



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI ENDEMİK *ONOBRYCHIS* TÜRLERİNİN KOLON KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

MUHAMMET VOLKAN BÜLBÜL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL-2017

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. İlknur Keskin'e,

Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Doç. Dr. Mehmet Tekin'e

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Burçin Ergene Öz'e ve Araştırma Görevlisi Sayın Serkan Özbilgin'e

Yardımlarını esirgemeyen Msc. Emre Vatandaşlar'a

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Yüksek Lisans tez çalışmam ile ilgili tüm emekleri için değerli REMER çalışanlarına,

Her zaman yanımda olan canım annem Resmigül Şener'e,

Sevgili kuzenim Orman Müh. Dr. Ferda Nur Şener'e

Eğitim hayatım boyunca bana destek oldukları için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMA VE SİMGE LİSTESİ	vi
RESİM, ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ	ix
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ ve AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Korunga (<i>Onobrychis</i>)	6
4.1.1. Genel Özellikleri	6
4.1.2. Sistematik Sınıflandırma	7
4.1.3. İçerdiği Kimyasal Bileşenler	7
4.1.4. İçerdiği Onkolojik Bakımdan Önemli Bileşenler.....	8
4.1.5. İçerdiği Bileşenlerin Antikanser Etkileri.....	10
4.1.6. Antioksidan Etkileri	16
4.2. Kanser	18
4.2.1. Hücre Döngüsü	18
4.2.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Düzenlenmesi	19
4.2.3. Kanser ve Hücre Döngüsü.....	21
4.3. Kolorektal Kanserler	24
4.3.1. Genel Özellikleri	24
4.3.2. Kolon Kanseri ve İnflamasyon.....	26
4.3.3. Siklo-oksijenaz-2 (COX-2) ve Kolorektal Kanserler	28
4.3.4. NF-kB ve Kolorektal Kanserler	31
4.3.5. Kolorektal Kanser ve Çevresel Faktörler	32
4.4. Apoptoz.....	33
4.4.1. Genel Özellikleri	33
4.4.2. Apoptozda Temel Yolaklar ve Proteinler.....	34
4.4.3. Apoptoz ve Tedavi İlişkisi.....	38
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
5.1. Gereç	40
5.1.1 Deneyde Kullanılan Materyaller	40
5.2. Yöntem.....	42
5.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü.....	42
5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Ölçümü (Hücre Canlılık Tespiti)	42
5.2.3. Akış Sitometri Analizler (FACS)	43
5.2.3.1. FACS, Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Analizi	43

5.2.3.2. FACS, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz Analizi	45
5.2.4. Florometrik Kaspaz 3 Analizi	46
6. BULGULAR	47
6.1. Hücre Proliferasyonunun Ölçümü (Hücre Canlılık Tespiti)	47
6.1.1. HCT-116 Hücreleri Canlılık Tespiti	48
6.1.2. HEK-293 Hücreleri Canlılık Tespiti	53
6.2. Akış Sitometri Analizleri (FACS)	58
6.2.1. FACS, Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Analizi	58
6.2.2. FACS, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz Analizi	60
6.3. Florometrik Kaspaz 3 Analizi	69
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	70
8. KAYNAKLAR	79
9. EKLER	90
10. ÖZGEÇMİŞ	91

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
5-LOX	5-lipoksijenaz enzimi
A2780	İnsan ovaryum kanseri hücre hattı
ABTS	2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AOM	Azoksimetam
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APC	Adenomatöz polipozis geni
ATM-ATR	Serin treonin kinaz yolağı
AVNs	Avenanthramides
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homolojisi
BRCA-1	Meme kanseri 1 geni
BRCA-2	Meme kanseri 2 geni
CA	Kafeik asit
CaCo-2	Kolon kanseri hücre hattı
CA-CRC	Kolit bağımlı kolon kanseri
Cdk	Siklin bağımlı kinazlar
CHO	Yumurtalık kanseri hücre hattı
COX-1	Siklooksijenaz-1
COX-2	Siklooksijenaz-2
CXCL1	Kemokin (C-X-C motif) ligand 1
DMBA	7,12-Dimethylbenzanthracene
DMH	1,2-dimetilhidrazin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
DU145	Prostat kanseri hücre hattı
EGCG	Epigallocateşin-3-gallat
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörleri
FA	Ferulik asit
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FAP	Famlyal adenomatöz polipozis
HDAC	Histon deasetilaz
HepG2	Karaciğer kanseri hücre hattı
HNPCC	Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser
HT29	Kolon kanseri hücre hattı
IBD	İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
IL-6	İnterlökin 6
IP6	İnositol heksafosfat
İNOX	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
Kaspaz	Sistein-Aspartik Proteaz
KRK	Kolorektal kanser
LNCaP	Androjen bağımlı prostat kanseri hücre hattı
LPS	Lipopolisakkarit
MCF-7	Östrojen reseptör pozitif meme kanseri hücre hattı
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MDR-1	Multi Drug Resistant-1 Geni
Met	Metformin
MMP-1	Matrix metalloproteinase-1

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Semboller	Açıklamalar
MOLT-4 T	Akut lenfoblastik lösemi hücre hattı
MPF	Siklin dimeri/ Mitoz başlatıcı faktör
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NF-κB-IκB	Nükleer faktör inhibitör kinaz kompleksi
NO	Nitrit oksit
NPC-BM1	İnsan nazofaringeal karsinoma hücre hattı
NS-398	COX-2 inhbitörü
OGA	Orientin-2''-O-galactopyranoside
OVCAR3	İnsan ovaryum kanseri hücre hattı
OxoG	7,8-dihidro-8-oksoguanin
PC12	Feokromositoma hücre hattı
PC-3	Androjen bağımsız prostat kanseri hücre hattı
pCA	Kumarik asit
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphoinositide 3-kinaz
PPAR	Peroksizom proliferatörü ile aktive edilen reseptör
Ras-MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ROS	Reaktif oksijen türleri
SiHa	İnsan servikal kanser hücreleri
tCA	Trans-sinamik asit
U266B1	İnsan miyelom hücre hattı
XVX	Viteksin-2-O-xyloside

RESİM, ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

Resim Listesi

Resim 6.1.1. HEK-293 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (10X)	48
Resim 6.1.2. HCT-116 hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (10X)	49

Şekil Listesi

Şekil 4.1.4.1. İçerdiği onkolojik bakımdan önemli bileşikler	9
Şekil 4.2.1.1. Hücre döngüsünün evreleri.....	19
Şekil 4.2.2.1 Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar.....	20
Şekil 4.2.2.2 Hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan kontrol noktaları.....	21
Şekil 4.3.1.1. Kalın bağırsağın anatomik bölümleri.....	24
Şekil 4.3.1.2 Kolon kanserinin evreleri.....	25
Şekil 4.3.2.1 Kolorektal kanserin mekanizması ve kolit-bağılantılı kanserin gelişimi.....	27
Şekil 4.4.2.1. Apoptozda ekstrinsik yolağın mekanizması	35
Şekil 4.4.2.2. Apoptozda intrinsik yolağın mekanizması.....	36
Şekil 6.1.1.1 <i>O. albiflora</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri	50
Şekil 6.1.1.2 <i>O. albiflora</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri	50
Şekil 6.1.1.3 <i>O. argyrea</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri	51
Şekil 6.1.1.4 <i>O. argyrea</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri	51
Şekil 6.1.1.5 <i>O. galegifolia</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	52
Şekil 6.1.1.6 <i>O. galegifolia</i> 'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	52

Şekil 6.1.1.7 <i>O. tournefortii</i> 'nin HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	53
Şekil 6.1.1.8 <i>O. tournefortii</i> 'nin HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	53
Şekil 6.1.2.1 <i>O. albiflora</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	54
Şekil 6.1.2.2 <i>O. albiflora</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	55
Şekil 6.1.2.3 <i>O. arygrea</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	55
Şekil 6.1.2.4 <i>O. arygrea</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	56
Şekil 6.1.2.5 <i>O. galegifolia</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	56
Şekil 6.1.2.6 <i>O. galegifolia</i> 'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	57
Şekil 6.1.2.7 <i>O. tournefortii</i> 'nin HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	57
Şekil 6.1.2.8 <i>O. tournefortii</i> 'nin HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.....	58
Şekil 6.2.1.1 <i>O. albiflora</i> ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubu hücrelerinin AnnexinV/PI akış sitometrik analiz diyagramı	59
Şekil 6.2.1.2 <i>O. albiflora</i> ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin AnnexinV/PI akış sitometrik analiz diyagramı	60
Şekil 6.2.2.1 <i>O. albiflora</i> ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin Cytocalcein Violet 450 pik oranı diyagramı	61
Şekil 6.2.2.2 <i>O. albiflora</i> ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin Cytocalcein Violet 450 pik oranı diyagramı	62
Şekil 6.2.2.3 <i>O. albiflora</i> ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin Apopxin Green Indicator pik oranı diyagramı	63
Şekil 6.2.2.4 <i>O. albiflora</i> ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin Apopxin Green Indicator pik oranı diyagramı	64

Şekil 6.2.2.5 <i>O. albiflora</i> ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin 7-AAD pik oranı diyagramı	65
Şekil 6.2.2.6 <i>O. albiflora</i> ekstresinin İK ₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin 7-AAD pik oranı diyagramı.....	66
Şekil 6.2.2.7 Deney ve kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş Cytocalcein Violet 450 pik oranı diyagramı	67
Şekil 6.2.2.8 Deney ve kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş Apopxin Green Indicator pik oranı diyagramı.....	68
Şekil 6.2.2.9 Deney ve kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş 7-AAD pik oranı diyagramı.....	69
Şekil 6.3.1 Deney grubu, pozitif ve negatif kontrol gruplarının Kaspaz 3 floresan değerleri.....	70

Tablo Listesi

Tablo 5.1.1.1. Deneyde kullanılan kimyasallar, ticari kitler ve sarf malzemeler listesi	42
Tablo 6.1.1.1 Herbaların HCT-116 hücrelerindeki İK ₅₀ değerleri.....	49
Tablo 6.1.2.1 Herbaların HEK-293 hücrelerindeki İK ₅₀ değerleri.....	54
Tablo 6.2.1.1 HCT-116 kontrol grubu hücrelerinin FACS AnnexinV/PI ile belirlenen apoptotik ve nekrotik hücre % değerleri	59
Tablo 6.2.1.2 HCT-116 deney grubu hücrelerinin FACS AnnexinV/PI ile belirlenen apoptotik ve nekrotik hücre % değerleri	60
Tablo 6.2.2.1 HCT-116 kontrol grubu hücrelerinin FACS Cytocalcein Violet 450 ile belirlenen canlılık % değerleri	61
Tablo 6.2.2.2 HCT-116 deney grubu hücrelerinin FACS Cytocalcein Violet 450 ile belirlenen canlılık % değerleri	62
Tablo 6.2.2.3 HCT-116 kontrol grubu hücrelerinin FACS Apopxin Green Indicator ile belirlenen apoptotik % değerleri	63
Tablo 6.2.2.4 HCT-116 deney grubu hücrelerinin FACS Apopxin Green Indicator ile belirlenen apoptotik % değerleri	64
Tablo 6.2.2.5 HCT-116 kontrol grubu hücrelerinin FACS 7-AAD ile belirlenen nekrotik hücre % değerleri.....	65
Tablo 6.2.2.6 HCT-116 deney grubu hücrelerinin FACS 7-AAD ile belirlenen nekrotik hücre % değerleri	66

1. ÖZET

BAZI ENDEMİK *ONOBRYCHIS* TÜRLERİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Kanser türlerinin dağılımı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte Kolorektal Kanserler (KRK) gelişmiş ülkelerde en önemli sağlık problemlerinden biri olarak görülmektedirler. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre KRK tüm kanserler içinde kadınlarda üçüncü, erkeklerde dördüncü sırayı almaktadır. Bitki ve ekstraktlarının antikanserojenik etkileri olduğu saptanmış ve antikanserojenik ilaçların % 63'ünün bitkilerden elde edildiği tespit edilmiştir. Bitkilerden elde edilen bu ilaçların yan etki riskinin az olması ve tedavide başarı oranının yüksek olması, bitki kaynaklarının yeni araştırmalarda odak noktası olmasını sağlamıştır. Çalışmamızda Yabani Korunga türleri olan *Onobrychis argyrea*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* ve *Onobrychis albiflora* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen distile su ekstraktları kullanılmıştır. Bu ekstraktların farklı dozları, İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı (HCT-116) ve İnsan Embriyonik Kök Hücre Hattı (HEK-293) üzerinde denenmiştir. Bitkilerden elde edilen ekstraktların her iki hücre hattının 24 ve 48 saatlik proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu (İK₅₀) MTT analiziyle belirlenmiştir. Antikanser ilaçlarının tümör hücrelerine karşı seçici olması istenirken, bunun yanında sağlıklı hücreleri de öldürebildiği gözlenmektedir. Esas istenen ise sağlıklı hücre hatlarına karşı herhangi bir toksik etki göstermemesidir (6). Bu sebeple çalışmamıza, MTT analizi sonuçlarına göre belirlemiş olduğumuz, HCT-116 hücrelerine karşı en toksik etkiyi gösterirken HEK-293 hücrelerine karşı olabildiğince az aktif olan *O. albiflora* ekstresi ile devam edilmiştir. *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri Caspase 3, Annexin V/PI Apoptoz/Nekroz analizi, Apoptin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz analizi ile araştırılmıştır. Sonuçlarda *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 üzerinde antiproliferatif, apoptotik ve nekrotik etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akış Sitometrisi, FACS, HCT-116, Apoptoz, Nekroz, *Onobrychis*.

Bu araştırma İstanbul Medipol Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 2016/ 18 sayılı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME ENDEMIC SPECIES OF *ONOBRYCHIS* ON COLON CANCER CELLS

Although the distribution of cancer types differs from country to country, it is determined that colorectal cancer is one of the most common cancer type in developed western countries. In our country according to the Ministry of Health, colorectal cancer is the third most common cancer in women and the fourth most common in men in Turkey. The plants and extracts were found to have anticarcinogenic effects and 63% of the anticancerogenic drugs were obtained from the plants, and the efficacy in the treatment was found to be high. These drugs, which are derived from plants, have a low side effects and a high success rate in treatment, which has been the focus of plant resources in new research. In our study, distilled water soluble extracts of wild korunga species *Onobrychis argyrea*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* and *Onobrychis albiflora* were examined. These extracts were tested on human colon cancer cell line HCT-116 and human embryonic stem cell line HEK-293 at different doses. The concentration of inhibitor (IK_{50}) causing 50% cell death at 24 hour and 48 hour was determined by MTT analysis. In our study, antiproliferative and apoptotic effects of *O. albiflora* extract on HCT 116 cell line were investigated by Caspase 3, Annexin V / PI apoptosis necrosis analysis, Apopxin Green and 7-AAD Apoptosis / Necrosis Analysis. In conclusion, *O. albiflora* extract was found to be antiproliferative and apoptotic against HCT-116 cell line. And the further studies to be done with this extract would help come up with new treatment for colon cancer if supported by animal experiments.

Key Words: Flow Cytometry, FACS, HCT-116, Apoptosis, Necrosis, *Onobrychis*.

This research was supported by Medipol University Scientific Research Projects

Support , Project no. 2016/18

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, son yıllarda insidansı ve mortalitesi hızla artan bir hastalıktır. Kanser türlerinin dağılımı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte Kolorektal Kanserler'in (KRK) gelişmiş ülkelerde önemli sağlık problemlerinden biri olduğu görülmektedir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre KRK tüm kanserler içinde kadınlarda üçüncü erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (1).

KRK'nın etiyojisine bakıldığında, temelde kolon mukozasındaki epitelyal hücrelerin genetik değişim süreci söz konusudur. KRK'yı tetikleyen faktörler arasında mutajen etkilere yatkınlık, fekal mutajenler, kırmızı et tüketimi, safra asitleri, yetersiz vitamin ve mineral alımı sayılabilir (2). Bu faktörlerin yanı sıra ailesel adenomatöz polipoziskoli ve herediter non-polipozis kolorektal kanser gibi genetik yatkınlık durumları da söz konusudur (2).

Bitki, sebze ve köklerin içerisinde bulunan doğal bileşiklerin, hastalar üzerinde kullanılması demek olan ve tamamlayıcı tıp yöntemleri arasında sayılan Fitoterapi'nin, eski zamanlardan beri uygulanageldiği bilinmektedir. Tamamlayıcı tıp kullanımı son yıllarda gelişmekte olan ve endüstrileşmiş birçok ülkede düzenli bir şekilde artmıştır. Gelişmiş ülkelerde tamamlayıcı tıp kullanımı Amerika'da %42.1, Avustralya'da %48.2, Fransa'da %49.3, Kanada'da %70.4 iken, gelişmekte olan ülkelere Şili'de %71, Çin'de %70, Kolombiya'da %40 ve Afrika ülkelerinde %80 oranındadır (3). Türkiye Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Onkoloji Polikliniği'nde yapılan bir araştırmaya göre hastaların %57.9'unun tamamlayıcı tedavi yöntemine başvurduğu görülmektedir. Aynı hastaların %70'i tamamlayıcı tıbbi tedavi yöntemini, geleneksel ve olağan tıbbi yöntemlerin yanında almaya devam etmişlerdir (4).

Bitki ve ekstraktlarının antikanserojenik etkileri bulunmuş ve antikanserojenik ilaçların % 63'ünün bitkilerden elde edildiği, ayrıca tedavide tesiri yüksek olduğu tespit edilmiştir (5). Bitkilerden elde edilen bu ilaçların yan etki riskinin az olması ve tedavide başarı oranının yüksek olması, bitki kaynaklarının yeni araştırmalarda odak noktası olmasını sağlamıştır.

Antikanser ilaçlarının tümör hücrelerine karşı seçici olması beklenirken, bunun yanında sağlıklı hücreleri de öldürebildiği gözlenmektedir (6). Esas istenen ise sağlıklı hücre hatlarına karşı herhangi bir toksik etki göstermemesidir (6).

