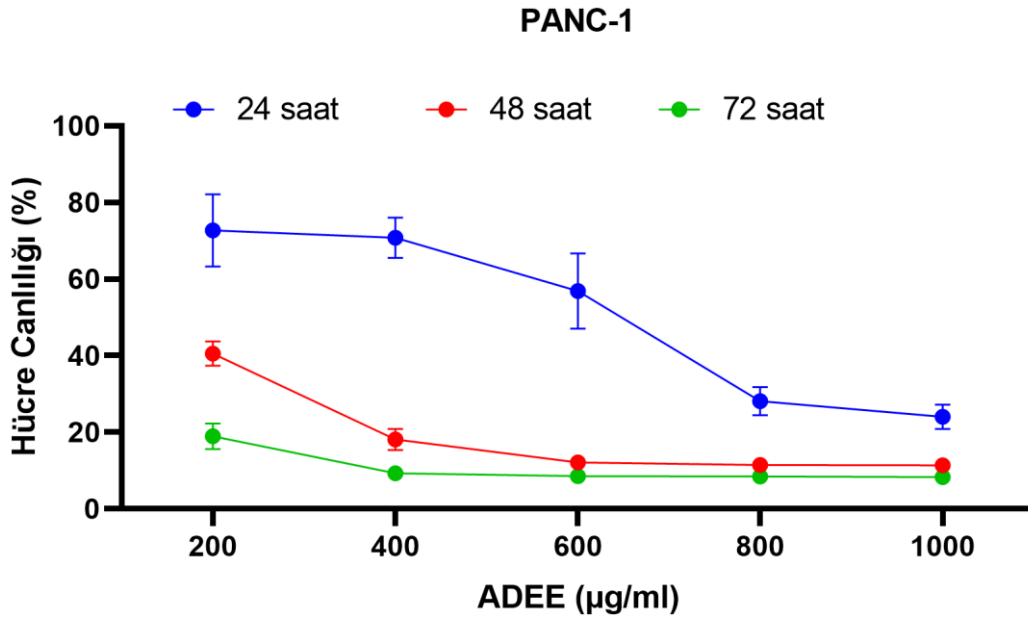
4.4.1. ADEE'nin PANC-1 pankreas kanser hücrelerine sitotoksik etkisi

ADEE, PANC-1 hücre hattı üzerinde 24 saatlik uygulama sonrasında yüksek dozlarda ($>500 \mu\text{g}/\text{ml}$) antiproliferatif etki gösterdi. 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (**Resim 4.4, Grafik 4.2**).



Resim 4.4: MTT Testi (PANC-1) **a.** PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **b.** PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **c.** PANC-1 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 µg /ml ADEE'nin 72 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

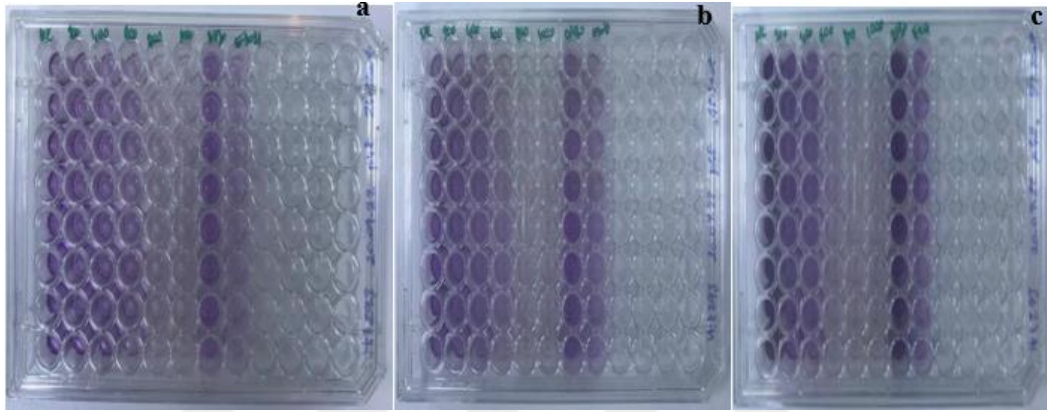
PANC-1 hücre hattında ADEE'nin 24 saat süreli inkübasyonu sonrası IC_{50} değeri 616,37 µg /ml, 48. saatteki IC_{50} değeri 211,4 µg /ml ve 72. saatteki IC_{50} değeri 156,9 µg /ml olarak belirlendi (**Grafik 4.2**).



Grafik 4.2: PANC-1 hücre hattında ADEE'nin, canlılık üzerine etkisi

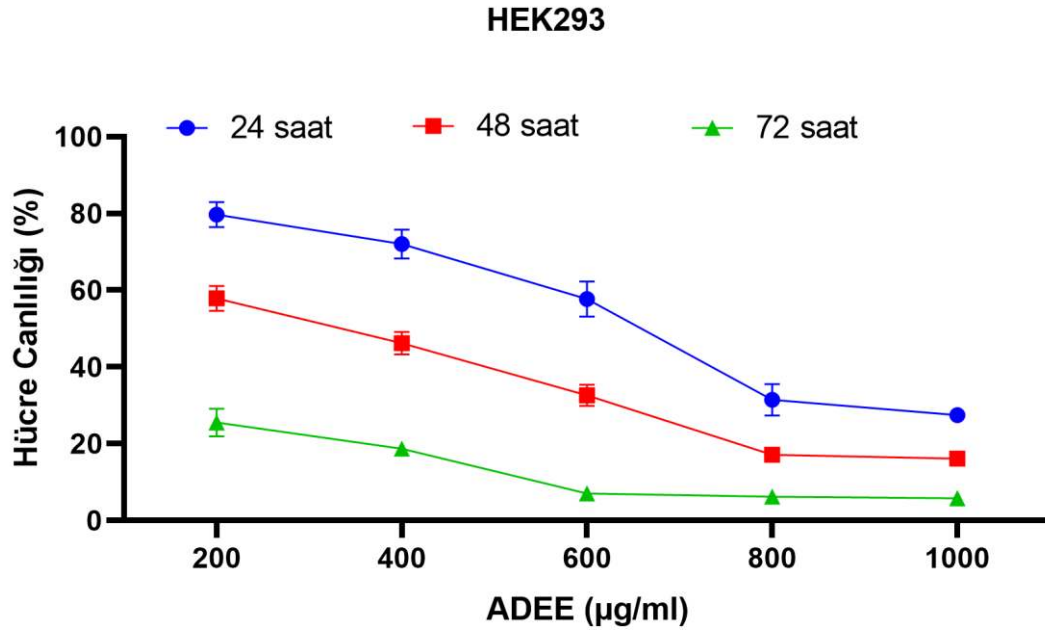
4.4.2.ADEE'nin HEK293 insan embriyonik böbrek hücrelerine sitotoksik etkisi

ADEE, HEK293 hücre hattında 24 saat süreyle uygulama sonrasında yüksek dozlarda ($>500 \mu\text{g/ml}$) antiproliferatif etki gösterdi. 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise daha düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdi (**Resim 4.5, Grafik 4.3**).



Resim 4.5: MTT Testi (HEK293) **a.** HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 $\mu\text{g /ml}$ ADEE'nin 24 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **b.** HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 $\mu\text{g /ml}$ ADEE'nin 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi. **c.** HEK293 hücre hattında Kontrol-200-400-600-800-1000 $\mu\text{g /ml}$ ADEE'nin 48 saat sonra canlılık üzerine etkisinin MTT testi ile gösterilmesi.

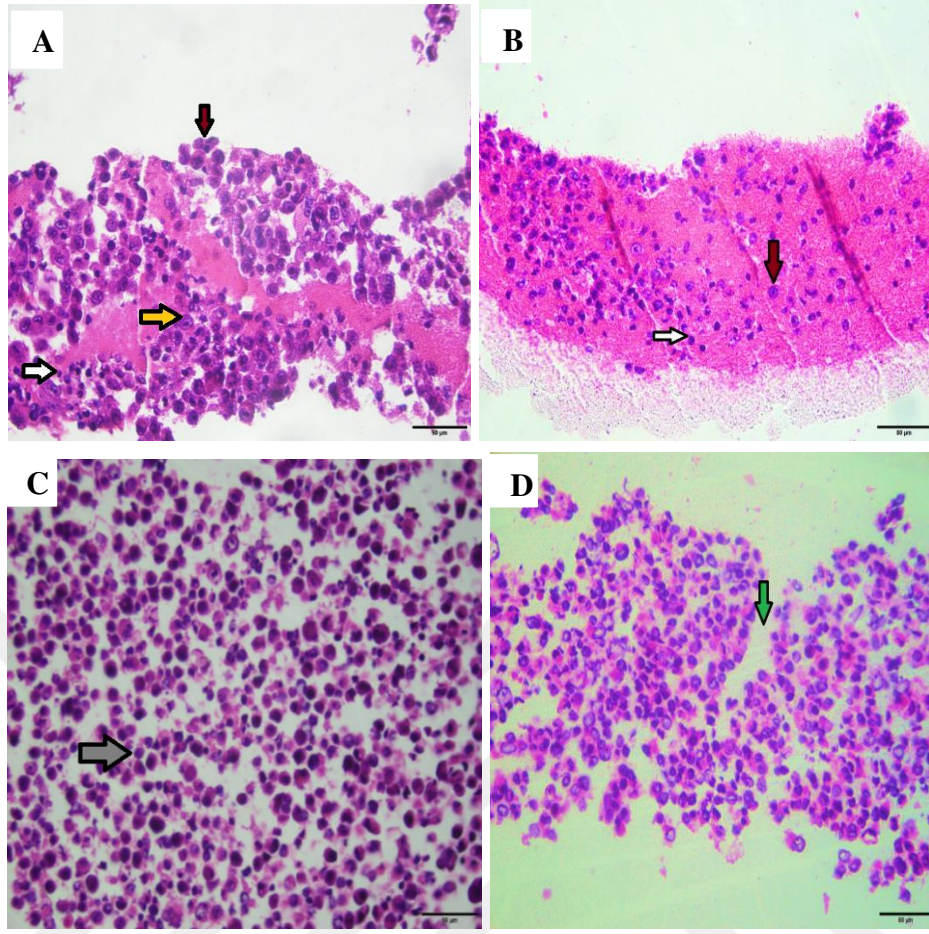
HEK293 hücre hattında ADEE'nin 24 saatlik inkübasyonu sonrası IC_{50} değeri $653,55 \mu\text{g /ml}$, 48. saatteki IC_{50} değeri $437,3 \mu\text{g /ml}$ ve 72. saatteki IC_{50} değeri $181,5 \mu\text{g /ml}$ olarak belirlendi (**Grafik 4.3**).