Yeşil çay, ginseng vb. bitkilerin antikanserojenik etkileri olduğu kanıtlanmış ve bu sonuca göre bitkilerin üretildiği ülkelere büyük ekonomik kazançlar sağlamıştır (7). Türkiye’de gittikçe artan bir şekilde çeşitli bitkilerin yapraklarından, çiçeklerinden, kabuklarından veya diğer kısımlarından farklı yöntemlerle elde edilen, genelde sıvı şeklinde formlar, kanserden diyabete kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkilerden bazı antineoplastik ilaçlar da dahil oldukça fazla sayıda çok önemli ilaçlar elde edilmektedir. Türkiye’nin bu açıdan bir avantajı çok zengin bir floraya sahip olması ve ilaç elde edilebilecek bitkilerin yetişmesidir. Türkiye bitki florası yönünden zengin olmasına rağmen tıbbi ve ekonomik bitkilerin antikanserojenik niteliği ve işlevi henüz fazla araştırılmamıştır (8).

Yabani korunga türleri (*Onobrychis sp.*) biyotik ve abiyotik stres koşullarına (soğuğa, kuraklığa, hastalık ve zararlılara, tuzluluğa) dayanma bakımından oldukça geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Ancak bu türler üzerinde çok fazla çalışma bulunmamaktadır (9).

Marais ve ark.’nın sulu aseton ekstraksiyon yöntemiyle yaptığı çalışmada, korunga bitkisinden; afzelin, arbutin, kuersetin, kaemferol, rutin, kuersetin-3-(2(G)-ramnosilrutinoz), L-triptofan, inositol (+)-pinitol, yüksek oranda sukroz (yaklaşık ekstrakte materyalin % 35’i) ve kondanse tanenler elde edilmiştir (10).

Korungadaki flavonollardan kuersetin ve kaemferol’ün antidiaretik, antiülser ve yangı önleyici etkileri olduğu kadar hücresel proliferasyonu önleyici, enzimatik aktiviteyi ayarlayıcı ve serbest radikallerin azaltılması gibi *in vitro* biyolojik etkilerinin de bulunduğu kaydedilmiştir (10).

Kuersetin’in hayvanlarda trombosit kümeleşmesini, oksidatif enzimleri ve anafilaksiyi önlediği bildirilmektedir. Kuersetin ve diğer bazı flavonoidlerin kobaylarda histamin, baryum klorür, asetilkolin, leukotrien D4, prostaglandin E2 ve elektriksel olarak

uyarılan ileum kas kasılmalarını engellediği rapor edilmiştir (11). Bu çalışmalar ışığında direkt sindirim sistemi organlarıyla ve kolon mukozasıyla etkileşime girdikleri gözlenerek kolon kanserinde önleyici bir rol alabilecekleri düşünülmektedir.

Ayrıca daha önceki çalışmalar, Leguminosae ailesinin D-pinitol'ün başlıca kaynaklarından biri olduğunu göstermiştir (12). D-pinitol'ün, NF-kB yolunu inhibe ederek MCF-7 hücre dizisinde apoptozu indüklediği (13), aynı zamanda, prostat kanserinde metastazı inhibe ettiği (14) ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda göğüs kanserinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (15).

Bu çalışmada insan kolon kanseri HCT-116 hücre hattı kullanılarak, 4 farklı endemik korunga ekstratının bu hücreler üzerindeki apoptotik ve antiproliferatif etkilerinin MTT analizleri, apoptoz ve nekroz analizleri ve Kaspaz 3 analizleriyle araştırılması amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Korunga (*Onobrychis*)

4.1.1. Genel Özellikleri

Türkiye coğrafi yapısı ve sahip olduğu farklı ekolojik koşulları sayesinde zengin bir floraya sahiptir. Korunga (*Onobrychis*), Fabaceae (Baklagiller) familyasına ait çok yıllık bir yem bitkisidir. Eski çağlardan beri yetiştirilmekte olan korunga, ülkemizin de yer aldığı Yakın Doğu Florası'nda yaygın olan bir bitki türüdür (16). *Onobrychis* cinsi, Avrupa, Amerika, Batı Asya ve Kuzey Afrika'da yaygın olarak bulunan 160'dan fazla türe sahiptir (17).

Ülkemizde korungaya ait 42 tür endemik olarak bulunmaktadır. Bunlardan *Onobrychis argaea*, *Onobrychis elata*, *Onobrychis argyrea* ve *Onobrychis tournefortii* halihazırda Türkiye tıbbi ve aromatik bitkiler listesine girmiştir (18). Geriye kalan birçok türün de üzerinde araştırma yapılması halinde tıbbi ve aromatik özelliklere sahip olduğunun ortaya çıkarılması muhtemeldir.

Yabani korunga türleri (*Onobrychis* sp.) biyotik ve abiyotik stres koşullarına (soğuğa, kuraklığa, tuzluluğa, hastalık ve zararlılara) dayanma bakımından oldukça geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir. Ancak bu türler üzerinde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. *Onobrychis* cinsi tek yıllık veya çok yıllık otsul yapıda olmakla birlikte, nadiren de dikenli yarıçalılardır. Genellikle tabanda odunlaşmış veya kalın toprakaltı gövdelidir. Gövdesi genellikle kıvrık ve belirgin açık yeşil çizgili ve basit tüylü yahut tüysüzdür. Çiçek durumu eksenseldir ve salkıma benzer. Meyva 1-2 tohumlu, kuruyunca açılmaz, genellikle hafif dairemsidir (19).

4.1.2. Sistematik Sınıflandırma

Çalışmamızda kullanılan *Onobrychis* türlerine ait sistematik sınıflandırma;

Alem: **Plantae**

Alt alem: **Tracheobionta**

Bölüm: **Magnoliophyta**

Sınıf: **Magnoliopsida**

Alt sınıf: **Rosidae**

Takım: **Fabales**

Familya: **Fabaceae**

Cins: ***Onobrychis***

Tür: ***Onobrychis albiflora*, *Onobrychis argyrea*, *Onobrychis tournefortii*, *Onobrychis galegifolia* (20).**

4.1.3. İçerdiği Kimyasal Bileşenler

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda Korunga bitkisinden sulu aseton ekstraksiyonu yöntemiyle afzelin, arbutin, kuersetin, L-triptofan, inositol, yüksek oranda sukroz (ekstrate materyalin yaklaşık %35'i) ve kondanse tanenler elde edilmiştir (21).

Manyetik rezonans spektrokopisi analizinde Korunga yaprağı ekstratlarında 7 sinnamik asit türevi, 9 flavonoid glikozid ve düşük molekül ağırlığına sahip tanenler olduğu tespit edilmiştir (22).

2000'li yıllarda *Onobrychis ebenoides*'den üç yeni 2-fenil-benzofuran izole edilmiştir. Bunlar ebenfuran I, ebenfuran II ve ebenfuran III olarak adlandırılmıştır (17).

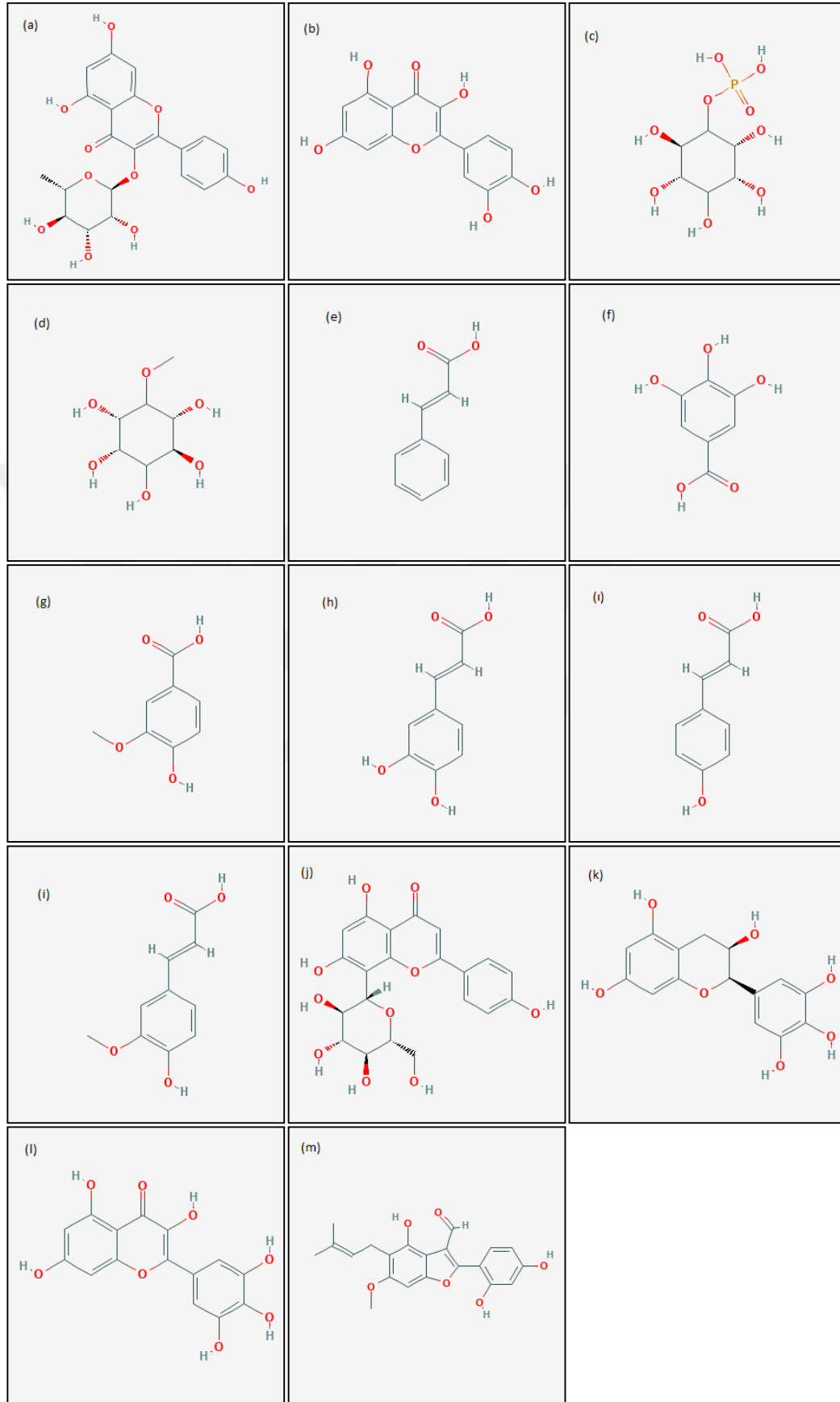
Onobrychis ebenoides türünün ekstratıyla yapılan analizlerin devamında izoflavonlar; ebenosin, afrormosin, formononetin ve daidzein tespit edilmiştir (17). Aynı çalışmaların sonucunda ise *O. ebenoides*'ten beş yeni 3-formil-2-arylbenzofuran izole edilmiş ve yapısal olarak karakterize edilmiştir. Bunlar ebenfuran IV, ebenfuran V, ebenfuran VI, ebenfuran VII, ebenfuran VIII'dir (23).

Sainfoin olarak da bilinen *Onobrychis viciifolia* türünden sulu aseton ekstraksiyonu ile hidrosibenzoyik asitlerden; protokateşik asit, gallik asit, vanilik asit, hidrosinamik asitlerden; kafeik asit, kumarik asit, kafeoil glikoz, kafeoil-DOPA, ferulik asit, feruoliglikozdihidro, flavonoidlerden; dihidrokemferol, dihidrokuersetin, flavanlardan; viteksin, izoviteksin, orientin, katekinlerden; epikatekin, katekin, gallokatekinlerden; epigallokateşin, flavonlardan; kemferol, kuersetin, mirisetin, isorhamnetin izole edilmiştir (24).

Çok sayıda medikal çalışmada kullanılan D-pinitol'un ana kaynağının ise *Onobrychis* cinsinin de içinde bulunduğu Fabaceae (Legüminosae) familyası olduğu gösterilmiştir (25). 1950'li yıllarda Plouvier Victor Fabacea familyasına ait 54 türden yüksek oranda pinitol izolasyonu gerçekleştirmiştir (26).

4.1.4. İçerdiği Onkolojik Bakımdan Önemli Bileşenler

Genel olarak Fabacea familyasına ait *Onobrychis* cinsinin içerdiği kimyasallardan afzelin (27), kuersetin (28), inositol (29), D-pinitol (30), sinamik asit (31), gallik asit (32), vanilik asit (33), kafeik asit (34), kumarik asit (35), ferulik asit (36), viteksin (37), epigallokateşin (38), mirisetin (39), Ebenfuran III (40) ve 2- arylbenzofuran (41) antikanserojen özelliğe sahip bileşiklerdir.



Şekil 4.1.4.1. (a) afzelin, (b) kuersetin, (c) inositol, (d) D-pinitol, (e) sinamik asit, (f) gallik asit, (g) vanilik asit, (h) kafeik asit, (i) kumarik asit, (j) ferulik asit, (k) viteksin, (l) mirisetin, (m) Ebenfuran III.

4.1.5. İçerdiği Bileşenlerin Antikanser Etkileri

Onobrychis cinsinin içeriğinde bulunan ve onkolojik açıdan önemli kimyasallar kısmında bahsi geçen afzelin, kuersetin, inositol, D-pinitol, sinnamik asit, gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, viteksin, orientin, epigallokateşin, mirisetin, Ebenfuran III ve 2-arylbenzofuran kimyasallarıyla yapılmış çok sayıda antikanser etki incelemesi çalışmaları mevcuttur. Aşağıda bu moleküllerin antikanser etkilerine dair yapılmış çalışmaların bazılarından bahsedilmiştir.

Afzelin

Afzelin'in androjen bağımlı prostat kanseri hücreleri (LNCaP) ve androjen bağımsız prostat kanseri hücrelerinin (PC-3) proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT testi uygulanarak değerlendirilmiştir (27). Afzelin'in aktin organizasyonunun düzenlenmesinden sorumlu kinazlar üzerindeki etkisini değerlendirmek için Western Blot Analizi yapılmıştır. LNCaP ve PC3 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve G0 fazındaki hücre döngüsünü bloke ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu antikanser etkisini LNCaP VE PC-3 hücrelerinde LIM domain kinase 1 ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (27).

Kuersetin

Kuersetin'in 10, 20, 40, 80 ve 120 μ M dozları 9 farklı tümör hücre hattına (Kolon kanseri CT-26 hücreleri, prostat adenokarsinomu LNCaP hücreleri, insan prostat PC3 hücreleri, feokromositoma PC12 hücreleri, östrojen reseptör pozitif meme kanseri MCF-7 hücreleri, akut lenfoblastik lösemi MOLT-4 T hücreleri, insan miyelom U266B1 hücreleri, insan limfoid Raji hücreleri ve yumurtalık kanseri CHO hücreleri) uygulanmıştır (28). Annexin V/PI boyamasıyla Kuersetin'in kontrol grubuna kıyasla CT-26, LNCaP, MOLT-4 ve Raji hücre dizilerinin apoptozunu önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (28).

İnositol heksafosfat

İnositol heksafosfat'ın (IP6) antikanserojenik etkisi birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (29). Ayrıca bunu gerçekleştirirken normal hücrelere karşı belirgin bir toksisite de göstermemiştir. Ratlarda 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenmiş

kolon kanseri modeli üzerinde IP6'nın antikanserojenik etkisi ve altında yatan mekanizma araştırılmıştır (29).

PI3K / Akt ve Wnt sinyal yolları hücre proliferasyonu, hücre döngüsü kontrolü ve dolayısıyla kanserle doğrudan ilişkili olan sinyal yollarıdır. Burada herhangi bir mutasyondan kaynaklanan sorunlarda PI3K sinyal iletim sistemi sürekli aktif hale gelir bu da hücrenin anormal olarak çoğalmasına sebep olur (29).

DMH ile indüklenen kolon kanseri modeline IP6 uygulamasını takiben transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde PI3K / Akt ve Wnt yolları ile ilgili genlerin ekspresyonu incelenmiş, aynı zamanda hücre proliferasyon analizi de yapılmıştır (29).

Sonuçlar, IP6'nın DMH ile indüklenen modelde tümör insidansı, sayısı, ağırlığı ve hacmi açısından tümörleri inhibe edebildiğini göstermiştir. Ek olarak, Akt ve c-Myc mRNA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı kaydedilmiştir. IP6'nın ayrıca Akt, pAkt, pGSK-3 β ve c-Myc protein ekspresyonunu indirdiği ve p β -katenin protein ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Sonuç olarak IP6'nın antiproliferatif mekanizmasının PI3K / Akt ve Wnt yolları arasındaki çapraz değişimlerle alakalı olabileceği düşünülmüştür (29).

D-pinitol

D-chiro-inositolün 3-metoksi analogu olan D-pinitol soya gıdaları ve Fabaceae familyasına ait türlerde bol miktarda tespit edilmiş ve kanser hücrelerinin apoptozunu indüklediği ve metastazı engellediği tespit edilmiştir (30). İntegrinler memeli hücrelerinde adhezyondan sorumlu başlıca moleküldür. Bu sebeple metastazla yakından ilişkilendirilmişlerdir. D-pinitol'ün sitotoksik olmayan dozlarının prostat kanseri hücreleri (PC3 ve DU145) ile yapılan çalışmada invazyon ve hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir. D-pinitol ile tedavi edilen prostat kanseri hücrelerinde $\alpha\beta$ 3 integrin'in mRNA ve hücre membranı ekspresyonlarının azaldığı kaydedilmiştir (30). Dolayısıyla D-pinitol'ün prostat kanseri metastazının tedavisinde yeni bir anti-metastaz ajanı olabileceği düşünülmüştür (30).

Sinamik asit

Kolon kanseri hücre serisi olan HT29 hücreleri Trans-sinamik asit (tCA) ile muamele edilmiş ve MTT analizleri sonucu hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan konsantrasyonun (IK_{50}) ~1 mM olduğu belirlenmiştir (30). Bu çalışmada tCA'nın histon deasetilaz (HDAC) üzerindeki etkilerini incelemek ve altta yatan moleküler mekanizmaları saptamak amaçlanmıştır. Yapılan Western Blot Analizleriyle, tCA'nın HDAC inhibitörü Trichostatin A'nın etkileri ile tutarlı olan asetil-H3 ve asetil-H4 proteinlerinin ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Bcl-2 (hücre proliferasyonunun bir belirteci) ekspresyonunun azaldığı ve apoptozun indüklendiği kaydedilmiştir (31).