Grafik 4.3. HEK293 hücre hattında ADEE'nin, canlılık üzerine etkisi

4.5. Işık Mikroskobu Bulguları

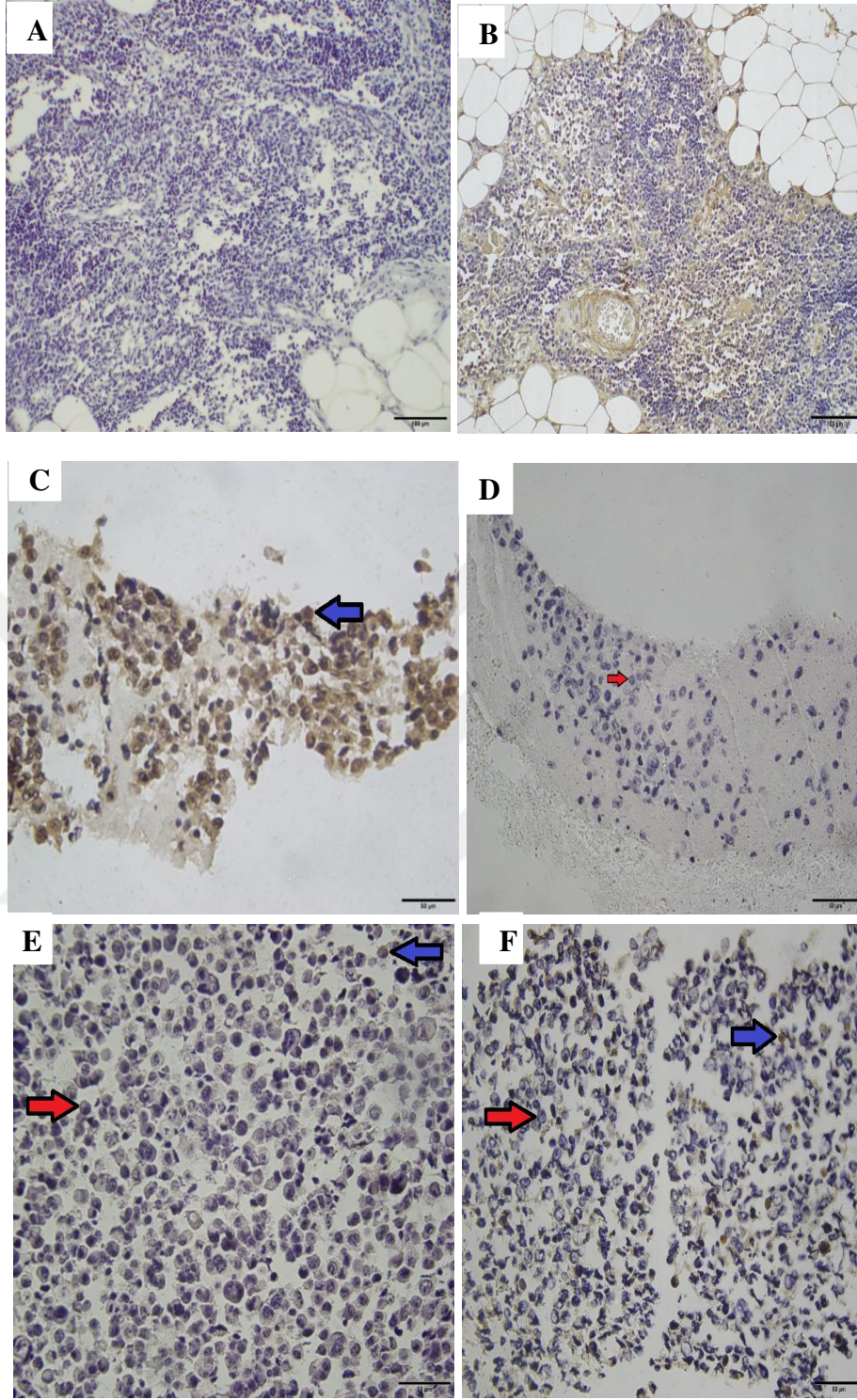
Çalışmada kullanılan PANC-1 ve HEK293 hücrelerinin kanser ve normal hücrelerinin histolojik yapılarını değerlendirmek için (parafin bloklardan elde edilen kesitlerde) H-E boyama yöntemi kullanılmıştır (**Resim 4.6**). H-E boyama yöntemi ile PANC-1 hücreleri ile HEK293 hücreleri arasındaki farklılıkları gösteren histolojik değişiklikler incelenmiştir. Kontrol grubu HEK293 olan Grup 3'e kıyasla Kontrol grubu PANC-1 olan Grup 1'de hücreler çok çekirdekçikli (↓), çekirdek boyutları küçük (⇒) ve büyüktür (⇒), genellikle düzensiz yapı gözlemlendi. ADEE uygulanan gruplarda (Grup 2 ve Grup 4) hücre azalması gözlemlendi (⇒). Grup 3'te normal hücreler gözlemlendi (⇒).



Resim 4.6: **A:** PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'in histolojik görünümü (H-E, x400). **B:** PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'nin histolojik görünümü (H-E, x400). **C:** HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'ün histolojik görünümü (H-E, x400). **D:** HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'ün histolojik görünümü (H-E, x400).

4.6.İmmünohistokimya Bulguları

İmmünohistokimyasal incelemede negatif kontrol timus doku boyamasında PBS olarak kullanılırken pozitif kontrol timus dokusu IL-6 antikorunu kullanıldı (**Resim 4.7: A ve B**). İmmünohistokimyasal incelemede PANC-1 48 saat ADEE uygulama sonrasında (Grup 2) IL-6 immünoreaktivitesinin PANC-1 kontrol grubundaki (Grup 1) artan sitokin seviyesinin (➡) azalmasıyla anti-inflamatuar etkisi olduğu saptandı (➡) (**Resim 4.7: C ve D**). HEK293 ADEE uygulama grubu olan Grup 4'te, HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'e kıyasla hücre sayısında azalma gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmedi (**Resim 4.7: E ve F**).



Resim 4.7: **A:** IL-6 antikorunun negatif kontrol boyaması (Timus, x200). **B:** IL-6 antikorunun pozitif kontrol boyaması (Timus, x200). **C:** PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1 boyaması (IL-6, x400). **D:** PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2 boyaması (IL-6, x400). **E:** HEK293 kontrol grubu olan Grup 3 boyaması (IL-6, x400). **F:** HEK293 uygulama grubu olan Grup 4 boyaması (IL-6, x400).

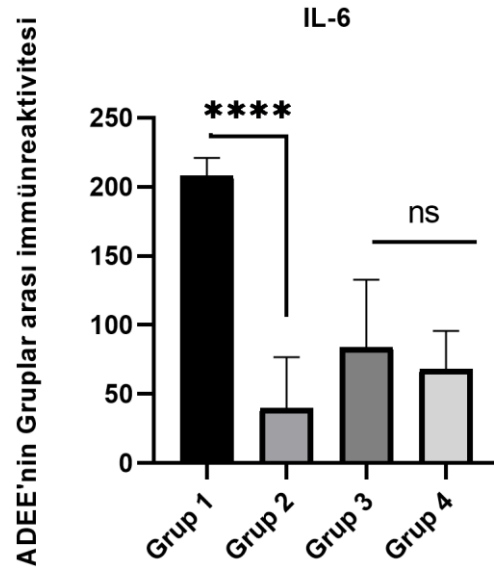
ADEE'nin gruplar arası belirlenen, IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda PANC-1 (Grup 1- Grup 2) ve HEK293 (Grup 3- Grup 4) hücrelerinin kontrol grupları olan Grup 1- Grup 3'e kıyasla IL-6 immünreaktivite ortalama ve standart sapmaları karşılaştırılması gösterildi (**Tablo 4.2**). Gruplar arası (Grup 1- Grup 3) IL-6 immünreaktivite seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulundu (P=0,006). Ekstrakt diğer etkilere bağımsız değerlendirildiğinde anti-enflamatuar etkisi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Grup 2, P=0,001). Grup ve ekstrakt arasında etkileşim etkisi anlamlı bulundu (Grup 1- Grup 2 ve Grup 3- Grup 4, P=0,001). Grup ve ekstrakt faktörleri bir araya geldiğinde IL-6 immünreaktivite etkisi %81 oranında açıklamaktadır. Kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (P<0,05).

Tablo 4.2: IL-6 antikoru ADEE'nin gruplar arası immünreaktivite ortalama ve standart sapmaları

Sitokin	Gruplar	Ortalama ± Standart Sapma
IL-6	Grup 1	208 ± 13,04 ^{c*}
	Grup 2	40 ± 36,74 ^{c*}
	Grup 3	84 ± 48,79 ^{abd*}
	Grup 4	68 ± 27,75 ^{c*}

*: P<0,05, **a**: PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'e, **b**: PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'e göre, **c**: HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'e göre, **d**: HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'e göre anlamlı.

Ayrıca, Graphpad Prism 8 yazılım programı kullanılarak grafikler çizildi ADEE'nin, gruplar arası belirlenen 210 µg/ml ve 430 µg/ml IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol gruplarına kıyasla IL-6 immünreaktivitesi gruplar arası karşılaştırması gösterildi (****P=0,0001). Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (ns, P=0,5416) (**Şekil 4.2**).

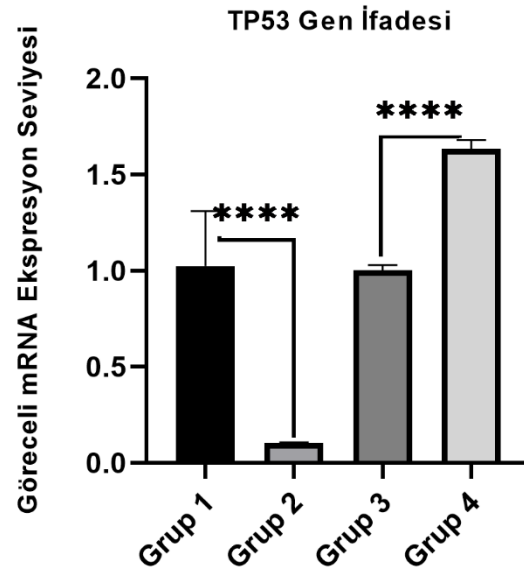


Şekil 4.2: IL-6 antikorunun ADEE'nin gruplar arası immünreaktivite etkisi.

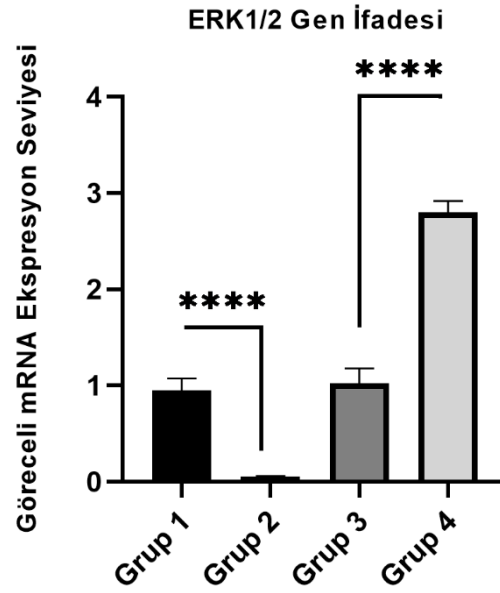
4.7.Kantitatif Gen Ekspresyonu (Real-Time PCR) Sonuçları

4.7.1. ADEE'nin PANC-1 ve HEK293 hücre hattında hedef genlerin ifade düzeylerine etkisi

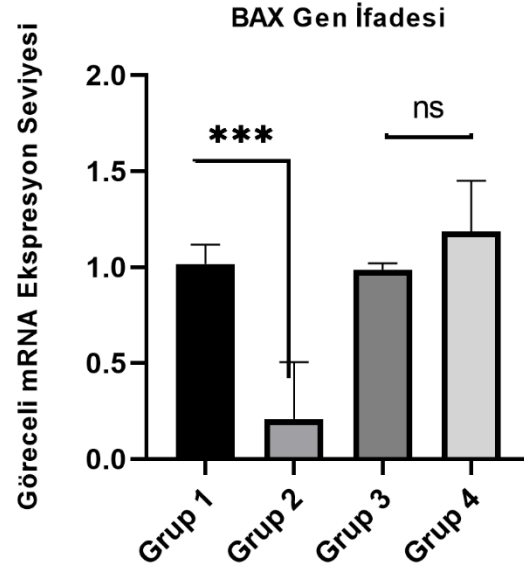
ADEE'nin, PANC-1 hücre hattına belirlenen 210 µg/ml IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubu olan Grup 1'e kıyasla bütün genlerde çok önemli derecede azalış tespit edildi. Gen ifadesindeki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. TP53, ERK1/2, CASP3, HMGB1, MYC ve MTOR (****, P=0.0001). (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.6 Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). BAX ve BCL-2 (***, P=0,0004 ve ***, P=0.003). (Şekil 4.5 ve Şekil 4.7). ADEE'nin, HEK293 hücre hattına belirlenen 430 µg/ml IC₅₀ dozunun 48 saat uygulanması sonucunda kontrol grubu olan Grup 3'e kıyasla TP53, ERK1/2, CASP3, HMGB1 ve MTOR gen ifadesinde önemli derecede artış tespit edildi. CASP3, ERK1/2, HMGB1, TP53 ve MTOR genlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (****, P=0.0001) (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.6 Şekil 4.8 ve Şekil 4.10). BAX, MYC ve BCL-2 genlerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamsız bulundu. (ns, P=0,1384, P=0,0550 ve P= 0,3909). (Şekil 4.5, Şekil 4.9 ve Şekil 4.7).