Gallik asit

Gallik asit doğal bitkilerde bulunan bir trihidroksibenzoik asittir. Gallik asit'in insan nazofaringeal karsinoma hücreleri (NPC-BM1) ve ilgili mekanizma üzerindeki anti-invaziv etkileri araştırılmıştır. Gallik asit, sitotoksik etki göstermeksizin doz ve zamana bağlı olarak NPC-BM1 hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiştir (32). Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)'ler tümör hücrelerinin invazyonundan sorumludur. Afimetrik oligonükleotid mikroarray analizi gallik asit'in NPC-BM1 hücrelerinde kollojenaz 1 olarak da bilinen MMP-1 gen ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bu bulguların nazofarengal kanser metastazını önlemek için yeni bir kemoterapötik madde geliştirmek için yararlı olabileceği belirtilmiştir (32).

Vanilik asit

Vanilik asit doğal olarak bulunan biyoaktif bir maddedir. Serbest radikal temizleme ve antikanserojenik olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahiptir. Hamsterlarda 7,12-Dimethylbenzanthracene (DMBA) ile indüklenmiş bukkal kese karsinogeniz modelinde hamsterlerin plazma ve bukkal mukoza dokularında antioksidan statüsündeki bozulmalar (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz, vitamin E, vitamin C, Glutasyon) ve lipid peroksidasyon yan ürünlerinin (Tiobarbitürik Asit Reaktif Maddeler) seviyelerinin değiştiği gözlemlenmiştir (33). Vanillik asit'in (200 mg/kg) yukarıda belirtilen plazma ve bukkal mukoza biyokimyasal değişkenlerini DMBA ile indüklenen hamsterlerde normal aralığa yakın bir değere geri

getirdiği gösterilmiştir. Reaktif Oksijen Türleri'nin aşırı üretilmesi ve yetersiz antioksidan potansiyelinin, kanserde rol oynadığı düşünülerek Vanilik asit'in dolaylı olarak antikanser etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir (33).

Kafeik asit

Metformin ve kafeik asit insan servikal karsinom SiHa / HTB-35 hücrelerinde metabolik yeniden programlamayı düzenlemesi ve hücre döngüsü düzenlemesi yoluyla Cisplatin'in antikanser aktivitesinin araştırılmasıyla ilgili bir çalışmada ilaçların metastatik servikal kanser hücrelerinin metabolizması ve sağkalımı üzerindeki etkileri gösterilmiştir (34). Test edilen bileşikler tarafından uygulanan metabolik değişikliklerin neoplastik hücrelere spesifik olup olmayacağını değerlendirmek için normal bir hücre hattı referansı olarak normal insan fibroblastları kullanılmıştır (34).

Canlılık ve sitotoksikite analizi için MTT ajanı kullanılmıştır. Apoptoz ve nekroz analizi ise ticari bir kit kullanılarak Floresanla aktive olan hücre ayırıcıda (FACS) ölçüm yapılmıştır. MTT analizi sonucunda, Met, CA ve kombine ilaçların, SiHa hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği ve sitotoksik etki ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Test edilen ilaçların veya kombine tedavilerin hiçbirinin normal fibroblast büyümesini, proliferasyonunu ve morfolojisini etkilemediği bunun yanında herhangi bir sitotoksik etki de sergilemediği ortaya çıkarılmıştır. Met'in tek başına ve CA ile kombine olarak kullanıldığı SiHa kültüründe apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda tek başına CA'ya maruz kalan serviks kanseri hücrelerinde en belirgin ölüm şeklinin nekroz olduğu kaydedilmiştir (34).

Ferulik asit ve Kumarik asit

Bitki fenolikleri olan ferulik asit ve kumarik asit'in kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin gen ekspresyonunu azaltma yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir (35). FA ve pCA, insan kolorektal kanser hücre hattı HCT 15 üzerinde sitotoksik etkileri bakımından test edilmiş ve gerçek

zamanlı PCR analizi ile EGFR gen ekspresyon seviyesi kontrol edilmiştir. Sitotoksosite deneyleri, her iki bileşiğin, kontrollü konsantrasyon temelinde kolorektal kanser hücrelerinin öldürülmesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (35). Ek olarak, EGFR ekspresyonunun, bu bileşikler varlığında azalarak düzenlendiği gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgularla ferulik asit ve kumarik asit'in kolon kanseri hedefli olabileceği vurgulanmıştır (35).

Viteksin

CaCo-2 kolon kanseri hücreleri ve HepG2 karaciğer kanseri hücreleri, konvansiyonel hücreler tarafından indüklenen apoptoza karşı yüksek direnç gösteren iki habis hücre hattıdır. Antikanser ilaçları Vitexin-2-O-xyloside (XVX) ve avenanthramides (AVNs) doğal olarak *Beta vulgaris* var. *Cicla* L. ve *Avena sativa* L. türlerinde bulunan kimyasallardır. Bu iki türün CaCo-2 ve HepG2 hücre hatları üzerinde etkileri araştırılmıştır. XVX and AVNs sıvı kromatografi yöntemiyle izole edilmiş ve bunu takiben anti-proliferatif etkileri sulforhodamine B yöntemi ile değerlendirilirken, caspase etkinlik testleri yoluyla da pro-apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak XVX ve AVN'ler, tek tek ve birlikte, kaspaz 9, 8 ve 3'ün aktivasyonu yoluyla CaCo-2 ve HepG2 kanser hücrelerinin proliferasyonunu engellemiştir (37).

Epigallokateşin

Cisplatin kaynaklı ototoksosite, Cisplatin kemoterapisini sınırlayan en önemli faktörlerden biridir. Ototoksosite, dış saç hücrelerine ve kokleanın diğer bölgelerine hasar verir. Hücresel seviyede cisplatin, koklear inflamasyon ve apoptoza yol açan reaktif oksijen türlerini artırır. Yapılan bir çalışmayla epigallokateşin-3-gallat'ın, bu yan etkileri önlemede bir otoprotektif ajan etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Cisplatin ile indüklenmiş dış saç hücreleri zararı yaratılmış ratlarda, oral yol ile EGCG tedavisinden sonra kokleanın bazal kısmında ve dış saç hücrelerinde oksidatif stresin ve apoptozun azaldığı belirlenmiştir (38).

Mirisetin

Ovaryum kanseri jinekolojik kanserlerin en ölümcül tipidir ve dişilerde küresel olarak kansere bağlı mortalitenin beşinci önde gelen nedenidir. Paklitaksel'in, yumurtalık tümörlerine karşı etkili olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, Taxol tedavisine karşı dirençli bir fenotip geliştirdiğine ilişkin raporlar da yayınlanmıştır (39). Çoklu ilaç direnci (MDR) -1 / P-glikoproteini'nin, bazı yumurtalık tümörlerinde paklitaksel direncinin kazanılması ile ilişkili olduğu daha önce gösterilmiştir. Bu nedenle, bu hastalığın tedavisini geliştirmek için yumurtalık kanseri hücrelerinde MDR-1'i hedefleyebilen ve Taxol'a duyarlılığı artıracak yeni ilaç adaylarının taranmasının gerekli olduğu "Mirisetin yumurtalık kanseri hücrelerinde apoptozu uyarıcı ve kemoterapiyi arttırıcı" isimli çalışmayla belirtilmiştir (39).

A2780 ve OVCAR3 ovaryum kanser hücre hatlarının düşük dozlarda bir Mirisetin ile ön tedavisinde, bu hücrelerdeki MDR-1'in belirgin şekilde azaldığından dolayı Paklitaksel'in sitotoksitesini artırabileceği de tespit edilmiştir (39).

2-arylbenzofurans

Daha önceki çalışmalarla Onobrychis ebenoides'ten östrojen reseptörü düzenleme özelliğine sahip 3 yeni 2-arylbenzofurans **ebenfuran I**, **ebenfuran II** ve **ebenfuran III** izole edilmiştir. MCF-7 (meme kanseri) hücre hattı üzerinde yapılan araştırmalarda **ebenfuran I ve ebenfuran II** MCF-7 üzerinde proliferatif etki gösterirken, **ebenfuran III** proliferasyonu inhibe edici özellik göstermiştir (41).

Ebenfuran III

Doğal olarak oluşan bir benzofuran türevi olan Ebenfuran III, DU-145 prostat kanseri hücre dizisi kullanılarak antiproliferatif etkileri açısından araştırılmıştır. Ebenfuran III, Orta ve Güney Yunanistan'da endemik olan *Onobrychis ebenoides*'den izole edilmiştir. Ebenfuran III 'ün bazı kanser hücre dizileri üzerinde önemli sitotoksik etkileri olduğu bildirilmiştir (40). Bu etkinin, molekülün C-5 pozisyonundaki izoprenil kısmı yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu çalışmanın devamında DU-145 hücre hattında yapılan proteomiks analizleriyle Ebenfuran III'ün etki mekanizması ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır (40).

4.1.6. Antioksidan etkileri

Oksijenin normal fizyolojik konsantrasyonları hücrelerin metabolik aktiviteleri için gerekli iken yüksek miktarda oluşan reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikaller oluştururlar ve DNA mutasyonlarına sebep olurlar.

Kanserin birçok türünün serbest radikal oluşumuyla yakından ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu serbest radikaller hücrelerde iç kaynaklı (endojen) ve dış kaynaklı (ekzojen) olarak oluşurlar. Oksijenli solunum, lökositler, makrofajlar ve peroksizomlar iç kaynaklı oksidan üretimine sebep olurken aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klosapin, 3,4-metilendioksimetamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antidepresanlar, troglitazon, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, nitrik oksit, nitrojen dioksit, silika, bazı solventler, toksinler, hipoklorit, kükürt dioksit, parakuat, dikuat, plumbagin, juglone, ultraviyole ışık, x-ray, gamma radyasyon, sigara ve herbisitler dış kaynaklıdır.

Guanin'in oksidasyonu ile 7,8-dihidro-8-oksoguanin (OxoG) üretilir. OxoG, adenin ve sitozin ile baz çifti oluşturabilmesinden dolayı oldukça mutajendir.

Replikasyonda adenin ile baz çifti oluşturduklarında G:C'den T:A transversiyonuna sebep olurlar. Bu transversiyon insan kanserlerinde yaygın olarak bulunan bir mutasyondur (42).

Bütün aerobik organizmalar antioksidan savunma sistemleri ve enzimlerine sahiptir (43). Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini nötralize edebilmektedirler. Normal sağlıklı durumlarda vücutta üretilen antioksidanlar serbest radikallere karşı vücudu savunmada rol oynarlar. Ancak bu doğal antioksidan mekanizma yeterli olmayabilir. Hastalık durumunda tıbbi bitkiler gibi diğer kaynaklardan gelen antioksidanlar etkili tedavi için gereklidir. Bütile hidroksianizol ve bütile hidroksitoluen gibi yapay antioksidanların yan etkileri bilinmediğinden, antioksidanlarca zengin besinlerin alınması önemlidir. Bol antioksidanlı besinlerin tüketilmesi ile hastalıkların ortaya çıkma olasılığı ters orantılıdır (44,43). Fenol ve flavonoid bileşikler gibi tipik fenolik asitler antioksidan ajanlar olarak bilinirler (45).

Onobrychis hypargyrea'nın metanolik ekstratının antioksidan etkisi serbest radikal temizleme analizi (DPPH) ve radikal katyon temizleme analizi (ABTS) ile gösterilmiştir. DPPH stabil olarak koyu mor renkli olan fakat antioksidanlarla etkileşime girdiğinde sarı, kararlı, diamanyetik moleküle dönüşen bir serbest radikaldir. ABTS ise normal şartlarda mavi olup hidrojen donörü varlığında renksiz bir şekle dönüşen radikal katyondur. *O.hypargyrea ekstratı* hem DPPH hem de ABTS'yi indirgemede oldukça başarılı olmuştur. Bunu içerdiği yüksek fenol içeriği sayesinde gerçekleştirmiştir (46).

Onobrychis armena türünün metanolik çiçek ve kök ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, total antioksidan aktivite, serbest radikal aktivite, ferrik iyon azaltıcı güç ve kuprik iyonu azaltan antioksidan kapasite deneyleri ile belirlenmiştir (47). Sonuçlar, *O. armena*'nın çiçek ve kök ekstraktlarının doğal antimikrobiyal ve antioksidanların potansiyel bir kaynağı olabileceğini ve gıda endüstrisinde, ilaç keşfinde, klinik ve gıda kimyasında ve insan ve balık patojenlerine karşı doğal bir kaynak olarak kullanılabileceğini göstermiştir (47).

Onobrychis viciifolia'nın metanolik ekstratının total fenolik ve flavonoid içeriğinin ve antioksidan etkisinin araştırıldığı çalışmada Folin-Ciocalteu reaktif yöntemiyle yüksek oranda fenol içeriğine, $AlCl_3$ metoduyla yapılan analizde ise yine yüksek oranda

flavonoid içerdiği gösterilmiştir. Ekstratın antioksidan analizinin sonuçları sentetik antioksidan askorbik asit (% 71.26) ile karşılaştırıldığında mükemmel bir antiradikal etki göstermiştir (48).

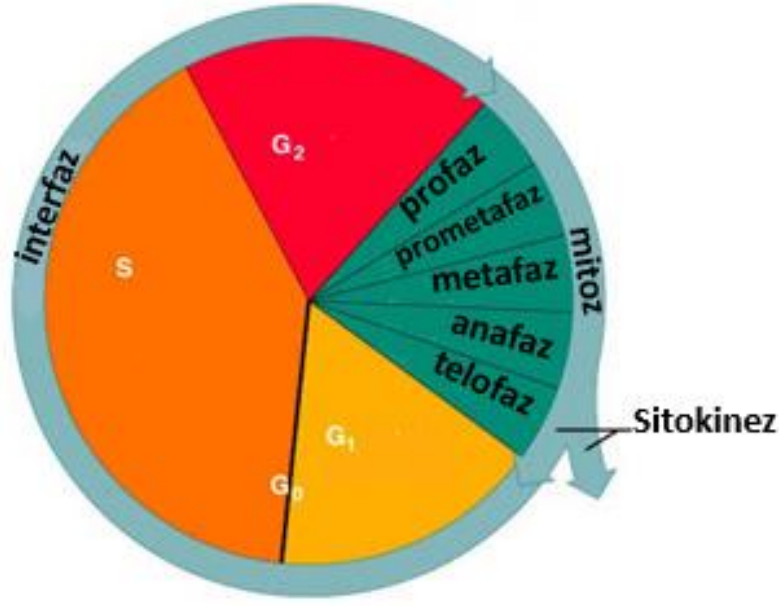
Yine *Onobrychis viciifolia*'nın metanolik ekstratıyla yapılan başka bir çalışmada bu etkinin, ekstrat içeriğinde bulunan sistein, glutatyon, askorbik asit, tokoferol, polihidroksi aromatik bileşikler (hidrokuinon, pirogallol vb.) gibi bileşiklerden kaynaklandığı gösterilmiştir (49).

4.2. Kanser

4.2.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü temel olarak iki bölümde gerçekleşir. Bunlardan ilki bölünme için gerekli hazırlıkların yapıldığı “İTERFAZ” sürecidir. Diğer ise bunu takip eden bölünmenin gerçekleştiği “MİTOZ” evresidir. Bu iki sürecin tamamı sırasıyla G1, S, G2 ve M fazlarıyla meydana gelir (50).

G1 interfaz sürecinin ilk fazıdır. Mitozun bitişi ile DNA sentezinin başlangıcı arasında kalan, replikasyon için (DNA sentezi) gerekli proteinlerin sentezlendiği hazırlık fazıdır. S fazında ise DNA replikasyonu gerçekleşir ve kromozom sentezi bu fazda tamamlanır, hücre diploid özellik kazanır. Sentez tamamlandıktan sonra hücre G2 fazında mitoz hazırlığı başlatır. Mitoz sürecinde gerekli olan mikrotübüller bu fazda sentezlenir. Mitoz (M) fazında ise nükleusun (karyokinez) ve sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi gerçekleşir. Kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınması bu fazda gerçekleşir. Bu faz sonucunda iki yeni kardeş hücre meydana gelir.(50)



Şekil 4.2.1.1. Hücre döngüsünün evreleri (124).

4.2.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Düzenlenmesi

Hücre döngüsü geçişlerinin ve kontrol noktalarının efektörlerinin anahtar düzenleyicileri siklin ve siklin bağımlı kinazlardır (Cdk). Siklin bağımlı kinazlar normalde inaktif formdadırlar. Siklinlerle birleştiklerinde heterodimer hal alırlar ve aktifleşirler. DNA replikasyonunu teşvik etmek için, CDK / siklin kompleksleri, DNA sentezinde yer alan genlerin aktivasyonu için gerekli proteinleri fosforile eder. Farklı CDK / siklin kompleksi setleri, hücrelerin mitoz bölünme gerçekleştirmesi için sayısız proteinin fosforilasyonunu tetikler (51).

Hücre döngüsü geçişlerinde, siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve bu kinazların inhibisyonu, hücre döngüsünün durdurulmasına neden olur (52,53).



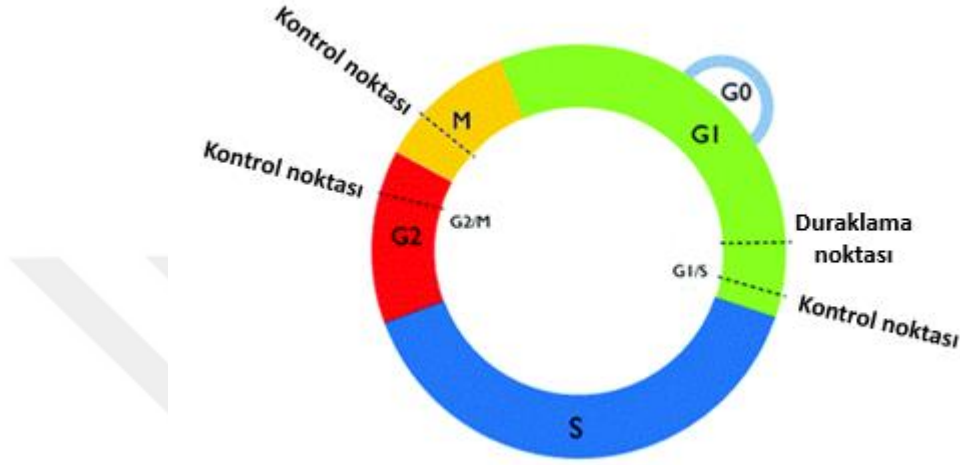
Şekil 4.2.2.1. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan siklinler ve siklin bağımlı kinazlar (51).

Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesinde çeşitli kontrol noktaları (restriksiyon noktaları) mevcuttur. Bu noktalarda hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için uygun koşulların sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilir. G1 fazı kontrol noktası hücre yaşam döngüsündeki dominant kontrol noktasıdır. Burada hücrenin S fazına geçişi kontrol edilir. Eğer gerekli şartlar sağlanmamışsa hücre yaşam döngüsü bu noktada kalıcı olarak durdurulabilir (54,55,56,57). Burada siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve siklin D'nin biraraya gelmesiyle oluşan heterodimer yapı S fazına geçişi uyarır. Tümör baskılayıcı p16 ve p21 proteinleri ise CDK4 'ün inhibisyonunu sağlayarak hücreyi G1 fazında duraklatır (58).

G2 kontrol noktasında hücrenin DNA hasarı kontrol edilir. G2 kontrol noktasının kritik hedefi, siklin B / CDK1 kinazın mitoz-teşvik edici aktivitesidir. Hasar var ise CDK'ları aktive eden mitoz başlatıcı faktör (MPF) inhibe edilir (59).

Yine p21 proteini p53 yolağı üzerinden CDK kompleksini inhibe eder. Bu sayede hücre döngüsü G2'de duraklatılmış olur (58) .

Üçüncü ve önemli bir kontrol noktası da metafazda kromozomların dizilmelerini düzenler. Metafazdan Anafaza geçiş siklin A'ları parçalayan böylece MPF'i inaktive eden yubikütün proteoliz sistemini aktive eder. Mitoza girerken yubikütün degradasyon yolu MPF tarafından indüklendiğinden MPF, kendi inaktivasyonunu kendisi tetiklemiş olur (60,61,62).



Şekil 4.2.2.2. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan kontrol noktaları (125).

4.2.3. Kanser ve Hücre Döngüsü

Kanser, vücudun herhangi bir bölümünü etkileyebilecek geniş bir hastalık grubu için genel bir terimdir. Kullanılan diğer terimler malign tümörler ve neoplazmlardır. Kanserin tanımlayıcı özelliklerinden biri, olağan sınırlarının ötesinde büyüyen ve diğer organlara yayılabilen anormal hücrelerin hızla oluşmasıdır ve bu son süreç metastaz olarak adlandırılır. Metastazlar kanserden ölümlerin önemli bir nedenidir. Kanser 2015 yılında dünya çapında 8.8 milyon ölüm oluşturan tüm ölümler arasında önde gelen nedendir. Ölümle sonuçlanan başlıca kanser çeşitleri akciğer (1.69 milyon ölüm), karaciğer (788 000 ölüm), kolorektal (774 000 ölüm), mide (754 000 ölüm), meme (571 000 ölüm) olarak 2015 yılı istatistiklerine yansımıştır. Kanser normal hücrelerin çok aşamalı bir süreçle malign tümör hücrelerine dönüşmesinden kaynaklanır. Bu dönüşüm genel olarak, kişinin genetik faktörleri ile dış ajanların etkileşimi sonucu meydana gelir. Bu dış ajanlar olarak; ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojen maddeler, asbest, tütün dumanı bileşenleri,

aflatoksin (gıda kontaminasyonu), arsenik (içme suyu kontaminasyonu) gibi kimyasal kanserojen maddeler ve bazı virüslerden, bakterilerden veya parazitlerden gelen enfeksiyonlar gibi biyolojik kanserojenler sayılabilir (63).

Kanser hücrelerinin diğerk doku ve organlara yayılması kan ve lenf sistemiyle gerçekleşir. Köken aldıkları hücre veya doku bakımından isimlendirildiklerinde, karsinomalar iç organları kaplayan dokularda, sarkomalar; kıkırdak, kemik, yağ, kas, kan damarları ve diğerk bağ dokularda, lenfoma ve myeloma savunma sistemi hücrelerinde, lösemi kemik iliğı dokularında başlayan kanserlerdir.

Kanser gelişiminde genetik faktörler büyük rol oynar. Laboratuar hayvanlarından elde edilen deney verileri farklı konaklarda aynı derecede DNA hasarı, onkogenlerde veya tümör baskılayıcı genlerde aynı mutasyonların çeşitli kanser gelişiminde rol oynadığını göstermiştir. Bunun sebebi çok sayıda polimorfik tümör yatkınlık genleridir.

İnsan kanserleri kaynağına göre ailesel kanserler ve sporadik kanserler olarak iki ana tipe ayrılabilir. Ailesel kanserler, ailesel retinoblastom, ailesel adenomatöz polipozis koli, Lynch sendromu (kalıtsal poliplesiz kolon kanseri), ailesel nörofibromatoz, ailevi meme ve BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları ile ilişkili yumurtalık kanseri, Li-Fraumeni sendromu gibi bazı kalıtsal kanser sendromları oluştururlar. Sporadik tümörler ise tüm kanser vakalarının büyük çoğunluğunu (yaklaşık % 95) oluşturur ve belirgin ailesel bir model olmadan, görünüşte rastgele bireyleri etkilerler (64).

Kanserin oluşum mekanizmasıyla hücre döngüsü kontrolü direkt olarak ilişkilidir. Çünkü hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunu veya işlevini etkileyen hücre genomundaki değişiklikler, kanserin başlıca nedeni olarak kabul edilir (65).

DNA hasarı, bir hücrenin yaşamında yaygın bir olaydır ve mutasyona, kansere hücreSEL veya organizma ölümüne neden olabilir. DNA hasarı hücrede hasarın ortadan

kaldırılması, hasarla başa çıkılması veya programlanmış hücre ölümüne gidilmesi gibi birtakım hücresel tepkiler doğurur. Bu tepkiler DNA hasarının çift taraflı olarak ortadan kaldırılmasıyla DNA'nın sürekliliğini sağlamak, hücre döngüsünü durduran bir kontrol noktasının harekete geçirilmesi, hücre için yararlı olabilecek transkripsiyon profilindeki değişiklikler, ağır hasar gören veya ciddi şekilde düzenlenmemiş hücreleri ortadan kaldıran apoptoz şeklindedir. Bunları gerçekleştiren DNA tamir mekanizmaları; direkt tamir, baz eksizyonu(kesip-çıkarma), nükleotid eksizyonu, çift zincir kırıklarının tamiri, çapraz bağlantıların tamiridir.

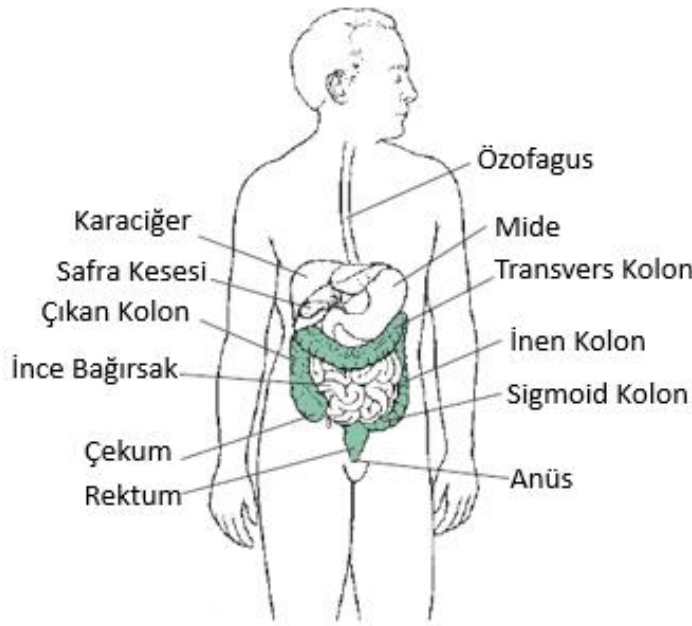
DNA hasar kontrol noktaları, DNA hasarını saptamak ve Chk1 ve Chk2 Ser / Thr kinazları ve Cdc25 fosfatazları kullanan sinyal iletim kaskadlarını başlatmak için ATM, ATR, Rad17-RFC kompleksi gibi hasar sensörü proteinlerini kullanır. Bu proteinler, p53'ü aktive ederken ve siklin bağımlı kinazları inhibe ederek hücre döngüsünü G1'den S'ye (G1 / S kontrol noktası), DNA replikasyonunda (S-kontrol noktası) veya G2'den mitozaya (G2 / M kontrol noktası) geçişte durdurur (66).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü DNA tamir enzimlerinde inaktifleştirici, proto-onkogenlerde aktifleştirici, tümör baskılayıcı genlerde inaktifleştirici etkiye sebep olan bir takım mutasyonların sonucu aşamalı olarak ortaya çıkar.

4.3. Kolorektal Kanser

4.3.1. Genel Özellikleri

Kolon, rektum, çekum ve anal kanal sindirim sisteminin kalın bağırsak denen kısmını oluşturur. Kolon; çıkan kolon, inen kolon transvers kolon, sigmoid kolon olarak 4 bölümden oluşur. Çıkan kolon çekum denilen, ince barsaktan sindirilmemiş yiyeceklerin alındığı ve karnın sağ tarafına doğru uzanan bir kese ile başlar. S şeklindeki sigmoid kolon ise anüsle bağlantısı olan rektuma katılır. Kolon ve rektum kanserleri bu iç yüzeyini örten tabakadan gelişir. Kolon kanseri veya kolorektal kanser; rektum, kolon ve apandisitte oluşan kanserlerin tamamını kapsar.



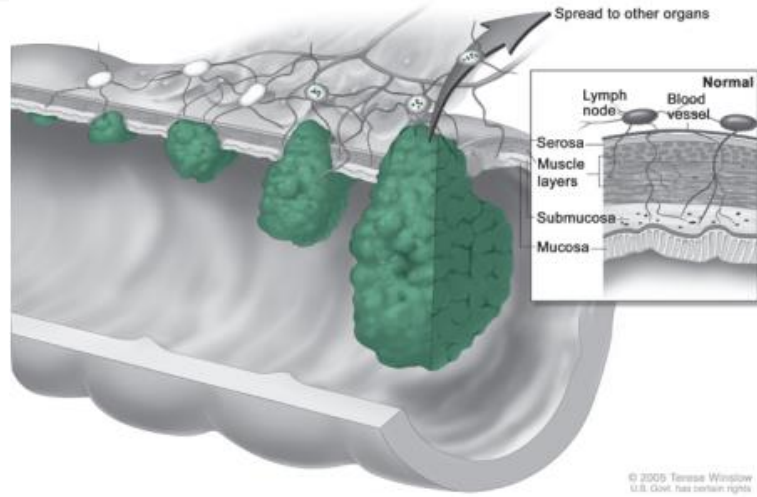
Şekil 4.3.1.1. Kalın bağırsağın anatomik bölümleri (69).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı verilerine göre tüm dünyada çeşitli kanser tiplerinden kaynaklanan 8.8 milyon ölüm olmuştur. Ve dünya genelinde kolon kanseri en yüksek dördüncü insidansa, en yüksek üçüncü mortaliteye sahiptir. 2014 Türkiye verilerine göre kolorektal kanserler erkeklerde her 58.400 ölümün %7 sini oluşturarak

dördüncü sırada kadınlarda ise her 32.500 ölümün %9.1'ini oluşturarak üçüncü sıradadır. Beslenme geleneklerine, sosyoekonomik durumlara ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak kolon kanseri insidansları ülkeler arasında değişim göstermektedir (67).

Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğunu adenokarsinomlar oluşturmaktadır. Bunun yanında tüm kolorektal kanserlerin %2 ila 5'ini oluşturan çeşitli histolojik tipler vardır. Bunlar malign karsinoid, malign lenfoma, karsinoid olmayan nöroendokrin karsinom, skuamöz hücre karsinoması ve sarkomayı içerir (68).

Kalın barsak mukozasının herhangi bir yerinde gelişim gösteren kolorektal kanser hücresi gelişimi kolon veya rektumun duvarına kadar büyüyebilir. Duvara kadar büyüyen kanser kan ve lenf damarlarına nüfuz eder. Lenf damarları, hücresel atıkları ve sıvıyı uzaklaştıran ince kanallardır. Tipik olarak kanser yakınında bulunan lenf düğümlerine yayılma eğilimindedir. Kanserli hücreler kan damarlarıyla karaciğer, akciğerler, pelvis, periton (karın zarı) ve yumurtalık gibi diğer organlara ve dokulara yayılabilir. Ayrıca kanserli hücrelerin beslenme amacıyla kan damarlarını kendilerine çekerek yeni damarlar oluşturabilme yetenekleri vardır (69).



Şekil 4.3.1.2. Kolon kanserinin evreleri (69).

Kolon kanseri sporadik, kalıtsal veya inflamatuvar bağırsak gibi temellerle ilgilidir (70,71). Kolorektal kanserler, Lynch sendromu (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer-HNPCC), ailesel adenomatöz polipozis (FAP), MYH (mutY human homologue geni) ile ilişkili adenomatöz polipozis, bazı hamartomatöz polipozis Peutz-Jeghers sendromu ve juvenil polipozis sendromu gibi iyi tanımlanmış kalıtsal sendromların oluşmasıyla ortaya çıkabilir. Sendromların yanı sıra, kolon kanserlerinin üçte biri kadarı kalıtıma bağlı ailesel risk artışı ile ortaya çıkmaktadır. Fakat bu sendromlar KRK vakalarının sadece% 2-6'sını oluşturur. Bunlar haricindeki KRK'lerin büyük çoğunluğunun tanımlanmış bir kalıtsal nedeni yoktur (71).

Sporadik KRK'li hastaların akrabalarının hastalığa yakalanma riski yüksektir. Burada tam olarak karakterize edilmemiş dominant yatkınlık genlerinden bahsedilebilir. Buna karşılık KRK'nin ailesel kümelenme, FAP ve HPNCC gibi tanımlanmış genetik sendromların bir parçası olmadığına bile olduğu genel olarak bilinmektedir (72,73).

4.3.2. Kolon Kanseri ve İnflamasyon

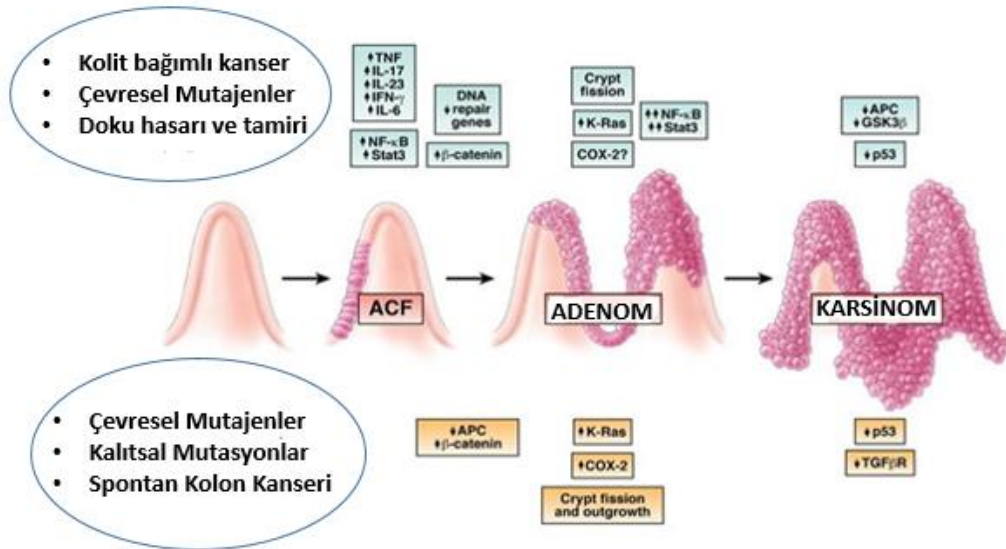
İnflamasyon, enfeksiyon, hasar veya çeşitli fiziksel ajanlar (ısı ve radyasyon gibi) ile oluşur ve ayrıca kronik hastalıkların ve tümörögenezin patojenezinde rol oynar (74). Bir enflamatuvar süreç başlayınca makrofajlar, interlökinlerin veya büyüme faktörlerinin etkisi ile çoğalır veya aktive olurlar (75).

Kronik iltihap oluştuğunda, makrofajlar zararlı bir etkiye sahiptir. Hücre dışı matriksi yok etmeyi, apoptozu, hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi teşvik ederler. Fakat böyle durumlarda apoptoz mekanizmasında kontrol rolü oynayan enzimler ve genler mutasyona uğramış veya hasar görmüş ise tümör gelişiminin ortaya çıkması da söz konusudur. Bu yüzden inflamasyonun ve onun inhibisyonunu sağlayacak mekanizmaların iyi bilinmesi gerekir. (76,77).

Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar kaynaklı olan hastalarda KRK gelişimi riski artmaktadır. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında (IBD) kolorektal kanser yatkınlığını açıklayan bilinen bir genetik temel bulunmamaktadır. Burada

kansere neden olan etmenin kronik iltihaplanma olduğu varsayılmaktadır. İltihaplanmaya bağlı kolon kanseri Kolit Bağımlı Kolon Kanseri olarak da adlandırılır. İnflamasyondan kaynaklanan kanser gelişimi; uzun kolit süresiyle, kolitin anatomik olarak daha geniş alana yayılmasıyla, primer sklerozan kolanjit gibi diğer enflamatuvar belirtilerin eşlik eden varlığıyla ortaya çıkar.