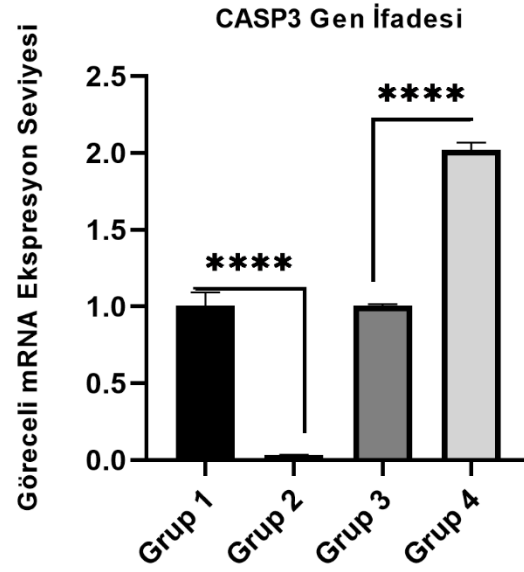
Şekil 4.3: ADEE'nin, gruplar arasında TP53 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



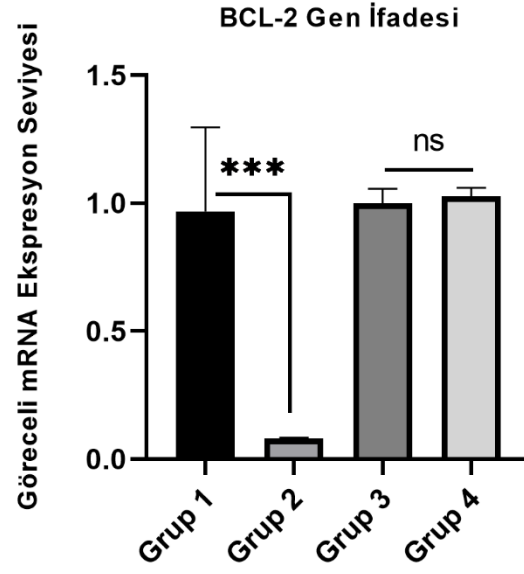
Şekil 4.4: ADEE'nin, gruplar arasında ERK1/2 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



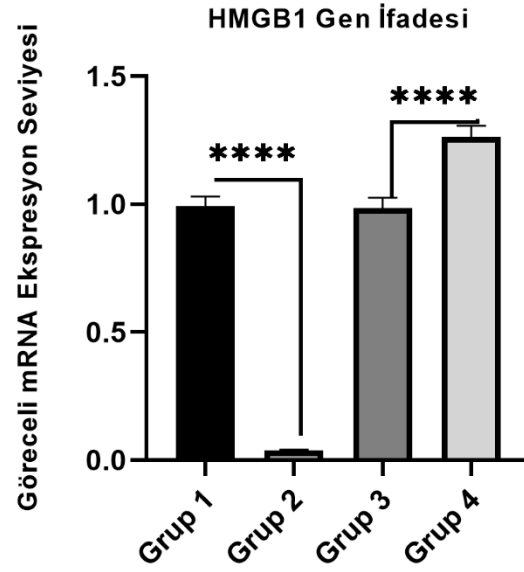
Şekil 4.5: ADEE'nin, gruplar arasında BAX genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



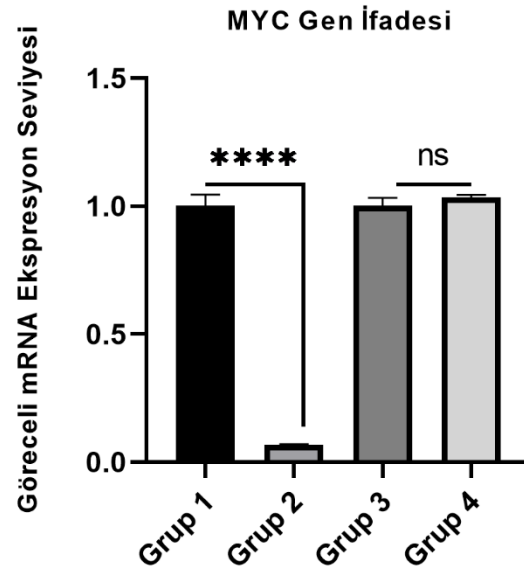
Şekil 4.6: ADEE'nin, gruplar arasında CASP3 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



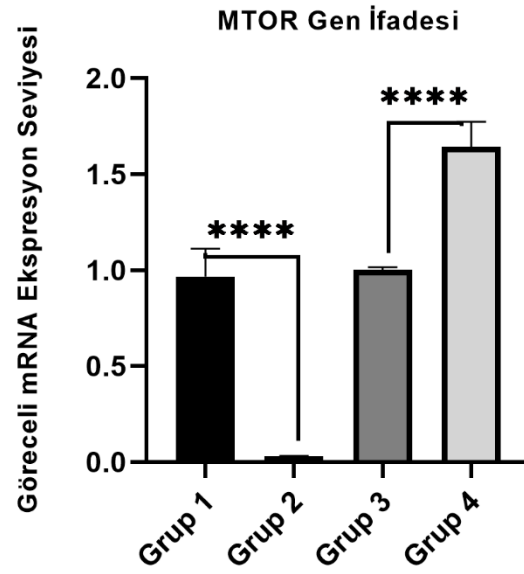
Şekil 4.7: ADEE'nin, gruplar arasında BCL-2 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



Şekil 4.8: ADEE'nin, gruplar arasında HMGB1 genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



Şekil 4.9: ADEE'nin, gruplar arasında MYC genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.



Şekil 4.10: ADEE'nin, gruplar arasında MTOR genlerinin qPCR ile kantitatif ekspresyon profillerinin belirlenmesi.

Grup ve ekstrakt diğer etkilere bağımsız değerlendirildiğinde TP53 geninin ekspresyon seviyeleri PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'in PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'ün, HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,042$). MYC geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$), MTOR geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,004$). HMGB1 geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). ERK1/2 geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Apoptotik CASP3 geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,355$). BAX geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,004$). BCL-2 geninin Grup 1'in ekspresyon seviyeleri Grup 2'e göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P=0,001$). Grup 3'ün Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı etkisi bulundu ($P=0,001$). Ayrıca grup ve ekstrakt arasında interaksiyon etkisi de anlamlı bulundu ($P=0,001$).

Grup ve ekstrakt faktörleri bir araya geldiğinde TP53 %94, MYC %99, MTOR %97, HMGB1 %99, CASP3 %99, BAX %80 BCL-2 %87 ve ERK1/2 %98 oranında açıklamaktadır. Ayrıca grup ve ekstrakt faktörlerinin bütün p değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P=0,001$) (**Tablo 4.3**).

Tablo 4.3: 8 genin ADEE'nin farklı gruplarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri ortalamaları ve standart sapmaları

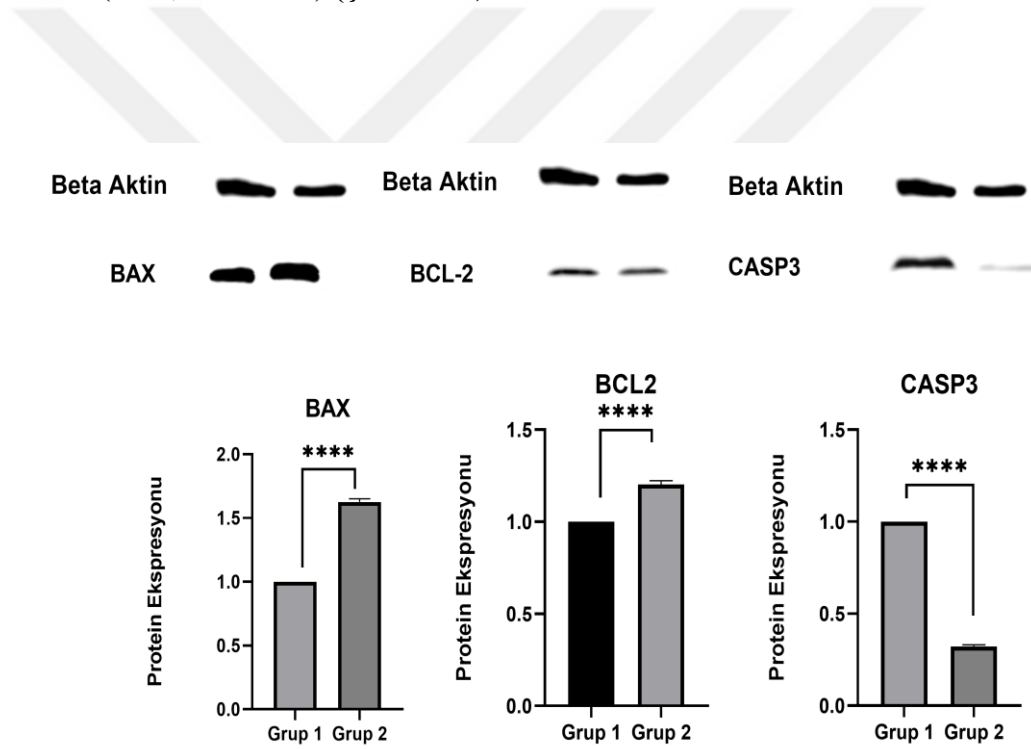
Genler	Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
TP53	Grup 1	$1,02 \pm 0,29^{bd*}$
	Grup 2	$0,11 \pm 0^{acd*}$
	Grup 3	$1 \pm 0,03^{bd*}$
	Grup 4	$1,63 \pm 0,05^{abc*}$
MYC	Grup 1	$1 \pm 0,04^d*$
	Grup 2	$0,07 \pm 0^d*$
	Grup 3	$1 \pm 0,03^d*$
	Grup 4	$1,03 \pm 0,01^{abc*}$
MTOR	Grup 1	$0,97 \pm 0,14^{bd*}$
	Grup 2	$0,03 \pm 0^{acd*}$
	Grup 3	$1 \pm 0,01^{bd*}$
	Grup 4	$1,64 \pm 0,13^{abc*}$
HMGB1	Grup 1	$0,99 \pm 0,04^{bd*}$
	Grup 2	$0,04 \pm 0^{acd*}$
	Grup 3	$0,99 \pm 0,04^{bd*}$
	Grup 4	$1,26 \pm 0,04^{abc*}$
CASP3	Grup 1	$1 \pm 0,09^{bd*}$
	Grup 2	$0,03 \pm 0^{acd*}$
	Grup 3	$1,01 \pm 0,01^{bd*}$
	Grup 4	$2,02 \pm 0,05^{abc*}$
BCL-2	Grup 1	$0,97 \pm 0,33^d*$
	Grup 2	$0,08 \pm 0^d*$
	Grup 3	$1 \pm 0,06^d*$
	Grup 4	$1,03 \pm 0,03^{abc*}$
BAX	Grup 1	$1,02 \pm 0,1^d*$
	Grup 2	$0,21 \pm 0,3^d*$
	Grup 3	$0,99 \pm 0,03^d*$
	Grup 4	$1,19 \pm 0,27^{abc*}$
ERK1/2	Grup 1	$0,95 \pm 0,13^{bd*}$
	Grup 2	$0,06 \pm 0^{acd*}$
	Grup 3	$1,03 \pm 0,15^{bd*}$
	Grup 4	$2,8 \pm 0,11^{abc*}$

*: $P < 0,05$, **a**: PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'e, **b**: PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'e göre, **c**: HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'e göre, **d**: HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'e göre anlamlı.

4.8.Semi- Kantitatif Protein Ekspresyon Tayin (Western blot) Sonuçları

4.8.1. ADEE'nin PANC-1 kanser hücrelerindeki etkisinin Western blot ile analizi

ADEE'nin, PANC-1 hücre hattı üzerine belirlenen IC₅₀ dozunun uygulanması sonucunda apoptotik CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin nasıl etkilendiği gözlemlendi. Beta Aktin ile normalize edildiğinde BAX proteininin ve BCL-2 proteininin PANC-1'in kontrol grubu olan Grup 1'e kıyasla ifade seviyesinin PANC-1'in uygulama grubu olan Grup 2'de arttığı, CASP3 proteininin ifade seviyesi ise Grup 2'de azaldığı gözlemlendi. BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,0001 ****) (Şekil 4.11).

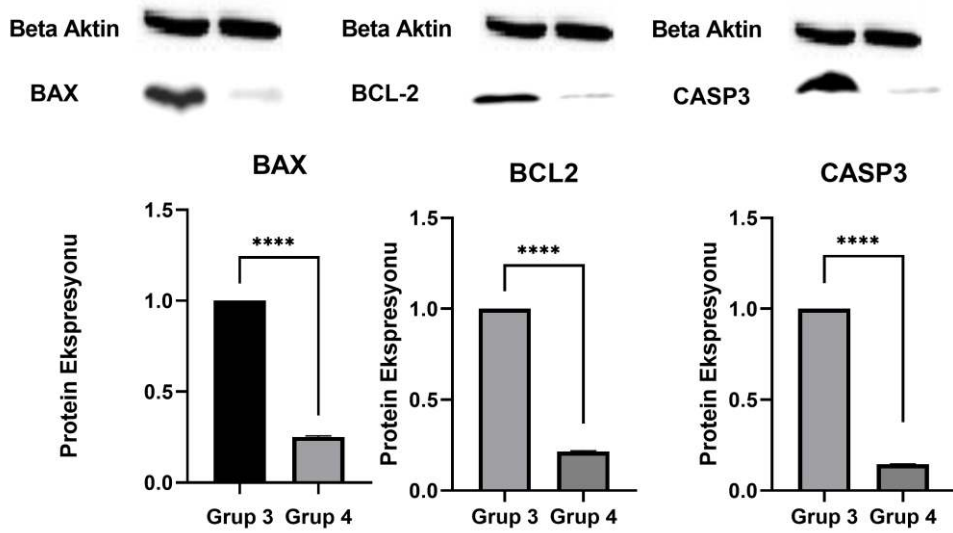


Şekil 4.11: Semi-kantitatif olarak ADEE'nin belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda PANC-1 hücrelerinde (Grup 1 ve Grup 2) protein ekspresyonuna etkisi.

4.8.2.ADEE'nin HEK293 hücrelerindeki etkisinin Western blot ile analizi

ADEE'nin, HEK293 hücre hattı üzerine belirlenen IC₅₀ dozunun uygulanması sonucunda apoptotik CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin nasıl etkilendiği gözlemlendi.

Beta Aktin ile normalize edildiğinde HEK293'ün kontrol grubu olan Grup 3'e kıyasla BAX proteini, BCL-2 proteini ve CASP3 proteininin ifade seviyesi HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'te azaldığı gözlemlendi. BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P=0,0001 ****) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Semi-kantitatif olarak ADEE'nin belirlenen IC₅₀ konsantrasyonunda HEK293 hücrelerinde (Grup 3 ve Grup 4) protein ekspresyonuna etkisi.

Grup ve Ekstrakt diğer etkilerden bağımsız değerlendirildiğinde Beta aktin, apoptotik CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin üzerine anlamlı etkisi bulundu (P=0,001). Buna karşın, grup ve ekstrakt arasında interaksiyon etkisi anlamlı bulundu (P=0,001).

Grup ve ekstrakt faktörleri bir araya geldiğinde Beta aktin değişimi %93, CASP3 %99, BAX %99 ve BCL-2 %99 oranında açıklamaktadır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: ADEE'nin farklı gruplarda protein ekspresyon değerleri ortalamaları ve standart sapmaları

Proteinler	Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart Sapma
Beta aktin	Grup 1	61109,8 $\pm$ 2330,79 ^{bcd*}
	Grup 2	39391,2 $\pm$ 1856,63 ^{acd*}
	Grup 3	61499 $\pm$ 3329,41 ^{abd*}
	Grup 4	60370,6 $\pm$ 3165,61 ^{abc*}
BAX	Grup 1	64544,2 $\pm$ 4136,63 ^{bcd*}
	Grup 2	78451 $\pm$ 1484,31 ^{acd*}
	Grup 3	70567 $\pm$ 1553,15 ^{abd*}
	Grup 4	5412,6 $\pm$ 932,86 ^{abc*}
BCL2	Grup 1	49961,2 $\pm$ 1893,53 ^{bcd*}
	Grup 2	34544 $\pm$ 2932,94 ^{acd*}
	Grup 3	64394,4 $\pm$ 2001,53 ^{abd*}
	Grup 4	5571,4 $\pm$ 1228,76 ^{abc*}
CASP3	Grup 1	64325 $\pm$ 1848,41 ^{bcd*}
	Grup 2	6874,8 $\pm$ 1121,89 ^{acd*}
	Grup 3	51805 $\pm$ 2554,07 ^{abd*}
	Grup 4	3604,6 $\pm$ 1432,09 ^{abc*}

*: P<0,05, **a**: PANC-1 kontrol grubu olan Grup 1'e, **b**: PANC-1 uygulama grubu olan Grup 2'e göre, **c**: HEK293 kontrol grubu olan Grup 3'e göre, **d**: HEK293 uygulama grubu olan Grup 4'e göre anlamlı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pankreas kanserinin taranması ve erken teşhisi, prognozunun iyileştirilmesinde çok önemli olduğu için tanı ve tarama yöntemleri her geçen gün geliştirilmektedir. Tedavide de yeni stratejiler geliştirmek için, pankreas kanserinin moleküler özelliklerinin daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Geleneksel doğal ilaçlar, kanser ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde uzun süredir önemli bir rol oynamaktadır. Sentetik ilaçların yüksek maliyeti ve istenmeyen yan etkileri, kabul edilmiş tıbbi ilaçlara ek olarak bitki ekstraktlarının da kullanımını arttırmıştır. Böylece bu ekstraktların malign hücreler üzerindeki biyolojik etkilerinin belirlenmesi konusuna ilgi duyulmuştur. *A. dioscoridis*'in geleneksel tedavi yöntemlerinde sıklıkla kullanılması, bu bitki ile ilgili bilimsel çalışmaların popülaritesini her geçen gün artırmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda bu bitkinin ekstraktlarında 15 çeşit antioksidan madde analiz edilmiştir [8,10,125-127]. Bu analizler sonucunda flavonoid ve fenolik içeriği bilinen *A. dioscoridis*'in anti-kanser aktivitesi; anti-migratif [128], anti-lipoperoksidasyon [129], antimikrobiyal [130], anti-bakteriyel [131] anti-inflamatuar [132] etkisine ve enzim inhibisyon [133] kapasitesine, bağlı olduğu saptanmıştır.

Literatür taraması sonucu *A. dioscoridis* ile yapılmış çalışmaların yetersiz olması sebebiyle, bu tez çalışmasında PANC-1 hücre hatlarında *A. dioscoridis*'in sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu anlamda ADEE uygulaması sonrası aktive ve inhibe olan farklı sinyal yolları, mRNA ve protein seviyesinde incelenmiştir.

IC₅₀ dozunda ADEE uygulamasının olası anti-kanser etkileri; sinyal yolağının ana hattı olan ERK1/2, MYC, TP53, MTOR ve HMGB1 genleri ve apoptozis yolağında görevli CASP3, BCL-2 ve BAX genlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür.

ADEE'nin pankreas kanseri hücreleri üzerine olan apoptotik etkisi gösteren CASP3, BAX ve BCL-2 proteinlerinin Western-blot analiziyle ölçülmüştür. Ek olarak, anti-enflamatuar etkisinin tespiti için IL-6'nın immünoreaktivitesi, immünositokimya analiziyle belirlenmiştir.

İlk aşamada *A. dioscoridis*'deki toplam fenolik madde içeriği araştırılmış ve 3 farklı konsantrasyonda ADEE'nin fenolik madde içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca *A. dioscoridis* toprak üstü yaprak kısmından hazırlanan etanol ekstresinin içerisinde bulunan fenolik bileşikler LC-MS/MS analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en fazla değere sahip bileşiğin Sinarosid olduğu bunu sırasıyla Kinik asit, Kafeik asit ve Kuersetin takip ettiği görülmüştür. Bunun dışında çalışmamızda antioksidan tayini için uygulanan DPPH metodu sonucunda hazırlanan ADEE'de, DPPH'nin %50'sini inhibe eden IC₅₀ konsantrasyon değeri saptanmıştır. DPPH radikali giderici aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. *A. dioscoridis* yaprak ekstraktlarının antioksidan aktivitelere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Yapılan farklı çalışmalarda etanol ile çözünmüş *A. dioscoridis* tedavisi diğer ekstraksiyon uygulamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [8,131]. Bunun nedeni flavonoidlerin ve fenolik maddelerin OH⁻ grupları daha yüksek polariteye sahip olduklarından, polaritesi yüksek çözücülerde daha fazla çözünür olmalarıdır. Etanol, DMSO'dan daha yüksek polariteye sahiptir.

Başka bir çalışmada *Arum alaestinum*'un metanolik, kloroform ve etil asetat ekstraktlarının fenolik ve flavonoid içerikleri, antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. En yüksek fenolik (mg gallik asit eşdeğeri/g kuru ekstrakt) ve flavonoid (mg quercetin eşdeğeri/g kuru ekstrakt) içerikleri metanolik ekstratta gözlenmiş, bunu kloroform izlemiştir [134].

DPPH'nin temizleme aktiviteleri, çeşitli hastalıklarda yer alan oksidatif strese karşı antioksidan koruyucu role sahip olduğu bildirilmiştir. *A. maculatum* yaprak özlerinin, serbest radikalleri süpürücü bileşikler içerdiğini ve bu nedenle oksidasyonun neden olduğu farklı patolojik hasarlar için terapötik uygulamalarını açıklamaktadır. *A. maculatum* ekstraktı ile yapılan tedavinin, kontrol kültürlerine kıyasla hücre büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir [135].

A. palaestinum'un kapsamlı fitokimyasal analizi incelenmiş, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisinin doğru ve kabul edilebilir verileri birlikte kullanarak *A. palaestinum*'da toplam 180 metabolit geçici olarak tanımlanmıştır.

A. palaestinum ekstraktlarının antioksidan kapasitesi incelenmiş ve bu bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Ürdün popülasyonu tarafından geleneksel anti-diyabetik ajanlar olarak kullanımları ile uyumlu radikal süpürmedeki potansiyel rolü gösterilmiştir [136].

A. maculatum ile ilgili bir diğer çalışmada metanolik ekstraktının oral olarak uygulanması fare karaciğerinde farklı histolojik ve antioksidan aktiviteler göstermiştir [137].

Arum palaestinum'un bulunduğu 6 bitkinin etanolik özleri ile araştırılan çalışmada antioksidan ve antikanser aktiviteleri açısından test edilmiş, DPPH analizleriyle farklı antioksidan aktivite aralıkları göstermiştir [138].

Literatürdeki çalışılan *Arum* türleri ve kendi sonuçlarımız hücre ölümüne karşı aktif ajan olarak görev yapan flavonoidler, glikozitler, polifenoller ve saponinlerin varlığından kaynaklanabilir. Söz konusu güçlü antioksidan etkinin meydana gelmesinde bitki ekstraktlarının içerdiği polifenollerin ve diğer sekonder metabolitlerin rol aldığı düşünülebilir.

Çalışmamızda, PANC-1 (Grup 1/Grup 2) ve HEK293 (Grup 3/Grup 4) hücre hatlarında kontrol grupları olan Grup 1 ve Grup 3 arasında enflamatuvar sitokin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. ADEE uygulanan Grup 2- Grup 4 sitokin seviyeleri arasında Grup 2'de anti-enflamatuvar etki açısından anlamlı fark gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla ekstraktlı gruplar arasında da (Grup 1-Grup 2 / Grup 3-Grup 4) istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir.

2022'de asetik asit ile ülseratif kolit oluşturulan hayvan modelinde *Arum dioscoridis* bitki ekstraktı uygulamasının antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Ülseratif kolitli sıçanların kolon biyopsilerinin, enflamatuvar sitokin seviyelerini arttırdığı ve anti-enflamatuvar sitokin seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Tedavide etanolik çözücü ile verilen *A. dioscoridis*'in ve profilaksi için DMSO'lu çözücü ile verilen *A. dioscoridis*'in kolon inflamasyonunu önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Bu nedenle *A. dioscoridis* ülseratif kolon hasarına karşı koruyucu rol oynayabildiği düşünülmektedir. Sonuç olarak oral tedavi (etanolik solvent) ve profilaksi grubunda biyokimyasal, mikroskobik ve makroskobik iyileşme sağlanmıştır.

A. dioscoridis'in hasarlı kolon mukozasında hücre bütünlüğünü koruyarak lipid peroksidasyonunu azalttığını (anti-lipoperoksidasyon) desteklemektedir. Bu çalışma, *A. dioscoridis*'in ratlarda oluşturulan kolit modelinde olumlu etkileri olduğunu ve özellikle etanol ile çözdürülen ve profilaksi amaçlı kullanılan gruplarda barsak iltihabını önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir[132].

Bir diğer çalışmada isoproterenol ile kalp dokusunda oluşturulan hasarı *Arum* 'un alt türü olan *A. orientale* (160 mg/kg) uygulanmasıyla kardiyak nekrozun, nötrofil infiltrasyonunun ve miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Böylece *A. orientale*'nin hidroalkolik ekstraktı ile tedavi sonrası bu bitkinin, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileriyle miyokard enfarktüsünde kardiyoprotektif olabildiği düşünülmüştür [139].