İnflamasyonu tedavi etmek için kullanılan bazı ilaçlar, örneğin 5-aminosalisilatlar ve steroidler, kolorektal kanser gelişimini engelleyebilir. Sporadik kolorektal kansere yol açan yolaklar, yani kromozomal kararsızlık, mikro-satellit bozuklukları ve aşırı metilasyon, aynı zamanda kolitle ilişkili kolorektal kanserlerde de ortaya çıkar. Fark olarak Sporadikte bulunan "adenom-karsinom" sekansı IBD'de "inflamasyon-displazi-karsinom" sekansı haline gelir. Ayrıca inflamasyona bağlı olarak ekspresyonları değişen NF-kB ve siklooksijenazlar gibi diğer faktörler de kolite bağlı KRK gelişimini hızlandırır (78). IBD'ye bağlı ve kalıtsal olarak ortaya çıkan KRK 'nin moleküler gelişiminde belirgin benzerlikler mevcuttur. Aşağıdaki şekilde her ikisinin mekanizması gösterilmektedir (70).



Şekil 4.3.2.1. Kolorektal kanserin mekanizması ve kolit-bağımlı kanserin gelişimi (70).

4.3.3. Siklo-oksijenaz-2 (COX-2) ve Kolorektal Kanserler

COX-1 ve COX-2 olarak iki adet COX enzimi tanımlanmıştır. COX-1, yapısal olarak eksprese edilir ve normal hücre metabolik işlevlerinin bir parçasıdır. Buna karşılık COX-2 neoplastik büyümelerde indüklenir ve eksprese edilir.

COX-2 ekspresyonu ve karsinogenez arasındaki bağlantı, ilk olarak kolon kanseri riskini azaltmak ve hem insanlarda hem de hayvan modellerinde tümör gerilemesini arttırmak için aspirin ve steroidal olmayan anti-inflamatuvar ilaçların etkinliğini gösteren çalışmalarda yer almıştır. Moleküler olarak incelendiğinde, insan ve hayvan kolorektal tümörlerinde yüksek seviyelerde COX-2 proteininin mevcut olduğu gösterilmiştir (70). Epidemiyolojik, tüm hayvansal ve hücresel araştırmalardan toplanan çeşitli kanıtlar, düzensiz COX-2 ekspresyonunun tümörögenizde hız sınırlayıcı bir adım olduğunu kaydetmiştir (79).

İnsan kolon karsinomlarının % 80'inden fazlasında COX-2'nin aşırı ekspresyonu kaydedilmiştir ve kanser hücresi sağkalımını ve tümör anjiyogenezisini destekleyen önemli bir oyuncu olduğu düşünülmektedir. HT-29 kolon kanseri hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada COX-2 mRNA ve protein seviyelerinin inflamatuvar sitokin tümör nekroz faktörü (TNF) tarafından 10 kat artırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca histone deasetilaz inhibitörleri butirat ve trichostatin A'nın gen-spesifik bir şekilde COX-2 aktivasyonunu bloke edebildiği bulunmuştur. Farklı hücre ve dokularda değişen sayılarda sitokin, fizyolojik stres, onkojen ve mitojenlerin COX-2 yi indüklediği gösterilmiştir (80).

Araşidonik asit'in hücre zarından ayrılıp metabolize olması siklooksijenaz, lipoksijenaz ve sitokrom P-450 yoluyla pro-inflamatuvar metabolitlerin üretilmesini indükler. 5-lipoksijenaz enzimi (5-LOX) ve COX enzimi inflamatuvar yanıtta en önemli iki yolaktır. Bunlar sırasıyla lökotrienler ve prostaglandinlerin oluşumuna neden olan paralel yollardır ve inflamatuvar cevabın başlatılması ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır. Bu vazoaktif bileşikler, inflamatuvar hücrelerin dokulara infiltrasyonunu teşvik eden kemotaksinlerdir ve bunların varlığı inflamatuvar cevabı

uzatmaya da hizmet eder. COX-2'nun aşırı ekspresyonun prostaglandin E2 ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit (5-HETE)'in üretimini indüklediği bunun da apoptozu önlediği ve tümerojenik hücrelerin yayılma yeteneklerini arttırdığı gösterilmiştir. (81,82).

Günümüzde inflamasyon ve kanserin tedavisi için sentetik COX-2 inhibitörleri ve steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar geliştirilmiştir. Bu sentetik COX inhibitörlerinden bazıları, NS-398, Rofekoksib, Indometasin ve Aspirindir (83). Ancak bu sentetik ilaçların kanıtlanmış çok sayıda ciddi yan etkileri mevcuttur. Örneğin üst gastrointestinal ülser komplikasyonları azaltmak için geliştirilen Celecoxib'in doza bağlı olarak kardiyovasküler sebeplerden, miyokardial enfarktüse, felç veya kalp yetmezliğine sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yine sentetik bir COX-2 inhibitörü olan Rofecoxib kardiyovasküler trombotik olaylara sebep olmaktadır (81).

İnflamasyona bağlı kolon kanserinde COX-2 ekspresyonunun artışının inflamatuvar cevabı uzatmada etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda , COX-2 nin inhibe edilmesinin kanser gelişimini azaltabileceği düşünülebilir.

Sentetik ve non-steroidal anti-inflamasyon ajanlarının yan etkileri dikkate alındığında doğal COX-2 önleyicilerin daha güvenilir olduğu söylenebilir. Fakat bunun kanıtlarını ortaya koymak için etkili doz ve sıklığının nasıl olacağı üzerinde yapılan çalışmaların artırılması gerekir.

Aşağıda daha önce bahsettiğimiz *Onobrychis* sp. türleri içinde bulunan bileşiklerden, doğal selektif COX-2 inhibitörü özelliğine sahip olanlardan bahsedilmiştir.

Prunus tomentosa türünün tohumlarından izole edilen Afzelin ve Kaempferol ile yapılan çalışmada bu bileşikler hem güçlü serbest radikal temizleme aktivitesi hem de NO ve COX-2 üzerinde güçlü inhibisyon aktiviteleri sergilemiştir (84).

Lipopolisakkaritler, COX-2, MCP-1, CXCL1 ve IL-6'nın mRNA indüksiyonuna neden olur. Arbutin'in lipopolisakkarit indüklü BV2 mikrogial hücrelerdeki anti-inflamatuvar etkilerinin araştırıldığı çalışmada sonuçlar Arbutin'in COX-2, MCP-1, CXCL1 ve IL-6 mRNA düzeylerini önemli ölçüde zayıflattığını göstermiştir (85).

Aynı modelde yapılan başka bir çalışmada Orientin-2''-O-galactopyranoside (OGA) flavonu kullanılmıştır. Sonuçlar OGA'nın LPS ile indüklenen TNF- α , interlökin-1 β , NO sentaz ve COX-2'nin ekspresyonunu belirgin bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (86).

İnositol heksafosfat , baklagiller ve tahılların ağırlığının yaklaşık % 1 ila 5'ini oluşturur (87). Pirinçten izole edilen İnositol Hexafosfat'ın, Wnt / β -Katenin ve COX-2 yolları aracılığı ile kolorektal kanserin inhibisyonuna etkisinin araştırıldığı bir çalışmada Ratlara intraperitoneal olarak spesifik bir kanserojen madde azoksimetan enjekte edilmiştir. Western blot analizleri β -katenin ve COX-2'nin AOM ile indüklenen sıçanlarda aşırı eksprese edildiğini göstermektedir. IP6 ile tedavi sonrası COX-2 ekspresyonu mRNA seviyesinde azalarak düzenlenmiştir. Ve AOM ile indüklenen RAT kolon karsinogenezisinde COX-2 protein ekspresyonu anlamlı şekilde azalmıştır (88).

İNOS / COX-2 ekspresyonuyla, NF-kB'nin transkripsiyonel aktivasyonu interlökin-1b, TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınmasını tetikler. RAW 264.7 hücre hattında (rat makrofaj hücre hattı) LPS / IFN-g ile indüklenen endojen bir tümör yükseltici olan TNF- α 'nın serbest bırakılması sağlanmıştır. Ve daha sonra ferulik asit 15 'in hidrofobik bir türeyle tedavi edilmiştir. FA'nın 100 mM'lik bir konsantrasyonu, iNOS ekspresyonunu % 38 oranında önemli ölçüde bastırmıştır. Fakat tek başına FA, COX-2 ekspresyonunu 100 mM'lik bir konsantrasyonda anlamlı olarak azaltamamıştır (89).

Üç sentetik COX-2 önleyici (NS-398, indometasin ve aspirin) referans alınarak yapılan çalışmada pirogallol, sinamik aldehit, mirisetin ve kafeik asit, 100 uM konsantrasyonda % 30'dan fazla inhibisyon göstermiştir (83).

Pinitol, çam ağacı, yonca ve bakliyatda bulunan doğal olarak oluşan bir bileşiktir. Özellikle Fabacea familyası bitkileri pinitolün ana kaynağıdır. Pinitolün insülin benzeri etkilere sahip olduğu, kas hücrelerine diğer besin maddelerinin yanı sıra kreatini çektiği iyi bilinmektedir. (90,91,92).

Ayrıca pinitolün antiinflamatuvar aktivite de dahil olmak üzere çok fonksiyonlu özelliklere sahip olduğu öne sürülmüştür (93). Ratlarda Karajena'nın indüklediği pençe ödem testinde Pinitol'ün referans gruplara oranla belirgin bir şekilde inflamasyonu geriletmediği gösterilmiştir (94).

Bu bilgiler dikkate alındığında *Onobrychis* türlerinde bulunan değişik kimyasal bileşenlerin seçici COX-2 inhibitörü olma özellikleri sayesinde kanser gelişiminin önlenmesinde potansiyel bir etkiye sahip olduğu söylenebilir.

4.3.4. NF-kB ve Kolorektal Kanserler

NF-kB'nin aktivasyonu, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve tirozin kinazlar tarafından tetiklenen farklı sinyal yollarından kaynaklanabilir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü, insülin büyüme faktörü reseptörü ve tümör nekroz faktörü reseptör ailelerinin üyelerinin artmış ekspresyonu NF-kB aktivasyonundan sorumlu olabilir. Dahası, Ras / MAPK ve PI3K / Akt gibi diğer sinyal yollarının aktivasyonu, NF-kB'nin aktivasyonunda da rol oynar (95).

NF-kB ailesinin beş alt birimi p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 / p105 (NF-kB1) ve p52 / p100 (NF-kB2) , uyarılmamış hücrelerde homo veya heterodimerler şeklinde IκB ailesi proteinlerine bağlı olarak bulunur (96).

IκB'ye bağlanma NF-kB: IκB kompleksinin çekirdeğe transloke olmasını engeller, böylece NF-kB'yi inaktif durumda tutar. NF-kB sinyallenmesinin, klasik ya da alternatif yollarla meydana geldiği düşünülür (97).

NF-kB'nin aktivasyonunda klasik ve alternatif olarak iki sinyal yolağı tanımlanmıştır. Klasik yolda proinflamatuvar sitokinler ve patojenle ilişkili moleküler modeller, tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNFR), çan benzeri reseptörler ve interleukin-1 reseptörü vasıtasıyla IκB kinaz kompleksinin aktivasyonuna neden olur. NF-kB'nin klasik mekanizması KKK ve Kolitis Bağımlı kanserde de gerçekleşmektedir (70). Kolorektal karsinomalarda NF-kB ve COX-2 ekspresyonu artmıştır. Aksine, COX-2, NF-kB ve IκKa'nın neoplastik olmayan kolon epitel hücrelerinde minimal

ekspresyonu, bulunmuştur (98). Hastaların serum örneklerinde analiz edilen TNF- α ve IL-6 ekspresyonu kolorektal adenoma riski ile bağlantılıdır (70).

4.3.5. Kolorektal Kanser ve Çevresel Faktörler

Genetik faktörlerin yanı sıra kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu çevresel etkililerle ilgilidir. Risk faktörlerini çevresel ve besin kaynaklı mutajenler, özel bağırsak kommensalleri ve patojenleri, tümör oluşumu öncesi gelişen kronik bağırsak inflamasyonları içerir (70, 99, 71).

Fiziksel aktivitenin rektal kanserde olmasa da kolon kanserine yakalanma riskini azalttığı ve fiziksel olarak aktif kişilerde distal ve proksimal tümörlerin gelişme riskinin diğerlerine göre %25 oranla daha az olduğu gösterilmiştir (100, 101).

Normalden fazla vücut ağırlığı kolorektal kanserle yakından ilişkilidir. Normal vücut ağırlığına sahip bireylerle karşılaştırıldığında obez erkeklerin kolon kanseri riski yaklaşık %50, kadınların ise yaklaşık %20 daha fazladır (102).

Diyet, kolorektal kanser gelişiminde önemli bir role sahiptir. Birçok araştırmada, günlük beslenmeyle süt ve süt ürünlerinden ve gıda takviyelerinden alınan kalsiyum tüketiminin, adenom ve kolorektal kanserlerin gelişme riskini azalttığı ortaya konmuştur (103, 104, 105,106).

Yüksek oranda lifli gıdalarla beslenme kolorektal kanser dahil birçok kanser gelişim riskini azaltmaktadır. Lifli gıdalarla beslenme dışkı hacmini azalttığı için kanserojenlere daha az maruziyet sağlar ve dolaylı olarak kolorektal kanser gelişim riskini azaltabilir. Bunun için beslenmede yüksek oranda lif içeren meyve sebze tüketimine dikkat edilmelidir. (103).

2015 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, işlenmiş kırmızı eti “büyük olasılıkla insanlar için kanserojen” olarak sınıflandırmıştır. Kolorektal kanser riskini artırmada kırmızı etin rolüne dair çalışmalar devam etse de ,kırmızı etin genel olarak işlenme(pişirilme,saklanma vb.) prensiplerine bağlı olarak riskli olabileceği kaydedilmiştir (108, 109).

Kanda yüksek Vitamin D oranı yaratmanın kolon kanseriyle ilgisini kesin olarak kanıtlamış bir çalışma yoktur. Ayrıca günlük Vitamin D takviyesinin araştırıldığı

klirik bir çalışmada bulgular Vitamin D'nin adenom gelişme riskini azaltmadığını göstermiştir (107).

2009 yılı kasım ayı verilerine göre Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı, tütün içilmesinin kolorektal kansere neden olduğuna dair yeterli kanıtın olduğunu bildirmiştir (110).

Ayrıca kolorektal kansere yakalanmış halihazırda mevcut sigara içicilerde kolorektal kansere spesifik sağ kalım oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir (111).

Hiç alkol tketmeyenlerle arada sırada alkol tüketenlerin karşılaştırıldığı klirik bir araştırmada günde 2 ila 3 arasında alkollü iki tüketenlerde kolorektal kansere yakalanma riskinin %20 den daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Günde 3 ve üzerinde alkollü iki tüketenlerde ise bu risk %40'lara kadar çıkmaktadır (112).

4.4. Apoptoz

4.4.1. Genel zellikleri

Apoptoz veya programlanmış hücre lm, DNA hasarının tamir edilemediği durumlarda hücrelerin ölmesi için önemli bir kontrol mekanizmasıdır. Apoptoz normal gelişimin bir parçası olarak hücre sayısının ve çoğalmasının kontrol edilmesinde de önemlidir (113).

Hücre ölümünde apoptoz ve nekroz olarak iki tip mekanizma mevcuttur. Apoptoz, genetik olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümü anlamına gelir. Nekroz terimi, pasif veya kazara hücre ölümü tipini tanımlar (114).

Erken apoptozda, hücreler komşu hücreleriyle bağlantılarını kaybeder ve büzülür. Sitoplazmada, endoplazmik retikulum genişler, sisterna veziküller ve vakuoller şişer. Çekirdekte, DNA degradesyonu, kromatinlerin kondenzasyonu gerçekleşir ve fragmente olurlar. Fragmentler ise endonükleazlar tarafından parçalanır. Çekirdek kıvrımlı hale gelir ve apoptotik cisimler içinde kapsüllenen birkaç parçaya tomurcuklanır. Plazma zarında hücre kavşakları parçalanır. Membran içerikleri paketler halinde toplanır. Hücre, çeşitli boyutlarda apoptotik cisimlere parçalanır.

Fizyolojik koşullar altında, fagositik hücreler tarafından apoptotik cisimlerin tanınmasına olanak tanıyan plazma membranında bazı değişiklikler meydana gelir. Bunlar arasında sialik asit kaybı ve fosfatidilserinin dış zara translokasyonu ile zar fosfolipid asimetrisinin kaybı sayılabilir.

Bununla birlikte, apoptozun uygulanması esas olarak inaktif zimojenler halinde bulunan ve hücre bileşenlerinin selektif parçalanmasına neden olan ayrı bir sistein-aspartik asit proteazlarının (kaspazlar) aktivasyonunu ve daha sonraki kaspazların aktivasyonunu içerir (115).

Hücre ölümünün apoptozla düzenlenen bu süreci, embriyogenezis, doku homeostazı ve yeniden şekillendirme sırasında kritik bir rol oynar ve kendiliğinden reaktif lenfositler, tümör hücreleri, onarılamaz DNA hasarı olan hücreler veya virüs bulaşmış hücreler gibi istenmeyen hücrelerin giderilmesinde görev yapar. Bu nedenle apoptoz yetersizliği, kanser, otoimmün bozukluklar ve sürekli viral enfeksiyonun patogeneze katkıda bulunurken, aşırı apoptoz uygunsuz hücre kaybına ve buna bağlı olarak dejeneratif bozukluklara neden olur (116).