A. maculatum'dan izole edilen monokot lektinin bileşiğiyle yapılan bir çalışmada, proinflamatuvar aktivitesinin nötrofil göçünü arttırdığı bildirilmiştir [140]. TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β) ve IL-6 gibi sitokinlerin uyarılması yoluyla lokal veya sistemik inflamasyonu başlatır. [141]. IL-1 β , hem lokal hem de sistemik inflamasyon belirtilerini indükler. [142]. Bitkisel ilaçların kullanılması, etkili bir iyileştirme gücü sağlamak için sinerjistik olarak hareket edebilen birkaç biyolojik aktif bileşiğin ortaya çıkması nedeniyle avantajlıdır. Öte yandan, toksik bileşenlerin olası varlığı nedeniyle zararlı da olabilir [143].

Araceae familyasına ait olan *Arum* cinsinin Orta Doğu, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika'da uzun bir geleneksel tıbbi kullanım geçmişi vardır. Halk arasında *A. dioscorides* ve *A. palaestinum* gibi *Arum* türleri kanser tedavisi amacıyla kullanılmaktadır [134,144-146]. *A. palaestinum*'un farklı insan kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesi, Farid ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada önemli anti-proliferatif aktivite rapor edilmiştir [147].

Yapmış olduğumuz çalışmada ADEE'nin, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak PANC-1 ve HEK293 canlılığına olan etkisi belirlenmiştir. MTT testi sonuçlarına göre ADEE'nin uygulama yapılan HEK293 ve PANC-1 hücrelerinde anti-proliferatif etkili olduğu gözlenmiştir.

2017’de CFPAC-1 Pankreas Karsinoma Hücre Hattında Tozasertib ve *A. dioscoridis* sitotoksitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada 48 saat ADEE uygulaması sonrasında xCELLigence E-Plate 16 sistemi ile Özü IC₅₀ değeri 48 saat için 540 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu dozun hücreleri önemli derecede inhibe ettiği görülmüştür [132].

Çalışmamızda HEK293 ekstrakt grubu olan Grup 3’te de antiproliferatif etkinin görülmüş olması, bu bitkinin toksik bileşenlerin olası varlığını düşündürmektedir. Mekanizmanın aydınlatılması için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda ADEE’nin apoptotik etkisi için pankreas kanseri hücrelerinde BAX ve BCL-2 seviyeleri qRT- PCR ile mRNA ve Western blot ile protein düzeyinde kontrol edilmiştir. qRT- PCR sonuçlarına göre PANC-1 hücrelerinde proapoptotik BAX geninin mRNA ekspresyonu anlamlı bir azalma göstermiştir. Western blot sonuçlarında ise PANC-1 hücrelerinde BAX protein miktarının önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, PANC-1 kontrol grubu hücrelerinde BAX mRNA ekspresyonunun post transkripsiyonel olarak baskılanmış olduğunu göstermektedir.

Yine HEK293 hücrelerinde ise ADEE uygulaması sonrası qPCR sonuçlarına göre BAX’ın mRNA ekspresyonunun değişmediği, Western blot sonuçlarına göre BAX protein seviyesinin azaldığı görülmüştür. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun, mRNA ve protein yarılanma ömürleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

PANC-1 hücrelerinde ADEE uygulaması sonrası anti-apoptotik molekül olan BCL-2 mRNA seviyelerinde azalış gözlenirken, HEK293 hücrelerinde ise qPCR sonuçlarına göre BCL-2 mRNA ekspresyonunun değişmediği gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattında da protein düzeyinde önemli derecede azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar da bize ADEE’nin, pankreas kanseri hücrelerini BCL-2 protein ekspresyonunun baskılanması yoluyla apoptozise yönlendirebildiğini düşündürmektedir.

ADEE’nin apoptotik etkileri, BAX ve BCL-2’ye ek olarak CASP3 ekspresyon seviyeleri kontrol edilerek belirlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde ADEE uygulaması sonrası mRNA ve protein düzeyinde azalma gözlenmiştir. Bu ters yönde aldığımız sonuç apoptozun, kaspaz-3’ten bağımsız yollarla da meydana gelebilme özelliği ile açıklanabilir.

ADEE'nin apoptozu indükleyen faktörünün (AIF) mitokondriden çekirdeğe translokasyonu yolu ile pankreas hücrelerinin apoptozuna aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

ADEE, HEK293 hücrelerinde CASP3 geninde mRNA ekspresyonunda artış ve CASP3 protein ekspresyonunda azalma yönünde etkinlik göstermiştir. Bu durum mRNA ve protein ekspresyonu sonrası post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyonların gerçekleşme olasılığını düşündürmüştür [148-150].

ADEE uygulanan PANC-1 pankreas kanseri hücrelerinde TP53 geninin ifadesinin, hücrede azalmış bulunması ADEE'nin anti-kanser etkinliğini doğrulamamaktadır. HEK293 hücrelerinde ADEE'nin TP53 genindeki etkinliği incelendiğinde ise, PANC-1 hücrelerinden farklı olarak TP53 geninin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde PANC-1 hücre hattında TP53 seviyesinin azalmış olması, ADEE'nin bu proteinden bağımsız bir şekilde hücre ölüm yolağını çalıştırdığını göstermektedir. HEK293 hücre hattındaki artış apoptozla uyumludur. TP53 genine ek olarak TP21 genide bakılabilir. Böylece hücrelerin hangi yolak üzerinde etkin rol aldığı hangi genin baskılandığı daha doğru şekilde gözlenmiş olabilir.

Çeşitli *Arum* türlerinin, çeşitli *Artemisia* türlerinin, *Calotropis procera*, *Citrullus colocynthis*, *Nigella sativa*, *Pulicaria crispa*, çeşitli *Urtica* türleri, *Withania somnifera* ve diğerlerinin Yakın Doğu ülkelerinde kanser hastaları arasında en sık kullanılan bitkiler arasında olduğunu ortaya koymaktadır. Yakın Doğu'dan bitki özleri ve izole edilmiş bileşikler için araştırılan moleküler mekanizmalar, p53 ve p21, Bcl-2, Bax, sitokrom c salınımı, poli (ADP-riboz) polimeraz bölünmesi ve kaspazların aktivasyonu araştırılmıştır. Sonuçta, kanser tedavisinde en çok kullanılan bitki türleri arasında yer alan *Arum* türleri (*A. dioskoridis*, *A. palaestinum*, *A. maculatum*), çeşitli *Artemisia* ve *Urtica* türleri çeşitli etki mekanizmalarıyla sitotoksik aktivite göstermiştir. Bu üç bileşen tarafından p53 hücrelerinde apoptozun indüklenmesi, artan Bax/Bcl-2 ve fosforile p53/fosforile olmayan p53 oranları, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı, kaspaz-3'ün bölünmesi ve aktivasyonu ve sitokrom c salınımı ile ilişkilendirilmiştir [151].

Farklı bir çalışmada *Artemisia absinthium*'un toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktı, insan meme kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiler göstermiştir.

Bcl-2 ailesi proteinlerinin modülasyonu ve MEK/ERK yolu ile apoptozu tetiklemiştir [152].

Çalışmamızda ADEE uygulanan pankreas kanseri hücre hattında qRT-PCR ile mRNA düzeyinde incelenen ERK1/2 ekspresyonu, PANC-1 hücre hatlarında azalmış, HEK293 hücrelerinde anlamlı bir şekilde artmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde PANC-1 hücre hattında ERK1/2 seviyesinin azalmış olması MTT sonuçları ile paralellik göstererek antiproliferatif etki göstermiştir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin modülasyonu ve MEK/ERK yolu ile ADEE, insan pankreas kanseri hücreleri üzerinde proliferasyonu baskılamıştır.

Deney sonuçlarımız PANC-1 hücre hatlarında HMGB1 ekspresyonunun ADEE uygulama sonrası azaldığı yönündedir. HMGB1'in pankreas kanserinin gelişimi ve ilerlemesi için çok önemli bir proteindir. Bu bilgi dahilinde verilerimiz ADEE'nin pankreas kanseri üzerinde HMGB1 bağımlı yollar ile etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca ADEE'nin HEK293 hücre hattında HMGB1 ekspresyonunu önemli derecede arttırdığı sonuçlarına ulaşılmıştır. Bu artış günümüzde kemoterapötik ilaçların büyük probleminin kanser hücrelerinin yanında normal hücrelerin de proliferasyonuna engel olup, apoptozu yönlendirdiği göz önüne alındığında, sonuçların apoptoz ile uyumlu olmaması iyi bir şekilde değerlendirilebilir.

ADEE'nin anti-kanser etkinliğini araştırdığımız bu tez çalışmasında MTOR geninin ekspresyonu qRT-PCR ile değerlendirilmiş; PANC-1 hücrelerinde ADEE uygulaması sonrası MTOR ekspresyonunu azalttığı, HEK293 hücrelerinde ADEE uygulama sonrası MTOR ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. PANC-1 hücrelerinde azalmış olması ADEE'nin pankreas kanserinde PI3K/AKT/MTOR yolu üzerinde inhibe edici bir etkinliğinin olduğunu düşündürmüştür. Ancak kesin sonuçlar için yolak üzerindeki tüm proteinlerin ekspresyonu incelenmeli ve farklı test sistemleri ile doğrulanmalıdır. Normal hücrelerde ADEE'nin etkinliğini değerlendirmek için HEK293 hücrelerinde MTOR düzeyi kontrol edilmiş ve sonuç olarak ADEE'nin MTOR'un ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu artış ADEE'nin kanser olmayan, normal hücrelerde MTOR ekspresyonunu negatif yönde etkilediğini ve hücre proliferasyonuna MYC yolu üzerinden etki ettiğini düşündürmektedir. ADEE uygulaması sonucunda PANC-1 hücrelerine MYC gen ekspresyonu incelenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda PANC-1 hücre hattında MYC ekspresyonu azalış göstermiştir. PANC-1 hücrelerinin proliferasyonunu baskılama üzerine etki göstermiştir. MTOR ve c-MYC yollarının birbirini aynı yönde etkilediği ele alındığında PANC-1 hücreleri için her iki genin ekspresyonunun azalması birbirine paralellik göstermektedir.

Kontrol grubu olarak ele aldığımız HEK293 hücrelerine ADEE uygulanması sonrasında MYC gen ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir. PANC-1 hücrelerinin ADEE uygulama sonrası MYC aktivitesinin inhibe edilmesiyle, otofaji uyarılması sağlanmış olur. Bu durum hücrelerin otofaji ile ölüme gitmesi sonucunu düşündürmektedir. Memeli canlılarda Atg6 otofoğa sahip olan ve ilk olarak 1998'lerde Beth Levine grubunun mayalardan klonladıkları Beclin-1'in otofajide merkezi bir role sahip olduğu bilinmektedir [153]. Bazı çalışmalar, Beclin-1'in, birçok fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkili olduğunu göstermekte ve hücrelerin otofajide membran uzamasında önemli role sahip olduğunu göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı Beclin-1 bu bitkinin otofaji üzerindeki etkisi hakkında bilgi verebileceğini düşündürmektedir. *A. dioscoridis* bitkisinin potansiyel olarak anti-kanser etkinliğinin olması, daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Arum bitkisinin alt türü olan *Arum palaestinum* ile ilgili yapılan bir çalışmada, üç farklı kanser hücre hattında, kas hücreleri (C2C12), preadiposit hücreler (3T3-L1), serviks hücreleri (Hela) üzerinde araştırma yapılmıştır. Bu çalışma ekstraktların direkt inhibitör etkisini ortaya çıkarmıştır [154,155].

Arum palaestinum ekstraktları ile yapılan bir diğer çalışmada etil asetat ekstraktlarının insan normal cilt fibroblastı, lösemi (K562) ve kolon kanseri (HCT-116) üzerinde anti-proliferatif etkisi gösterilmiştir [156].

Yine *A. palaestinum*'un agresif androjenden bağımsız prostat kanseri modellerine karşı *in vivo* ve *in vitro* anti-kanser aktivite çalışması incelenmiştir. *A. palaestinum* Bioss'un kaspaz 6 aktivasyonu ve prostat kanseri hücrelerini baskılama üzerindeki etkisi açıkça gösterilmiştir. [155]. Farklı hücre dizileri için, tüm ekstraktlar en yüksek antikanser etkisini (IC₅₀ ile) kronik miyeloid lösemi (K562) ve kolorektal karsinom (HCT-116) üzerinde göstermiştir. IC₅₀, su ekstraktı hariç tüm ekstraktlar için < 20 µg/ml olarak saptanmıştır.

Sonrasında prostat adenokarsinomu (PC3) ve meme adenokarsinomu (MCF-7) hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda aynı etki gösterilmiştir. Normal dermal fibroblast hücre hattı ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır [157]. *A. palaestinum* ekstraktının IC₅₀ değerleri bu dört hücre hattı için (<20 µg/ml'de) direnç göstermiştir.