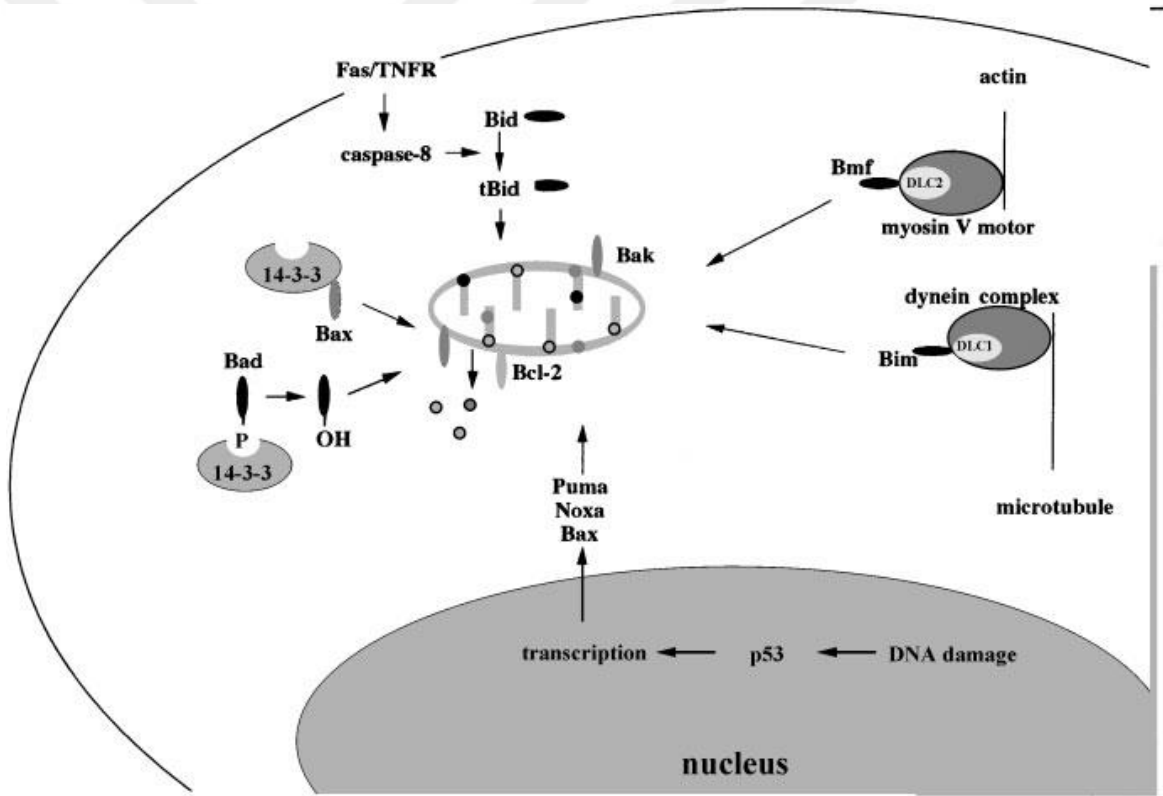
4.4.2. Apoptozda Temel Yolaklar ve Proteinler

Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik olarak iki temel yol ile oluşur. Ekstrinsik veya sitoplazmik yol olarak adlandırılan ilki, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi üyesi olan Fas ölüm reseptörüyle tetiklenir (117).

Her iki yolak da düzenleyici ve yapısal molekülleri parçalayan ve hücrenin ölümüyle sonuçlanan kaspazlar adı verilen bir dizi proteazın aktivasyonunu içeren bir son yolda birleşir. Aslında her iki yolak da birbirine basit olarak bağlıdır. İntrinsik yolda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, ekstrinsik aracılı apoptozun inhibisyonuna yol açabilir. Tam tersi olarak TNF, NFkB'nin ekspresyonunu artırabilir ve Bcl-2 familyası proteinlerinin antiapoptotik üyelerini uyarabilir (113).

Ekstrinsik yolakta bulunan ölüm reseptörleri, membrana bağlı Fas ligandı, Fas kompleksleri, Fas ile ilişkili ölüm alanı ve kaspaz 8 ve 10 da dahil olmak üzere çeşitli

protein üyelerinden oluşur. Sonuçta devam eden mekanizmayla kaspazların geri kalanını aktive eder ve ölümle sonuçlanır. Ekstrinsik yolağın harekete geçirilmesi hücre yüzeyinde bulunan ve ölüm reseptörleri olarak adlandırılan reseptörlerin ligasyonu ile başlar. Fas, tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve ayrıca Apo-1 veya CD95 olarak da adlandırılır. Diğer TNF reseptörleri TNF R1, DR3 (Apo 2), DR4 (TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2), DR6'dır. Fas sinyal kompleksi, Fas adaptör proteini kaspaz 8 ve 10'u içerir ve kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar. Bu şekilde Kaspaz-8 ile bağlantılı diğer kaspaz serileri sırayla aktive olur. Bazı hücrelerde, kaspaz 8'in aktivasyonu ölümün tel şartı olurken, bazı hücrelerde ise kaspaz 8, Bid'i (Bcl-2 ailesinin bir proapoptotik üyesi) parçalayarak intrinsik apoptotik yol ile etkileşime girer ve Sitokrom-c'nin serbest bırakılmasına neden olur (113).

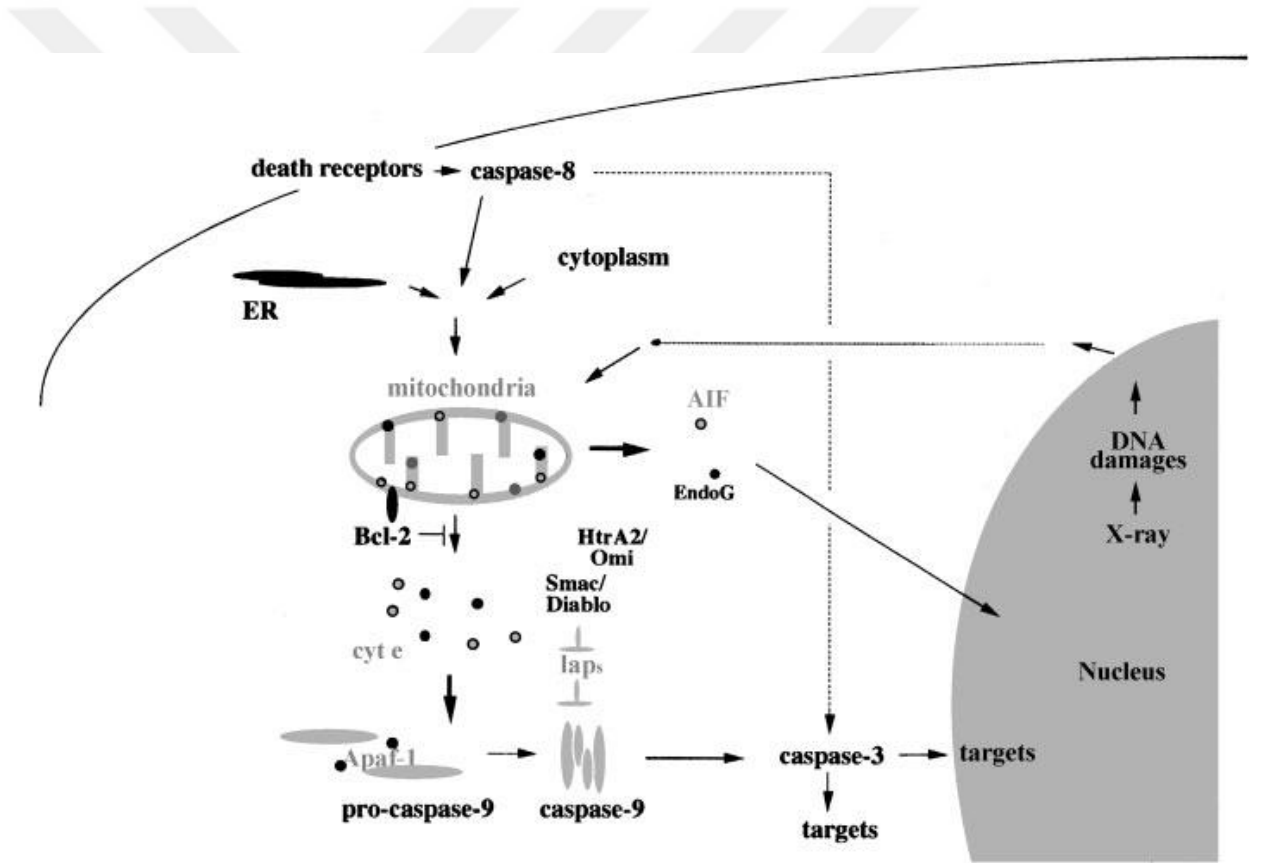


Şekil 4.4.2.1. Apoptozda ekstrinsik yolağın mekanizması (120).

İntrinsik yolağın en önemli regülatörü Bcl-2 ailesi proteinleridir. Bu yolak uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasına ve ölüm sinyalinin aktivasyonuna neden olan mitokondriyal yolaktır (118). BCL-2 ailesi üyeleri BH1, BH2, BH3 ve BH4 olarak adlandırılan dört kadar korunmuş BCL-2 homoloji alanına

sahiptirler. Genel olarak antiapoptotik üyeler(Bcl-2,Bcl-XL, BCL-W gibi) bu dört korunmuş alt birimin tamamına sahiptir. Proapoptotik üyelerde ise (Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs gibi) BH4 alt birimi sekanslanmasına daha az rastlanır. Ayrıca yapılan delesyon ve mutajenezis araştırmalarıyla BH3'ün proapoptotik üyelerde ölümden sorumlu kritik alan olduğu gösterilmiştir (119).

Sitozole salınan sitokrom-c, Apaf-1 ile etkileşime girer ve prokaspaz-9 enzimlerinin aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3'ü aktive eder, bu kaspaz kaskadının geri kalanını aktive eder ve apoptoza yol açar. Aktive edilmiş kaspazlar, nükleer laminanın bölünmesine ve kaspaz-3 yoluyla çekirdeğin parçalanmasına yol açar (113).



Şekil 4.4.2.2. Apoptozda intrinsik yolağın mekanizması (120).

Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar, p53, NFkB proteinleri ve yübukitün proteozom sistemi,PI3K yolakları tarafından düzenlenir.

p53

p53, hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri ve apoptoz için önemli olan alt genleri düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. p53'ün oynadığı kritik rol, bu gende mutasyon geçiren çok sayıda tümör tarafından belirlenmiştir. Pek çok kanserde p53 kaybı, genetik istikrarsızlığa, hücre döngüsünün düzenlenmesinde bozulmaya ve apoptozun inhibisyonuna yol açar. DNA hasarından sonra, p53, hasar onarılmaya kadar hücreyi bir kontrol noktasında tutar. Hasar tamir edilemez durumdaysa apoptoz tetiklenir (113).

p53, apoptoz sinyali geldiğinde mitokondriyal yol ile apoptoza neden olur. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerinin ekspresyonunu bastırıp, proapoptotik üyelerinin(Bax, Bak) aktif hale gelmesini sağlar. Aktifleşen Bax, Bak mitokondri dış zarına entegre olur sitokrom -c gibi apoptotik proteinlerin serbest kalmasını sağlar (120).

NFkB

NFkB, büyüme faktörleri, sitokinler, lenfokinler, radyasyon, farmakolojik ajan ve stres içeren çeşitli uyaranlar tarafından aktive edilir. İnaktif formdaki NFkB sitoplazmada inhibitör proteinlerle (IkB) bağlanmış durumdadır. NFkB'yi aktive eden çeşitli uyaranlar IkB'nin fosforilasyonuna neden olur. Ve kompleksin dağılmasını sağlar. NFkB bu yolla çekirdeğe transloke olur. Çekirdekte NFkB çeşitli genlerin konsensüs sekansı ile bağlanır ve böylece transkripsiyonlarını aktive eder. Apoptozu indükler. NFkB'nin bu mekanizması interferon düzenleyici faktör-1, c-myc, p53 gibi bazı proapoptotik proteinlerin ve kaspaz 1 gibi kaspazların aktivasyonu ile açıklanabilir (113).

Yubikütün / proteazom sistemi

Bu sistem, hücre büyümesi ve apoptozun düzenlenmesinden sorumludur. Geniş bir proteinaz kompleksinden oluşur. Protein parçalanması, tanınmayı içeren oldukça koordineli bir süreçtir. Proteininin birçok yubikütün molekülüne bağlanması ve daha sonra 26S proteozom tarafından sindirilmesi yoluyla gerçekleşir. Pek çok hücre döngüsü düzenleyicisi, transkripsiyon faktörleri (p53, siklinler ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) ve NFkB yubikütün / proteozom sistemi tarafından düzenlenir (121).

Buna ek olarak, Bcl-2 ailesi üyelerinin birçoğu yubikütün / proteozom sisteminin substratlarıdır. Proteozom inhibitörleri ile apoptozun indüksiyonu, p53, p27, proapoptotik Bad veya Bax gibi proteinlerin başlangıç birikimine veya stres kinazın aktivasyonuna yol açar. Bu da sitokrom-c'nin salınmasına ve intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonuna neden olur (113).

4.4.3. Apoptoz ve Tedavi İlişkisi

Moleküler genetik kusurların anlaşılması ve tümörlerde karmaşık sinyal yollarının düzenlenmesi, özellikle de apoptozun düzenlenmesi, rasyonel olarak tasarlanmış kanser önleme stratejileri için sonuçlar ortaya çıkarabilir. İntrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar ve p53, proteozom / ubikitin sistemi, NFkB ve PI3K / Akt yolları gibi diğer sinyalleme düzenleyiciler hakkındaki bilgilerimiz, tek başına veya konvansiyonel sitotoksik terapi veya radyasyon ile kombinasyon halinde uygulanabilen pek çok ajanın keşfini sağlamıştır. Farklı tümör tiplerinde apoptozu kontrol eden farklı sinyal yollarının daha iyi anlaşılması, yeni ajanların keşfedilmesine ve hedeflenen tümöre spesifik moleküler kusurlara dayanan klinik araştırmaların tasarlanmasına yardımcı olacaktır (113).

Her iki apoptoz yolağını harekete geçirebilen antikanser ilaçları mevcuttur. Ölüm reseptör ligandlarının, özellikle de Fas ligandının ekspresyonunu indükleyerek hassas duyarlı hücreler oluşturanlar ve mitokondriyumdan sitokrom salınımını tetikleyenler olarak ayrılabilir (122). Karakteristik apoptotik değişiklikler; sitarabin, 5-fluorourasil,

fludarabin, doksorubisin, siklofosfamid, sisplatin, etoposid, daktinomisin ve sitoprotein gibi çeşitli sitotoksik ilaçlarla farelerde katı tümör tedavilerinde tanımlanmıştır. Bazı istisnalar dışında çoğu anti-kanser ilaç tarafından tetiklenen apoptoz Fas/FasL sisteminden bağımsız olarak işlemektedir. Buna karşı çoğu ilaç ile tetiklenen apoptotik süreçte sitokrom c salınması ve beraberinde gerçekleşen Bax translokasyonu gösterilmiştir (123).

Sonuç olarak çeşitli kanserlerin farklı mekanizmalarla ortaya çıktığı göz önünde bulundurulduğunda apoptozu indükleyen kemoterapötiklerle tedavide, spesifik ilaçlar üretilmesi için apoptoz mekanizmasının iyi anlaşılması şarttır.



5. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezinde(REMER) gerçekleştirilmiştir.

5.1. Gereç

5.1.1 Deneyde kullanılan materyaller

Araştırmada *O. argyrea*, *O. galegifolia*, *O. tournefortii*, *O. albiflora* herbaları (bitkinin toprak üstünde kalan tüm organları) kullanıldı.

Hücre hattı olarak HCT 116 insan kolon kanseri hücreleri ve HEK 293 insan embriyonik böbrek hücreleri kullanıldı.

Tablo 5.1.1.1. Deneyde kullanılan kimyasallar, ticari kitler ve sarf malzemeler listesi

Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit	Cell signaling Technology	#6592
Apoptosis/Necrosis Detection Kit	abcam	ab176749
Caspase 3 Assay Kit (Fluorometric)	abcam	ab39383
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche	11 465 007 001

Mc COY'S 5A Medium	Multicell	317-010-EL
Dulbecco's Modification EAGLE'S Medium (DMEM)	Multicell	319-005-CL
Fetal Bovine Serum (South America Origin)	Biosera	FB-1001/500
Dulbecco's PBS	Capricorn	PBS-1A
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Emplura	1.16743.1000
TRYPsin/EDTA	Multicell	325-542-EL

Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma-aldrich	9003-98-9
DRAQ5™ (5mM)	Abcam	ab108410
Antibiyotik-Antimitotik Solüsyon (100x)	Multicell	450-115-EL
Triton™ X-100	Sigma-aldrich	9002-93-1
Laminar Kabin(sınıf 2 güvenlik kabini)	Thermo Scientific	12469:2000
İnkübatör	Thermo Scientific	Heracell I50i CO2 inkübatör
Santrifüj	Thermo Scientific	SL16R
Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	BD Influx Cell Sorter	With Bioprotect Safety Cabinet
İnverted mikroskop	ZEISS	Axio
Otoklav	Nüve	OT40L
-80 °C Dondurucu	Thermo Scientific	Forma 88000
SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader with SoftMax Pro Software	Molecular Devices	İ3x
Pipet Seti	Mettler Toledo	RAININ XLS
Serolojik Pipet Tabancası	Mettler Toledo	RAININ
96-well plate	NEST	NEST
T25 ve T75 Flask	NEST	NEST

5.2. Yöntem

5.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü

Her iki hücre hattı da çözümlerine takiben T25'lik ve flasklarda kültüre edildi.

HCT 116 hücre hattının kültürü için %1 antibiyotik/antimitotik solüsyon, %10 FBS,%5 L-Glutamin içeren McCOY's besi yeri kullanıldı.

HEK 293 hücre hattının kültürü için %1 antibiyotik/antimitotik solüsyon, %10 FBS, L-Glutamin, Sodyum Pirüvat ve 4.5 g/L Glukoz içeren DMEM besiyeri kullanıldı.

***Onobrychis argyrea*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii*, *Onobrychis albiflora* herbalarının Ekstrelerinin Hazırlanması**

Kuru haldeki herbaların her biri 10 mg olarak tartıldı.1 ml distile su içerisinde blendırda homojenizasyonları sağlandı. Elde edilen distile su içerisindeki homojenat 1500 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet ve süpernatant kısmı ayrıldı. Süpernatant kısmı çalışmalarda kullanılmadan önce 0,22 µm şırınga filtresi ile steril edildi.

5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Ölçümü (Hücre Canlılık Tespiti)

MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-Difenil tetrazolyum bromit) metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı bir testtir. Çalışma prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin dehidrojenaz enzimi aktivitesinin artması sonucu oluşan tetrazolyumu kullanarak mor renkli 'formazan'tuzu üretmesi şeklinde gerçekleşir. Normalde sarı renkte olan MTT solüsyonu mor renkli Formazana indirgenir. Çözücü solüsyon olan DMSO eklendikten sonra üretilen formazan tuzlarının çözünmesiyle mor renk alır.