Başka bir çalışmada *A. palaestinum*'dan izole edilen alkaloidin, bazı tümör hücre hatlarına karşı önemli bir *in vitro* sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [158,159].

Arum palaestinum ekstraktının dietil eter ve etil asetat ile izole edilen iki fraksiyonu ve dört flavonoid bileşiğin (luteolin, chrysoeriol, isoorientin, isovitexin) antitümör aktivitesi gösterilmiştir. Dört insan karsinoma hücre hattının, larinksin epidermal karsinomu (Hep2), serviks (HeLa), karaciğer (HepG2) ve meme (MCF-7), *in vitro* sitotoksik aktivitesi bildirilmiştir. Sonuçta, fraksiyone ekstraktın ve izole edilmiş bileşiklerin, dört hücre hattına karşı önemli antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır [160].

A. palaestinum ile yapılan bir başka çalışmada ise, insan prostat kanseri (PC3), kolon kanseri (HCT116), iskelet kası (L6) ve akciğer kanser (A549) hücre hattı kullanılmış ve bu bitkinin test edilen tüm konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, bütün hücre dizilerinde apoptoz indüksiyonu gözlenmemiş ve *A. palaestinum* ile tedavi edilen hücrelerde kontrole kıyasla morfolojik değişikliklerin olmadığı tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada etanolik *A. palaestinum* ekstraktının düşük konsantrasyonunun (50 µg/ml) 72 saat boyunca tedavi edilen meme adenokarsinomu hücre hattı (MCF7) üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir [157].

A. graveolens tohumları, S-fazında hücre döngüsü durmasından sonra insan BGC-823 mide kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivite ve indüklenmiş apoptozu gösterilmiştir [161-162].

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve literatürde yer alan sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde *A. dioscoridis*'in DPPH testleri, toplam fenolik madde miktarı tayini ve LC-MS/MS ile ADEE'nin fenolik içerik analizi *A. dioscoridis* yaprak ekstraktlarının, antioksidan aktivitelere ve fenolik bileşiklere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

ADEE, MTT sonuçlarına göre HEK293 ve PANC-1 hücrelerinde hücresel proliferasyonu inhibe etmiştir. *A. dioscoridis*'in PANC-1 hücrelerinde IC₅₀ dozunda ADEE uygulaması sonrası inhibe olan sinyal yollarından ERK1/2 ve MYC, MTT sonuçlarıyla uyumlu şekilde proliferasyonu baskılamıştır. Daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır.

ADEE'nin PANC-1 hücrelerinde apoptotik etkisi, BAX'ın protein ekspresyonunun artması, BCL-2 protein ekspresyonunun azalması protein ekspresyon düzeyinde anlamlı etkinliğinin olduğunu göstermiştir.

Anti-apoptotik bir gen olan BCL-2 geninin mRNA ekspresyon seviyesinin azalmış olması klasik apoptoz ile uyumlu etki göstermiştir. CASP3 ve BAX genleri üzerindeki apoptoz ile uyumsuz etkileşim durumu, post transkripsiyonel mRNA baskılanması sonucu meydana gelmiş olabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Son olarak inflamasyon tespitine ilişkin pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını içeren IL-6'nın immünoreaktivitesi ADEE uygulanan PANC-1 hücrelerinde anti-inflamatuar etkinlik göstermiştir.

Özetle, *A. dioscoridis*'in bu özelliği ile pankreas karsinogenezinin tedavisi için anti-kanser etkilerinin mekanizma yönünde açıklanabilmesi için daha detaylı çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Ayrıca bitkisel ilaç güvenliği açısından sitotoksikoloji hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini söyleyebiliriz. Yapılacak kapsamlı çalışmalarla *A. dioscoridis* bitkisinin tedavi alanları aydınlatılmaya ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

6. KAYNAKÇA

1. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell, 100(1) 57- 70.
2. Carmeliet, P., Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, 407(6801) 249-257.
3. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 71(3), 209-249.
4. Yiğit, D., Kandemir, A., Yiğit, N. (2002). Bazı Endemik Bitkilerin (*Salvia cryptantha*, *Origanum acutidens*, *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus*) Antimikrobiyal Etkileri. Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi, 4(2):77-81.
5. Toroğlu, S., Çenet, M. (2006). Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2):12-20.
6. Gunther, R. T. (1968). The Greek Herbal of Dioscorides, Hafner Pub.
7. Şimşek, M. (2013). *Arum Dioscoridis* Ekstrelerinin Çeşitli Patojen Mikroorganizmalara Karşı Antimikrobiyal Etkisi. Türk Klinik Laboratuvar Dergisi, 4:1, ISSN: 1309-7237.
8. Uğuzlar, H. (2009). Antalya'da yetişen *Areceae arum dioscorides* tohumlarının antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini (Master's thesis, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
9. Na, H.K., Surh, Y.J. (2006). Intracellular Signaling Network as a Prime Chemopreventive Target of (-) Epigallocatechin Gallat. Molecular Nutrient Food Research, 50:2, 152-159.
10. Karahan, F., Kulak, M., Urlu, E., Gözüacık, H. G., Böyümez, T., Şekeroğlu, N., Doganturk, I. H. (2015). Total phenolic content, ferric reducing and DPPH scavenging activity of *Arum dioscoridis*. Natural product research, 29(17), 1678-1683.

11. Abu-Darwish, M. S., Efferth, T. (2018). Medicinal plants from near east for cancer therapy. *Frontiers in pharmacology*, 9, 56.
12. Mantovani, A., Pierotti, M. A. (2008). Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer letters*, 267(2), 180-181.
13. Slack, J. M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121(6), 1569-1580.
14. Bardeesy, N., DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer*, 2(12), 897-909.
15. Yoshida, E., Kimura, Y., Kyuno, T., Kawagishi, R., Sato, K., Kono, T., Takemasa, I. (2022). Pankreatikoduodenektomide çölyak eksen stenozlu pankreas başı kanserinde tedavi stratejisi: Olgu sunumu ve literatürün gözden geçirilmesi. *Dünya Gastroenteroloji Dergisi*, 28 (8), 868.
16. Fiocca, R., Mastracci, L., Milione, M., Parente, P., Savarino, V. (2011). Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD); Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP). Microscopic esophagitis and Barrett's esophagus: the histology report. *Dig Liver Dis*, 43(Suppl 4), S319-S330.
17. DiMaio, C. J. (2014). Pancreatic cysts and tumors. *Mount Sinai Expert Guides: Gastroenterology*, 304-322.
18. Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed research international*, 2014.
19. Hruban, R. H., Brune, K., Fukushima, N., Maitra, A. (2008). Pancreatic intraepithelial neoplasia. In *Pancreatic Cancer* (pp. 41-51). Boston, MA: Springer US.
20. Hruban, R. H., Maitra, A., Kern, S. E., Goggins, M. (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 36(4), 831-849.

21. Yonezawa, S., Higashi, M., Yamada, N., Goto, M. (2008). Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut and liver*, 2(3), 137.
22. Brosens, L. A., Offerhaus, G. J. (2013). Molecular pathology of pancreatic cancer precursor lesions. *Molecular Genetics of Pancreatic Cancer*, 27-47.
23. Chang, D. K., Merrett, N. D., Biankin, A. V., NSW Pancreatic Cancer Network. (2008). Improving outcomes for operable pancreatic cancer: is access to safer surgery the problem?. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 23(7pt1), 1036-1045.
24. Lambe, M., Eloranta, S., Wigertz, A., Blomqvist, P. (2011). Pancreatic cancer; reporting and long-term survival in Sweden. *Acta Oncologica*, 50(8), 1220-1227.
25. J Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Bray, F. (2018). *Global cancer observatory: cancer today*. Lyon, France: international agency for research on cancer, 3(20), 2019.
26. Ilic, M., Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(44), 9694.
27. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
28. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 6(8), 2969-2972.
29. Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Bray, F. (2018). *Global cancer observatory: cancer today*. Lyon, France: international agency for research on cancer, 3(20), 2019.
30. Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M. (2018). *SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975–2018*. 2021. SEER (Accessed Accessed: 06-10-2021).

31. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Rosso, T., Boffetta, P., Levi, F., Negri, E. (2016). European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Annals of Oncology*, 27(4), 725-731.
32. Bosetti, C., Bertuccio, P., Negri, E., La Vecchia, C., Zeegers, M. P., Boffetta, P. (2012). Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Molecular carcinogenesis*, 51(1), 3-13.
33. McMenamin, Ú. C., McCain, S., Kunzmann, A. T. (2017). Do smoking and alcohol behaviours influence GI cancer survival?. *Best Practice Research Clinical Gastroenterology*, 31(5), 569-577.
34. Masoudi, S., Sanat, Z. M., Saleh, A. M., Nozari, N., Ghamar zad, N., Pourshams, A. (2017). Menstrual and reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 9(3), 146.
35. Li, X., Xu, H., Gao, P. (2018). ABO blood group and diabetes mellitus influence the risk for pancreatic cancer in a population from China. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 9392.
36. Gultekin, M., Boztas, G., Simsek, E. U. (2016). yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri.
37. Hruban, R. H., Canto, M. I., Goggins, M., Schlick, R., Klein, A. P. (2010). Update on familial pancreatic cancer. *Advances in surgery*, 44(1), 293-311.
38. Law, M. H., Bishop, D. T., Lee, J. E., Brossard, M., Martin, N. G., Moses, E. K., Iles, M. M. (2015). Genome-wide meta-analysis identifies five new susceptibility loci for cutaneous malignant melanoma. *Nature genetics*, 47(9), 987-995.
39. Lanfranca, M. P., Thompson, J. K., Bednar, F., Halbrook, C., Lyssiotis, C., Levi, B., Frankel, T. L. (2019). Metabolism and epigenetics of pancreatic cancer stem cells. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 57, pp. 19-26). Academic Press.
40. Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., Petersen, G. M., Bracci, P. M., Ghadirian, P. (2014). Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Annals of*

oncology, 25(10), 2065-2072.

41. Huang, B. Z., Pandol, S. J., Jeon, C. Y., Chari, S. T., Sugar, C. A., Chao, C. R., Setiawan, V. W. (2020). New-onset diabetes, longitudinal trends in metabolic markers, and risk of pancreatic cancer in a heterogeneous population. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 18(8), 1812-1821.
42. Nimmakayala, R. K., Seshacharyulu, P., Lakshmanan, I., Rachagani, S., Chugh, S., Karmakar, S., Ponnusamy, M. P. (2018). Cigarette smoke induces stem cell features of pancreatic cancer cells via PAF1. *Gastroenterology*, 155(3), 892-908.
43. Wang, Y. T., Gou, Y. W., Jin, W. W., Xiao, M., Fang, H. Y. (2016). Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *BMC cancer*, 16, 1-11.
44. Michaud, D. S., Vrieling, A., Jiao, L., Mendelsohn, J. B., Steplowski, E., Lynch, S. M., Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2010). Alcohol intake and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (PanScan). *Cancer causes control*, 21, 1213-1225.
45. Downes, D. P., Daurio, N. A., McLaren, D. G., Carrington, P., Previs, S. F., Williams, K. B. (2020). Impact of extracellular fatty acids and oxygen tension on lipid synthesis and assembly in pancreatic cancer cells. *ACS Chemical Biology*, 15(7), 1892-1900.
46. Djuric, Z. (2017). Obesity-associated cancer risk: the role of intestinal microbiota in the etiology of the host proinflammatory state. *Translational Research*, 179, 155-167.
47. Ibar, C. ve Irvine, KD (2020). Hippo-YAP sinyalinin metabolizma ile entegrasyonu. *Gelişim hücresi*, 54 (2), 256-267.
48. Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *science*, 321(5897), 1801-1806.
49. Ren, B., Cui, M., Yang, G., Wang, H., Feng, M., You, L., Zhao, Y. (2018). Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Molecular cancer*,

17(1), 1-15.

50. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The lancet*, 378(9791), 607-620.
51. Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., DePinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656-670.
52. Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galbán, S., Galbán, C. J., Di Magliano, M. P. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(2), 639-653.
53. Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730-733.
54. Morris IV, J. P., Wang, S. C., Hebrok, M. (2010). KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Reviews Cancer*, 10(10), 683-695.
55. Ahmed, S., Bradshaw, A. D., Gera, S., Dewan, M. Z., Xu, R. (2017). The TGF- β /Smad4 signaling pathway in pancreatic carcinogenesis and its clinical significance. *Journal of clinical medicine*, 6(1), 5.
56. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 6(8), 2969-2972.
57. Ghaneh, P., Costello, E., Neoptolemos, J. P. (2008). Biology and management of pancreatic cancer. *Postgraduate medical journal*, 84(995), 478-497.
58. Hong, S. M., Park, J. Y., Hruban, R. H., Goggins, M. (2011). Molecular signatures of pancreatic cancer. *Archives of pathology laboratory medicine*, 135(6), 716-727.
59. Zavoral, M., Minarikova, P., Zavada, F., Salek, C., Minarik, M. (2011). Molecular biology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(24), 2897.

60. Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G., Bockhorn, M. (2014). Pancreatic cancer. *British journal of pharmacology*, 171(4), 849-858.
61. Sakorafas, G. H., Smyrniotis, V. (2012). Molecular biology of pancreatic cancer: how useful is it in clinical practice?. *JOP. Journal of the Pancreas*, 13(4), 332-337.
62. Cowan, R. W., Maitra, A. (2014). Genetic progression of pancreatic cancer. *The Cancer Journal*, 20(1), 80-84.
63. Fulda, S. (2013). Modulation of mitochondrial apoptosis by PI3K inhibitors. *Mitochondrion*, 13(3), 195-198.
64. Abramson, M. A., Jazag, A., van der Zee, J. A., Whang, E. E. (2007). The molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointestinal cancer research: GCR*, 1(4 Suppl 2), S7.
65. Mousavi, S., Sahmani, M., Azad, M. (2023). Pankreas Kanseriinde Moleküler Patoloji ve Metilasyon Değerlendirmesi; Tanı ve Tedavide Yeni Yaklaşım. *Journal of Chemical Health Risks*, 13 (1), 115-124.
66. Canto, M. I., Harinck, F., Hruban, R. H., Offerhaus, G. J., Poley, J. W., Kamel, I., Bruno, M. (2013). International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*, 62(3), 339-347.
67. Oğuz, D. (2019). Pankreas: Tanı ve Tedavide Endoskopik Yaklaşımlar.
68. Unger, K., Mehta, K. Y., Kaur, P., Wang, Y., Menon, S. S., Jain, S. K., Cheema, A. K. (2018). Metabolomics based predictive classifier for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*, 9(33), 23078.
69. Çoban, M. N. (2020). PANC-1 ve PANC10. 05 pankreas kanseri hücre hatlarında palbociclib ve abemaciclib uygulamasıyla PI3K/AKT/MTOR ve AMPK sinyal ekseninin incelenmesi (Master's thesis, İstanbul Kültür Üniversitesi/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı).

70. McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*, 24(43), 4846.
71. Göral, V. (2014). Pankreas kanseri: patogenez ve tanı. *Güncel Gastroenteroloji*, 18(4), 407-414.
72. Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., Büchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Journal of British Surgery*, 91(5), 586-594.
73. Lambert, A., Schwarz, L., Borbath, I., Henry, A., Van Laethem, J. L., Malka, D., Conroy, T. (2019). An update on treatment options for pancreatic adenocarcinoma. *Therapeutic advances in medical oncology*, 11, 1758835919875568.
74. Çoban, M. N. (2020). PANC-1 ve PANC10. 05 pankreas kanseri hücre hatlarında palbociclib ve abemaciclib uygulamasıyla PI3K/AKT/MTOR ve AMPK sinyal ekseninin incelenmesi (Master's thesis, İstanbul Kültür Üniversitesi/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü/Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı).
75. Yirrell, D. L., Roome, A. P., Darville, J. M., Ashley, C. R., Harbour, J. (1983). Comparison of the continuous cell line 293 with human embryo kidney cells and human embryo fibroblast cells for the cultivation of ocular viruses. *Journal of clinical pathology*, 36(9), 996-999.
76. Henriquez, C. L., Arias, T., Pires, J. C., Croat, T. B., Schaal, B. A. (2014). Phylogenomics of the plant family Araceae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 75, 91-102.
77. Farid, M. M., Hussein, S. R., Ibrahim, L. F., El Desouky, M. A., Elsayed, A. M., El Oqlah, A. A., Saker, M. M. (2015). Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 5(11), 944-947.

78. Baytop T., Kadioğlu D. (2002). İstanbul Bölgesi'nin tıbbi bitkileri, In: 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
79. Espindola, A., Buerki, S., Bedalov, M., Kuepfer, P., Alvarez, N. (2010). New insights into the phylogenetics and biogeography of *Arum* (Araceae): unravelling its evolutionary history. Botanical journal of the linnean society, 163(1), 14-32.
80. Baytop, T. (1999). Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri Yayını, 2. Baskı, İstanbul, 480.
81. Gunther, R. T. (1959). The Greek herbal of dioscorides.
82. Azab, A. (2017). *Arum*: A plant genus with great medicinal potential. Eur. Chem. Bull, 6(2), 59-68.
83. Salik, S., Alpınar, K., Imre, S. (2002). Fatty acid composition of the seed oil of *Arum italicum* Miller. Journal of Food Lipids, 9(2), 95-103.
84. Karahan, F., Kulak, M., Urlu, E., Gözüacık, H. G., Büyümez, T., Şekeroğlu, N., Doganturk, I. H. (2015). Total phenolic content, ferric reducing and DPPH scavenging activity of *Arum dioscoridis*. Natural product research, 29(17), 1678-1683.
85. Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2015). Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Research International, 70, 74-86.
86. Ali-Shtayeh, M. S., Yaniv, Z., Mahajna, J. (2000). Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 73(1-2), 221-232.
87. Tuzlacı, E. (2006). Şifa Niyetine Türkiye'nin Bitkisel Halk İlaçları, Alfa Yayınları, 1. Basım, Melisa Matbaacılık, Turkey: İstanbul.
88. Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., Exon, J. H. (2006). A Review Of The Effects And Mechanisms Of Polyphenolics In Cancer. Crit Rev Food Sci Nutr. 46(2), 161-83.

89. Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 1054(1-2), 95-111.
90. Kumar, S., Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
91. Ahmed, S. I., Hayat, M. Q., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K.; Bates, R. B. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC Complement. Altern. Med.* 16i 460.
92. Escarcega, R., Fuentes-Alexandro, S., Garcia-Carrasco, M., Gatica, A., Zamora, A. (2007). The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer. *Clin Oncol.* 19(2):154-61.
93. Bondia-Pons, I., Aura, A. M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *J Cereal Sci.* 49(3),:323- 36.
94. Paran, E., Novack, V., Engelhard, Y. N, Hazan-Halevy, I. (2009). The effects of natural antioxidants from tomato extract in treated but uncontrolled hypertensive patients. *Cardiovasc Drug Ther.* 23(2):145-51.
95. Serra, A. T, Rocha, J, Sepodes, B, Matias AA, Feliciano RP, de Carvalho A (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties–correlation of response with composition. *Food Chem.* 135(4), 2378-86.
96. Giacco, R., Costabile G, Della Pepa G, Anniballi G, Griffio E, Mangione A (2014). A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nut Metab Cardiovasc Dis.* 24(8):837-44.
97. Chao, D. T., Korsmeyer, S. J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*, 16(1), 395-419.
98. Martinou, J. C., Youle, R. J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell*, 21(1), 92-101.

99. Schafer, Z. T., Kornbluth, S. (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Developmental cell*, 10(5), 549-561.
100. Ledgerwood, E. C., Morison, I. M. (2009). Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clinical cancer research*, 15(2), 420-424.
101. Silke, J., Meier, P. (2013). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins—modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a008730.
102. Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
103. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
104. Jin, Z. (2005). El-Deiry WS Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4, 139-163.
105. Graves, P. R., Aponte-Collazo, L. J., Fennell, E. M., Graves, A. C., Hale, A. E., Dicheva, N., Graves, L. M. (2019). Mitochondrial protease ClpP is a target for the anticancer compounds ONC201 and related analogues. *ACS chemical biology*, 14(5), 1020-1029.
106. Ishizawa, J., Zarabi, S. F., Davis, R. E., Halgas, O., Nii, T., Jitkova, Y., Andreeff, M. (2019). Mitochondrial ClpP-mediated proteolysis induces selective cancer cell lethality. *Cancer cell*, 35(5), 721-737.
107. Kline, C. L. B., Van den Heuvel, A. P. J., Allen, J. E., Prabhu, V. V., Dicker, D. T., El-Deiry, W. S. (2016). ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2 α kinases. *Science signaling*, 9(415), ra18-ra18.
108. Ishizawa, J., Kojima, K., Chachad, D., Ruvolo, P., Ruvolo, V., Jacamo, R. O., Allen, J. E. (2016). Sarbassov dos D, Lorenzi PL, Huang X, Neelapu SS, McDonnell T, Miranda RN, Wang M, Kantarjian H, Konopleva M, Davis RE, Andreeff M. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-

- independent apoptosis in hematological malignancies. *Sci Signal*, 9, 415.
109. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498.
 110. Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436.
 111. Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1605-1621.
 112. Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer cell*, 6(3), 203-208.
 113. Cordon-Cardo, C., Prives, C. (1999). At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *The Journal of experimental medicine*, 190(10), 1367-1370.
 114. Smyth, M. J., Cretney, E., Kershaw, M. H., Hayakawa, Y. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological reviews*, 202(1), 275-293.
 115. Hassuneh, M. R., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S. (2013). Role of interleukin-10 in the regulation of tumorigenicity of a T cell lymphoma. *Leukemia lymphoma*, 54(4), 827-834.
 116. Singleton, VL ve Rossi, JA (1965). Fosfomolibdik-fosfotungstik asit reaktifleri ile toplam fenoliklerin kolorimetrisi. *Amerikan Enology and Viticulture dergisi*, 16 (3), 144-158.
 117. Yilmaz, M. A. (2020). Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation. *Industrial Crops and Products*, 149, 112347.
 118. Fardet, L., Galicier, L., Lambotte, O., Marzac, C., Aumont, C., Chahwan, D., Hejblum, G. (2014). Development and validation of the HScore, a score for the diagnosis of reactive hemophagocytic syndrome. *Arthritis & rheumatology*, 66(9), 2613-2620.

119. Dotti, I., Bonin, S. (2011). DNase treatment of RNA. In Guidelines for molecular analysis in archive tissues (pp. 87-90). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
120. Sun, Y. P., Zheng, Y. H., Liu, W. J., Zheng, Y. L., Zhang, Z. G. (2014). Synovium fragment-derived cells exhibit characteristics similar to those of dissociated multipotent cells in synovial fluid of the temporomandibular joint. PloS one, 9(7), e101896.
121. Jiang, L., Tang, Z. (2018). Expression and regulation of the ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in periodontal tissue remodeling of orthodontic tooth movement. Molecular medicine reports, 17(1), 1499-1506.
122. Koller, A., Bruckner, D., Aigner, L., Reitsamer, H., Trost, A. (2020). Cysteinyl leukotriene receptor 1 modulates autophagic activity in retinal pigment epithelial cells. Scientific reports, 10(1), 1-13.
123. Ghaffari, S., Jang, E., Naderinabi, F., Sanwal, R., Khosraviani, N., Wang, C., Lee, W. L. (2021). Endothelial HMGB1 is a critical regulator of LDL transcytosis via an SREBP2–SR-BI axis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 41(1), 200-216.
124. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.
125. Jaradat, N., Abualhasan, M. (2016). Comparison of phytoconstituents, total phenol contents and free radical scavenging capacities between four *Arum* species from Jerusalem and Bethlehem. Pharmaceutical Sciences, 22(2), 120-125.
126. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical biochemistry, 37(4), 277-285.
127. YABALAK, E. (2018). *Arum dioskoridis* Sm'den elde edilen metanolik ekstraktın radikal süpürme aktivitesi ve kimyasal bileşimi. var. dioskoridis ve mineral ve iz elementlerinin tayini. Türk Kimya Derneği Dergisi Bölüm A: Kimya, 5 (1), 205-218.