Deney Basamakları;

T25'lik flasklarda kültüre edilmiş hücre besiyerinin aspirasyonunu takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 µl Tripsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 1000 rpm'de 3 dk santrifüj sonrası süpernant kısmı atıldı. Hücreler tekrar besiyeri ile karıştırıldı. Hücre sayımı için 'Scepter Automated Cell Counter' adı verilen otomatik hücre sayım cihaz kullanıldı.

Hücrelerin 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta $0,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Konfluent olmaları için 96 kuyucuklu plaklarda 24 saat bekletildi. Daha sonra kuyucuklar üzerindeki besiyerlerinin aspirasyonu sağlandı. Her herba 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml ve 0.5 mg/ml konsantrasyonlarda 24 saat ve 48 saat inkübe edilmek üzere, HEK 293 VE HCT 116 hücreleri üzerine eşit miktarda besiyerleriyle birlikte eklendi. Bütün konsantrasyonların, her iki inkübasyon süresinde de (24 ve 48 saat) üçlü tekrarları yapıldı. İnkübasyon süreleri sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri, herba karışımlarının aspirasyonu yapıldı. 1:20 (mtt ajanı: toplam besiyeri) oranında MTT ajanı ilave edilerek 3-4 saat arası inkübe (37°C , %5 CO_2) edildi. İnkübasyonu takiben MTT aspire edildi. 1:1 (besiyeri: DMSO) oranında çözücü solüsyon ilave edilerek orbital karıştırıcıda karanlık ortamda 1 saat inkübe edildi. Oluşan renk değişiminin absorbansı 570 nm'de spektrofotometre ile ölçüldü. Ekstrelerin her iki hücre hattının 24 ve 48 saatlik proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu (İK_{50}), istatistikleri ve grafikleri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak kaydedildi. MTT analiziyle en etkili İK_{50} değerine sahip bitkinin *Onobrychis albiflora* olduğu belirlendi. Ve bundan sonraki analizlere sadece *Onobrychis albiflora* ekstresiyle devam edildi.

5.2.3. Akış Sitometri Analizleri(FACS)

Akış sitometri analizi, süspansiyon halindeki hücrelerin tekli olarak akışının sağlanması, akış devam ederken eş zamanlı olarak da her birinin lazer ile uyarılıp eksitasyon derecelerinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Çalışmamızda bu analiz için Floresanla aktive edilmiş hücre ayırma cihazı (Fluorescence-activated cell sorting -FACS) kullanılmıştır. Cihazın sahip olduğu çeşitli lazerler sayesinde farklı floresan boyalarla boyanmış hücreler istenilen emisyon dereceleriyle uyarılır. Daha sonra her birinin verdiği eksitasyon dereceleri kaydedilir. Bu kayıtlarla çeşitli diyagramlar ve istatistikler oluşturulur.

5.2.3.1. FACS, Annexin V-FITC Early Apoptoz/Nekroz Analizi

Araştırmamızda HCT 116 hücrelerine ticari olarak satılan Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit'i uygulandı. Annexin V-FITC Erken Apoptoz Tespit Kiti,

araştırmacıların bir hücre popülasyonu içindeki erken apoptotik hücreleri belirlemelerini sağlar. Annexin V-FITC konjuge protein, erken apotoz belirteci olan fosfatidilserin ifade eden hücre yüzeylerine bağlanır. Propidium iodide (PI), normalde sağlıklı hücrelerde membranı geçemeyip DNA'ya bağlanamaz. Fakat membran geçirgenliğini kaybetmiş nekrotik hücrelerde hücre içine girerek DNA'ya bağlanır. Hem PI hem de Anneksin V-FITC ile boyanan hücreler ileri apoptozu ve erken nekrozu gösterirler. Annexin V, 160'dan fazla üyeden oluşan annexin proteinleri ailesine aittir. Annexin protein ailesi üyelerinin karakteristik özelliği Ca^{+2} varlığında negatif yüklü fosfolipid yüzeylere bağlanmasıdır. Normalde Fosfatidilserin (PS) molekülleri hücre membranının sitozole bakan iç tarafında yerleşmiş durumdadır. Apoptozun erken aşamalarında plazma membranının sitozolik yüzünden dış yüzüne transloke olurlar. Bu şekilde Annexin V ile bağlanırlar.

Deney Basamakları;

T25 flaskda kültüre edilmiş HCT 116 hücrelerinin besiyerinin aspire edilmesini takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 µl Tripsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 500g'de 5 dk santrifüj sonrası süpernant ayrıldı. Hücreler tekrar besiyeri ile karıştırıldı. 1×10^6 hücre sayıldı. Tekrar steril T25 flask içine alınıp besiyeriyle birlikte *Onobrychis albiflora* ekstresinin IK_{50} konsantrasyonu ile inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra tekrar kaldırılıp santrifüj edilen hücrelerin süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti kit içeriğinde bulunan 1X Annexin V bağlanma tamponu ile karıştırılarak, 96 µl'lik alikotlara ayrıldı. Ayrılan her bir 96 µl alikot üzerine 1 µl Annexin V-FITC konjugatı ve 12.5 µl Propidium Iodide (PI) eklendi. Buz üzerinde ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra $1/10^4$ oranında dilüe edilmiş psöydo DNA boyası DRAQ5 ve DNase eklendi. Final hacmi 1X Annexin V bağlanma tamponu eklenerek 250 µl'ye tamamlandı. DRAQ5 için 640nm, PI için 560nm FITC için 488nm de uygun lazer kanallarıyla FACS analizi yapıldı. Yeşil floresan veren hücreler apoptozun erken aşamasında olanlar, kırmızı floresan verenler ise nekroza uğramış olanlar olarak belirlendi.

5.2.3.2. FACS, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz Analizi

Çalışmamızda ayrıca içeriğinde Apopxin Green, 7-AAD ve CytoCalcein Violet bulunan başka bir ticari Apoptoz/Nekroz kit'i kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan bu kit apoptotik, nekrotik ve sağlıklı hücreleri aynı anda bir akış sitometresi veya floresan mikroskopu ile izlemek üzere tasarlanmıştır. Kit içeriğinde bulunan Apopxin Green indikatörü ajanı apoptozun erken safhasında hücre membranının dış yüzeyine yer değiştirmiş fosfatidilserin molekülleriyle bağlanarak apoptotik hücrelerin yeşil floresan vermesini sağlar. Plazma bütünlüğünün kaybedilmesi apoptozun ileri safhalarında ve nekrozda karakteristik bir olaydır. Kit içeriğinde bulunan 7-AAD (7-aminoaktinomisin D) membran geçirimsiz bir boyadır. Membran bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerde ise zardan geçerek çekirdeği boyayıp kırmızı floresan vermesini sağlar. Kit içeriğindeki diğer bir boya olan CytoCalcein Violet 450 ise canlı hücrelerin sitoplazmalarında tutunarak mavi floresan renk verir. Bu şekilde canlı hücreler kolayca ayırt edilmiş olur.

Deney Basamakları;

T25 flaskda kültüre edilmiş HCT 116 hücrelerinin besiyerinin aspire edilmesini takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 µl Tripsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 500 g'de 5 dk santrifüj sonrası süpernant kısmı uzaklaştırıldı. Hücreler tekrar besiyeri ile karıştırıldı. 1×10^6 hücre sayıldı. Tekrar steril T25 flask içine alınıp besiyeriyle birlikte *Onobrychis albiflora* ekstresinin IK_{50} konsantrasyonuyla inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra tekrar kaldırılıp santrifüj edilen hücrelerin süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelleti kit içeriğinde bulunan 200 µl deney tamponu ile karıştırıldı. Hücre deney tamponu karışımına 2 µl Apopxin Green indikatörü, 1 µl 7-AAD (7-aminoaktinomisin D), 1 µl CytoCalcein Violet 450 ajanları eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonları sağlandı. FACS analizi öncesi tekrar 300 uL deney tamponu ile dilüe edildi. FL1 kanalı (Ex / Em = 490/525 nm) kullanılarak Apopxin Green Indicator, FL3 kanalı (Ex / Em = 550/650 nm) kullanılarak 7-AAD, Ex / Em = 405/450 nm'de ise CytoCalcein Violet 450 FACS ile analiz edildi.

5.2.4. Florometrik Kaspaz 3 Analizi

Araştırmamızda ticari olarak Abcam39383 Caspase 3 Assay (Fluorometric) kiti kullanılmıştır. Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünde rol oynayan bir proteaz enzimi ailesidir. ICE (interlökin-1-beta converting enzim) ailesinden proteazların / kaspazların aktivasyonu, memeli hücrelerinde apoptozu başlatır. Kit içeriğinde DEVD-AFC, hücre lizis tamponu, deney tamponu ve DTT ajanları bulunmaktadır. Bu kit DEVD'ye bağlı kaspaz aktivitesini test etmek için basit ve kullanışlı bir yöntem sağlamaktadır. Apoptoz sırasında aktive edilmiş kaspaz-3, özellikle DEVD amino dizisinde hedeflenen poli (ADP-riboz) polimeraz dahil olmak üzere çeşitli substratları parçalamaktadır. Deney, DEVD-AFC substratının (AFC: 7-amino-4-triflorometil kumarin) bölünmesinin saptanmasına dayanır. DEVD-AFC normalde mavi floresan yayar ($\lambda_{\max} = 400 \text{ nm}$); Substratın kaspaz 3 veya ilgili kaspazlar tarafından parçalanmasıyla birlikte serbest kalan AFC, sarı-yeşil bir floresan ($\lambda_{\max} = 505 \text{ nm}$) yayar. Bu floresan derecesi bir florometre veya floresan mikroparka okuyucusu kullanılarak nicelleştirilir. Apoptotik bir numunenin AFC floresan değeri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Kaspaz 3 etkinliğindeki artışa karar verilebilir.

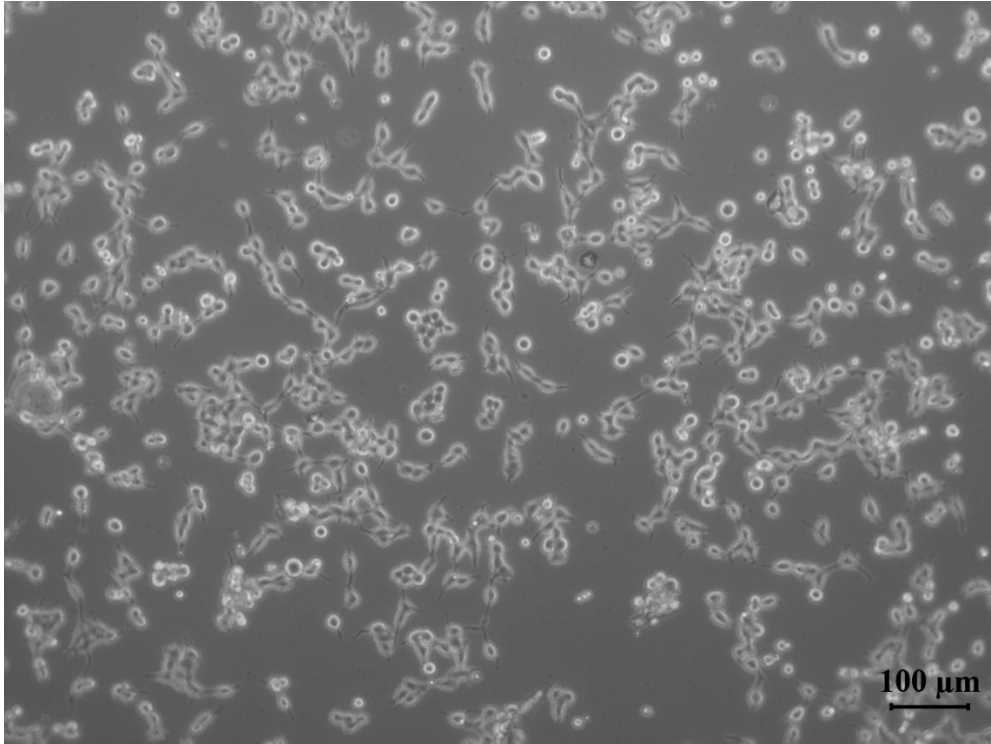
Deney Basamakları;

T25 flaskda kültüre edilmiş HCT 116 hücrelerinin besiyerinin aspire edilmesini takiben hücreler steril PBS ile yıkandı. Hücreleri kaldırmak için 750 μl Trypsin/EDTA eklendi. 2-3 dakika inkübatörde bekledikten sonra, hücreler kaldırıldı. 1000 rpm'de 3 dk santrifüj sonrası süpernant ayrıldı. Hücreler tekrar besiyeri ile karıştırıldı. 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuk $0,5 \times 10^5$ hücre içerecek şekilde ekimi yapıldı. Konfluent olmalarını takiben *Onobrychis albiflora* ekstresinin IK_{50} konsantrasyonuyla 24 saat inkübasyon sağlandı. Kuyucukların içeriği aspire edildi. Her kuyucuğa 50 μl lizis tamponu eklendi. 10 dakika buz üzerinde inkübasyonu takiben 50 μl 2x (10Mm DTT içeren) deney tamponu ve 5 μl 1Mm DEVD-AFC substratı eklendi. Tekrar 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Plaka Ex/Em:400nm/505nm de SpectraMax i3x cihazında altında analiz edildi.

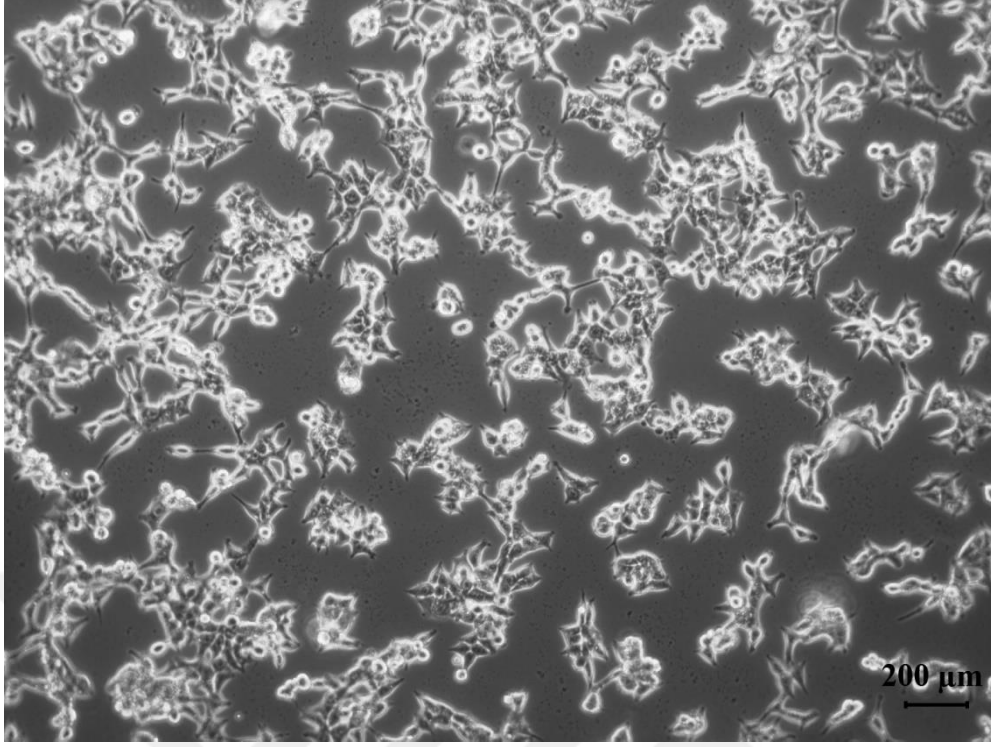
6.BULGULAR

6.1. Hücre Proliferasyonunun Ölçümü (Hücre Canlılık Tespiti)

Her herba 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml ve 0.5 mg/ml konsantrasyonlarda 24 saat ve 48 saat inkübe edilmek üzere, HEK 293 VE HCT 116 hücreleri üzerine eklendi. Ve yapılan MTT analizleriyle $İK_{50}$ değerleri bulundu.



Resim 6.1.1. HEK-293 hücrelerinin deney öncesi ışık mikroskobu görüntüsü (10X).



Resim 6.1.2. HCT-116 hücrelerinin deney öncesi ışık mikroskobu görüntüsü (10X).

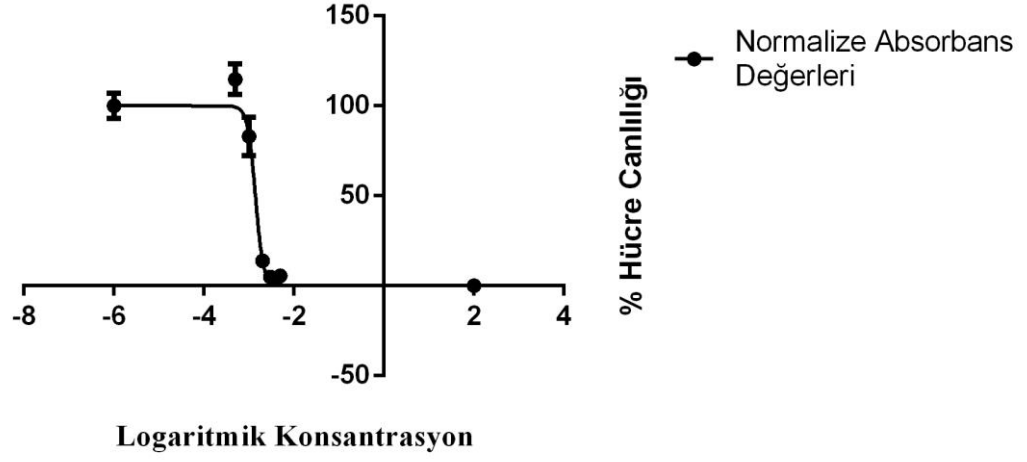
6.1.1. HCT-116 Hücreleri Canlılık Tespiti

24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda *Onobrychis albiflora*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* ve *Onobrychis argyrea* herbalarının $İK_{50}$ değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 6.1.1.1. *Onobrychis albiflora*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* ve *Onobrychis argyrea* herbalarının HCT-116 hücrelerindeki $İK_{50}$ değerleri.