128. Öztürk, E. (2017). *Arum Dioscoridis* Bitki Ekstraktının, Tozasertib ile Birlikte CFPAC-1 Pankreas Karsinoma Hücre Hattı Üzerindeki Antikanser Etkisinin *in vitro* Araştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
129. Janakat, S. ve Al-Thnaibat, O. (2008). Üç yenilebilir bitki özünün antilipoperoksidatif etkisi: *Viscum album*, *Arum dioskoridis* ve *Eminium spiculatum*. Gıda kalitesi dergisi, 31 (1), 1-12.
130. Ali-Shtayeh, MS, Al-Assali, AA ve Jamous, RM (2013). Filistin şifalı bitkilerinin akneye neden olan bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi. Afrika Mikrobiyoloji Araştırma Dergisi, 7 (21), 2560-2573.
131. TÜRKMEN, F. U., TAKCI, H. A. M., ONALAN, F. E. S., SAGLAM, H. (2019). *Arum dioscoridis* ekstraktlarının toplam fenolik, flavonoid içerikleri ile antioksidan ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması. Harran Üniversitesi Mühendislik Dergisi, 4(1), 102-108.
132. AĞAOĞLU, A. B., Kadir, G. İ. Ş. İ., İSPIROĞLU, M., BAHAR, A. Y., TOLUN, F. İ., KANTARÇEKEN, B. (2022). Intestinal Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activity of The Aqueous Extract From *Arum Dioscoridis* in Acetic Acid Induced Colitis in Rats. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 17(1), 172-181.
133. Afifi, FU, Kasabri, V., Litescu, SC ve Abaza, IM (2016). Ürdün'den geleneksel ve yaygın olarak kullanılan iki *Arum* türünün biyolojik aktivitelerinin *in vitro* ve *in vivo* karşılaştırması: *Arum dioskoridis* Sibth Sm. ve *Arum palaestinum* Boiss. Doğal ürün araştırması, 30 (16), 1777-1786.
134. Diab-Assaf, M., Taleb, R. I., Shebaby, W., Mansour, A., Moussa, C. J., Daher, C., Mroueh, M. (2012). Antioxidant and anticancer activities of methanolic, ethyl acetate and chloroform extracts of *Arum Palaestinum*. Planta Medica, 78(11), PI389.
135. Al-Shmgani, H. S., Kadri, Z. H. M., Al-Halbosi, M. M., Dewir, Y. H. (2019). Phytochemical analysis, cytotoxicity and antioxidant activity of cuckoo pint (*Arum maculatum*) leaf extract. Acta Biologica Szegediensis, 63(2), 119-124.

136. Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2015). Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Research International, 70, 74-86.
137. Kadri ZHM, Ibrahim NA, Al-Shmgani HS. (2016). Hepatotoxicity evaluation of methanol leaves extract of *Arum maculatum*. IIOABJ 7:435-440.
138. Husein, A. I., Ali-Shtayeh, M. S., Zatar, N. A., Jondi, W. (2011). Antioxidant and Anticancer Activities of Six Palestinian Plants Used in Traditional Medicine.
139. Javidmehr, A., Abbaszadeh, S., Kian, M., Hamedeyazdan, S., Soraya, H. (2021). *Arum orientale*'nin hidroalkolik özü, sıçanlarda izoproterenolün neden olduğu miyokard enfarktüsünü iyileştirir. J Res Pharm, 25 (1), 80-8.
140. Alencar VB, Alencar MNN, Assreuy AMS, Mota, ML, Brito GAC, Aragão KS, Bittencourt FS, Pinto VPT, Debray H, Ribeiro RA, Cavada BS (2005). Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. Int J Biochem Cell Biol 37:1805-1814.
141. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky P (2002). Cytokines and autoimmunity. Nat Rev Immunol 2:37-45.
142. Dinarello CA. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu Rev Immunol 27:519-550.
143. Ekor M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Front Pharmacol 4:1-10.
144. Afifi-Yazar FU, Kasabri V, Abu-Dahab R. (2011). Medicinal plants from Jordan in the treatment of cancer: Traditional uses vs. *in vitro* and *in vivo* evaluations - Part 1. Planta Med 77:1203-1209.
145. Zaid H, Silbermann M, Ben-Arye E, Saad B. (2012). GrecoArab and Islamic herbal-derived anticancer modalities: From tradition to molecular mechanisms. Evid-Based

146. Naseef H, Qadadha H, Abu Asfour Y, Israr Sabri I, Al-Rimawi F, Abu-Qatouseh L, Farraj M. (2017). Anticancer, antibacterial, and antifungal activities of *Arum palaestinum* plant extracts. World J Pharm Res 6:31-43
147. Farid MM, Hussein SR, Ibrahim LF, Desouky MAE, Elsayed AM, Oqlah AAE, Saker MM. (2015). Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. Asian Pac J Trop Biomed 11:944-947.
148. Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams and M. Gerstein (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." Genome Biol 4(9): 117.
149. Nie, L., G. Wu and W. Zhang (2006). "Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in *Desulfovibrio vulgaris*: a quantitative analysis." Genetics 174(4): 2229-2243.
150. Pascal, L. E., L. D. True, D. S. Campbell, E. W. Deutsch, M. Risk, I. M. Coleman, L. J. Eichner, P. S. Nelson and A. Y. Liu (2008). "Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate." BMC Genomics 9: 246
151. Abu-Darwish, M. S., Efferth, T. (2018). Medicinal plants from near east for cancer therapy. Frontiers in pharmacology, 9, 56.
152. Shafi, G., Hasan, T. N., Syed, N. A., Al-Hazzani, A. A., Alshatwi, A. A., Jyothi, A., Munshi, A. (2012). *Artemisia absinthium* (AA): a novel potential complementary and alternative medicine for breast cancer. Molecular biology reports, 39, 7373-7379.
153. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. J. C. D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death & Differentiation, 18(4), 571-580.
154. Ahmad, I. H., Mohammed, S. A. S., Rana, M. J., Salam, Y. A. Z., Waheed, J. J., Nidal, A. A. Z. (2014). Antimicrobial activities of six plants used in Traditional Arabic Palestinian Herbal Medicine. African journal of microbiology research, 8(38), 3501-

3507.

155. Cole, C., Burgoyne, T., Lee, A., Stehno-Bittel, L., Zaid, G. (2015). *Arum Palaestinum* with isovanillin, linolenic acid and β -sitosterol inhibits prostate cancer spheroids and reduces the growth rate of prostate tumors in mice. BMC complementary and alternative medicine, 15(1), 1-8.
156. Hatmal, M., Abderrahman, S. ve Alsholi, D. (2017). *Arum palaestinum*'un farklı ekstraksiyon yöntemlerinin farklı kanser hücre hatları üzerindeki anti-tümör etkilerinin *in vitro* tahlil ile belirlenmesi. Farmakolojiçevrimiçi, 1, 28-45.
157. Abu-Dahab, R., Afifi, F. (2007). Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). Scientia Pharmaceutica, 75(3), 121-146.
158. El-Desouky, S. K., Kim, K. H., Ryu, S. Y., Eweas, A. F., Gamal-Eldeen, A. M., Kim, Y. K. (2007). A new pyrrole alkaloid isolated from *Arum palaestinum* Boiss. and its biological activities. Archives of pharmacal research, 30, 927-931.
159. El-Desouky, S. K., Ryu, S. Y., Kim, Y. K. (2007). Piperazirum, a novel bioactive alkaloid from *Arum palaestinum* Boiss. Tetrahedron letters, 48(23), 4015-4017.
160. Farid, M. M., Hussein, S. R., Ibrahim, L. F., El Desouky, M. A., Elsayed, A. M., El Oqlah, A. A., Saker, M. M. (2015). Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 5(11), 944-947.
161. Gao, L. L., Feng, L., Yao, S. T., Jiao, P., Qin, S. C., Zhang, W., Li, F. R. (2011). Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via s phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line. Asian Pac J Cancer Prev, 12(10), 2601-6.
162. Ahmad, R., Ahmad, N., Naqvi, A. A., Shehzad, A., Al-Ghamdi, M. S. (2016). Role of traditional Islamic and Arabic plants in cancer therapy. Journal of traditional and complementary medicine, 7(2), 195-204.

EKLER

BİBAM-BMT-F-01TR

	ANADOLU ÜNİVERSİTESİ BİTKİ, İLAÇ VE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ (AUBİBAM) Yunus Emre Kampüsü 26470 Tepebaşı / Eskişehir Tel: (222) 335 29 52 veya 335 05 80 / 3661-3662 Faks: (222) 335 01 27 e-posta: web:
BİTKİSEL MATERYAL TANIMLAMA RAPORU	

Müşteri Bilgileri				
Müşteri	Bermal Başbuğ			
Adresi	Osmangazi mah. G.Ü.Tıp Fak. Temel Bilimler-Histoloji 3. Kat Şehitkamil / Gaziantep			
Rapor Teslim Adresi	Osmangazi mah. G.Ü.Tıp Fak. Temel Bilimler-Histoloji 3. Kat Şehitkamil / Gaziantep			
Vergi Dairesi ve No	40102139000			
Telefon	05534923553			
E-Posta	bermal.basbug@hotmail.com			
Örnek Bilgileri				
Barkod No	Örnek Kodu	Kayıt Tarihi	Analiz Tarihi	Rapor Tarihi
BMT-202200019	Arum-01	06.06.2022	13.06.2022	14.06.2022
SONUÇ Örneğin teşhisi yapıldığında; Regnum: Plantae / Bitkiler Alemi Divisio: Magnoliophyta / Tohumlu bitkiler Subclassis: Magnoliidae / Manolya alt sınıfı Familia: Araceae / Yılanyastığıgiller Genus: Arum / Yılanyastığı Species: <i>Arum dioscoridis</i> var. <i>dioscoridis</i> Sm./ Tırşikpancarı Olduğu tespit edilmiştir.				
EK BİLGİLER • • •				
Çalışma Yöneticisi	Kalite Yönetim Sorumlusu	Kalite Güvence Sorumlusu	Analiz Personeli	
Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL	Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ	Doç. Dr. Fatih GÖGER	Öğr. Gör. Dr. Ö. Koray YAYLACI	

TEZ & PROJELER

Yüksek Lisans Tezi:

PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATTINDA *Arum dioscoridis* BİTKİ EKSTRAKTININ ANTİ-KANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI.

Eserler Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

Liman R, Başbuğ B, Ali MM, Acikbas Y, Ciğerci İH. Cytotoxic and genotoxic assessment of tungsten oxide nanoparticles in Allium cepa cells by Allium anaphase and comet assays. J Appl Genet. 2021 Feb;62(1):85-92. doi: 10.1007/s13353-020-00608-x. Epub 2021 Jan 6. Erratum in: J Appl Genet. 2021 Jan 18;; PMID: 33409932.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler poster sunumları:

Başbuğ B, Liman R. The 4th International Conference on Engineering and Natural Sciences (ICENS) is pleased to inform you that your paper entitled “GENOTOXIC EFFECT OF TUNGSTEN (VI) OXIDE NANOPOWDER IN ALLIUM CEPA ROOT MERISTEMATIC CELLS” has been accepted for Poster presentation at the ICENS 2018 conference. This decision is made based on a double-blind peer review process. The conference will be held in Kiev, Ukraine between May 2 to 6, 2018.

Tubitak projesi:

2209-A Projesi “TUNGSTEN (VI) OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ALLIUM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI”. 2016-2018

Proje Yürütücüsü: DOÇ. DR. RECEP LİMAN

Araştırmacı: Bermal BAŞBUĞ

Deneyimler:

Kromozom analizi, Prenatal tanı (Realtime PCR), Hücre Kültürü, Transfeksiyon, RNA İzolasyonu, Protein İzolasyonu, Bakteri Ekimi, Bakteri Kültürü, Plazmid Transformasyonu, Plazmid DNA İzolasyonu ve Jelde yürütülmesi, Klasik PCR, *in vitro* transkripsiyon ile RNA elde etmek.

KURS / SERTİFİKA BİLGİLERİ

Hayvan Deneyleri Kullanım Sertifikası.

Pedagojik Eğitim ve Formasyon Sertifikası.

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans
Gaziantep Üniversitesi

Histoloji ve Embriyoloji ABD.
2020 –2023

Lisans
Uşak Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik
2014 -2018

İŞ DENEYİMİ

2023-2020

Gaziantep Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri

Histoloji pratik ders asistanlığı,

Tıp fakültesi öğrencilerine özel ders deneyimi, Biyoloji, Kimya, Matematik özel ders eğitimi

2017

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Stajyer
(genetik/sitogenetik/mikrobiyoloji lab.)

2016- 2018

Uşak Üniversitesi (UBATAM) Hücre Kültürü (Allium Testi, Comet Assay Testi, Ec₅₀ testi).

Yabancı Dil Bilgisi: İngilizce/Almanca Okuma: İyi Yazma: İyi Konuşma: İyi

Bilgisayar Bilgisi: Word, Excel, Powerpoint, Outlook, SPSS, Mikrosoft Windows 7/8/8.1/10, Mikrosoft Office.

İlgi Alanları: Embriyo, CRISPR-CAS9, Kök Hücre, Kanser.