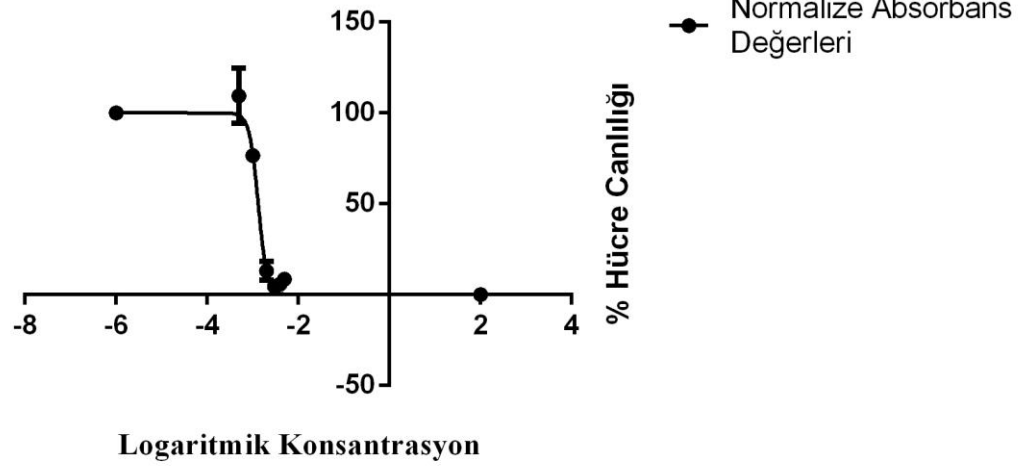
HCT-116		
	24 SAAT $İK_{50}$ (mg/ml)	48 SAAT $İK_{50}$ (mg/ml)
<i>Onobrychis albiflora</i>	1,396	1,322
<i>Onobrychis galegifolia</i>	2,707	2,755
<i>Onobrychis tournefortii</i>	2,048	2,236
<i>Onobrychis argyrea</i>	3,287	1,217

O.albiflora 24 sa. IC₅₀: 1,396 mg/ml



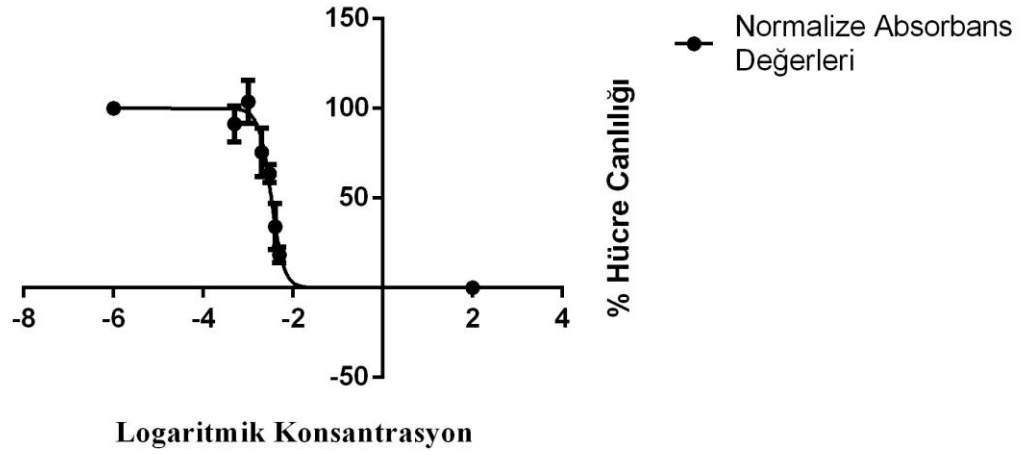
Şekil 6.1.1.1. *O. albiflora*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O.albiflora 48 sa. IC₅₀: 1,322 mg/ml



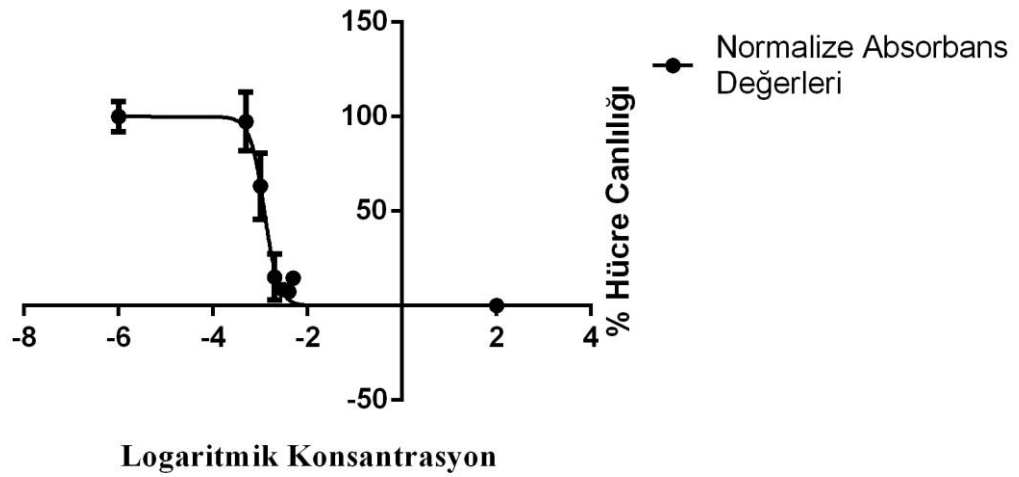
Şekil 6.1.1.2. *O. albiflora*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

***O. argyrea* 24 sa. IC₅₀: 3,287 mg/ml**



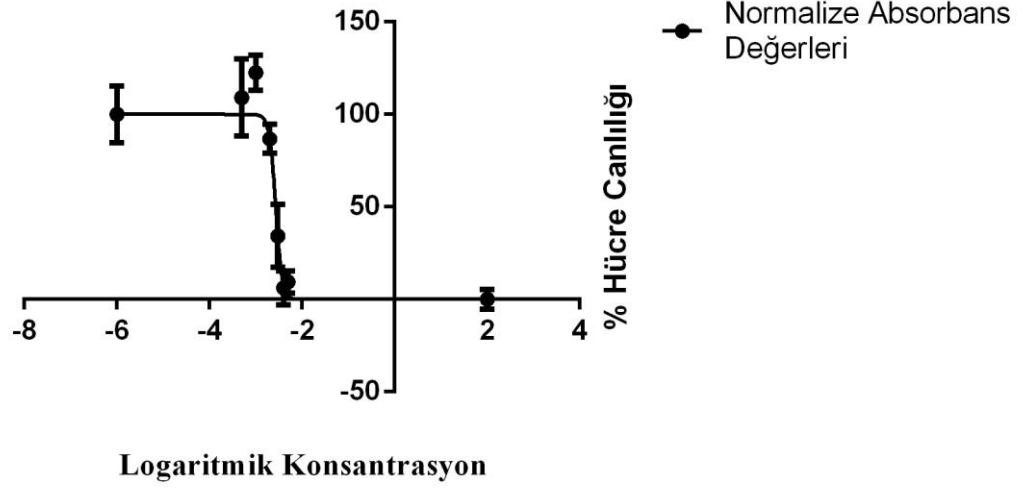
Şekil 6.1.1.3. *O. argyrea*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

***O. argyrea* 48 sa. IC₅₀: 1,217 mg/ml**



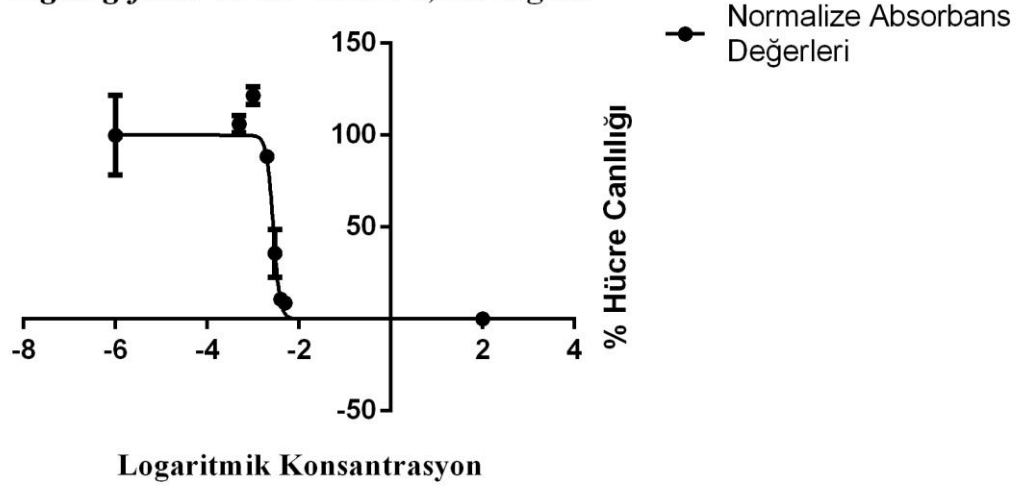
Şekil 6.1.1.4. *O. argyrea*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O.galegifolia 24 sa. IC₅₀: 2,707 mg/ml



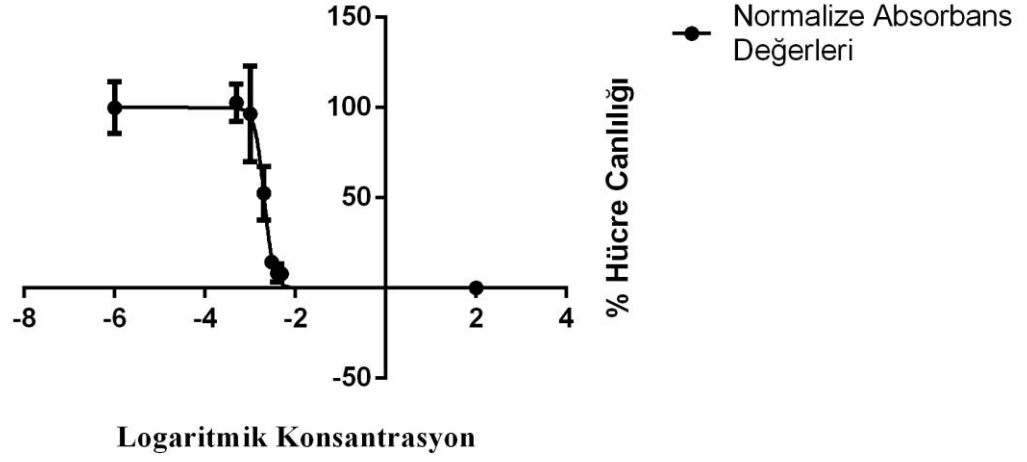
Şekil 6.1.1.5. *O. galegifolia*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O.galegifolia 48 sa. IC₅₀: 2,755 mg/ml



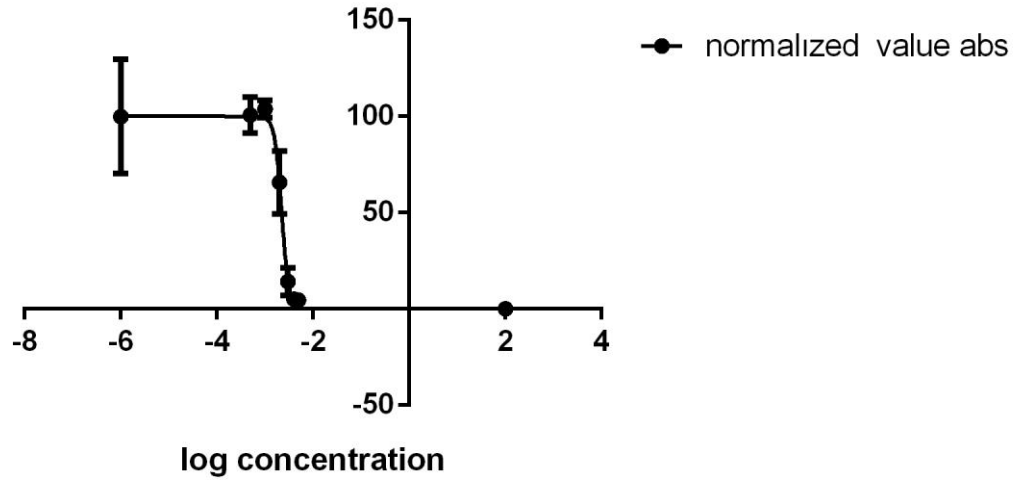
Şekil 6.1.1.6. *O. galegifolia*'nın HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

***O. tournefortii* 24 sa. IC₅₀: 2,048 mg/ml**



Şekil 6.1.1.7. *O. tournefortii*'nin HCT-116 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

***O. tournefortii* 48h IC₅₀: 2,236 mg/ml**



Şekil 6.1.1.8. *O. tournefortii*'nin HCT-116 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

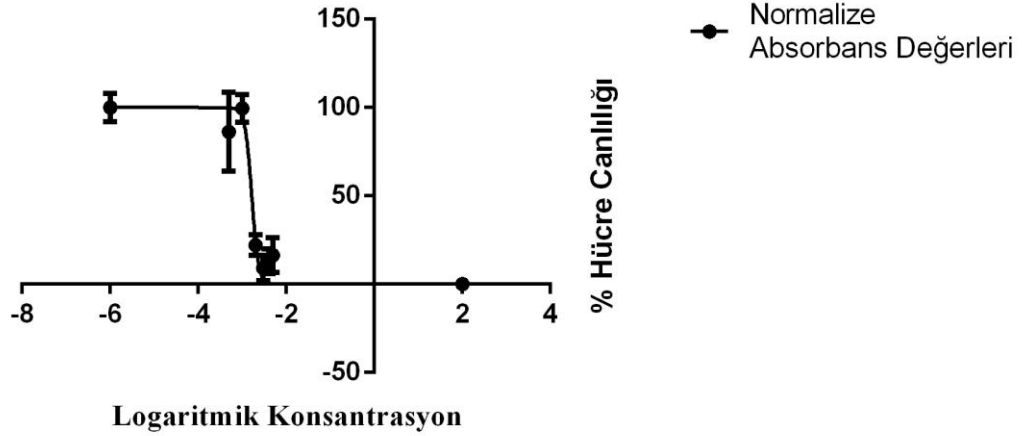
6.1.2. HEK-293 Hücreleri Canlılık Tespiti

24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda *Onobrychis albiflora*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* ve *Onobrychis argyrea* herbalarının İK₅₀ değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 6.1.2.1. *Onobrychis albiflora*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii* ve *Onobrychis argyrea* herbalarının HEK-293 hücrelerindeki İK₅₀ değerleri.

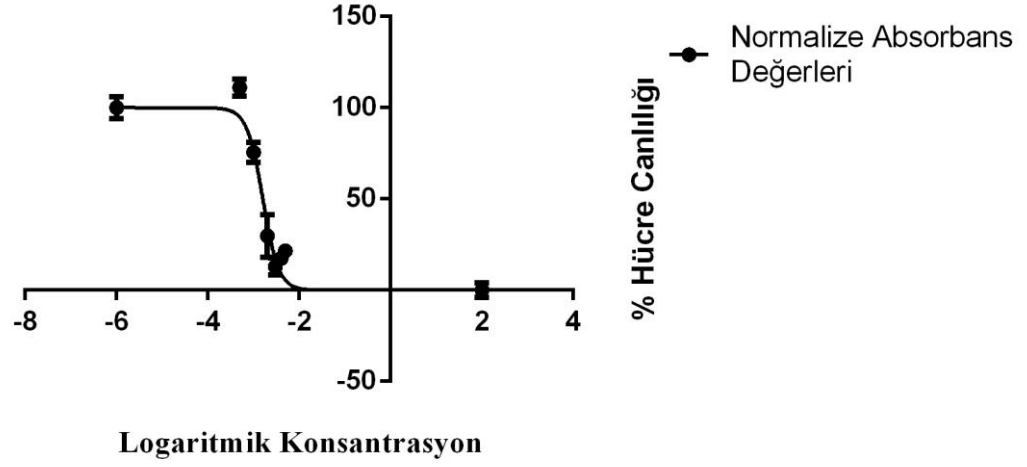
HEK-293		
	24 SAAT İK ₅₀ (mg/ml)	48 SAAT İK ₅₀ (mg/ml)
<i>Onobrychis albiflora</i>	1,649	1,601
<i>Onobrychis galegifolia</i>	2,563	3,989
<i>Onobrychis tournefortii</i>	0,9797	1,269
<i>Onobrychis argyrea</i>	3,749	3,611

O.albiflora 24 sa. IC50: 1,649 mg/ml



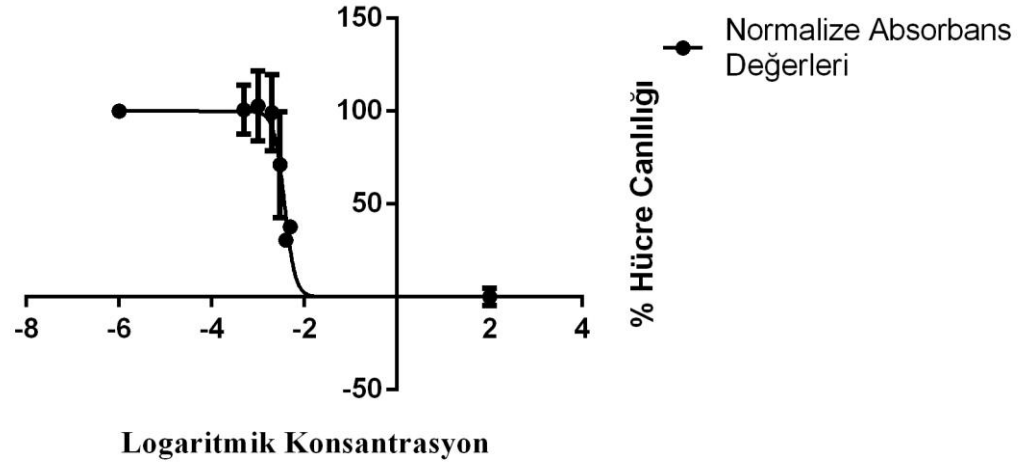
Şekil 6.1.2.1. *O. albiflora*'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O.albiflora 48 sa. IC₅₀: 1,601 mg/ml



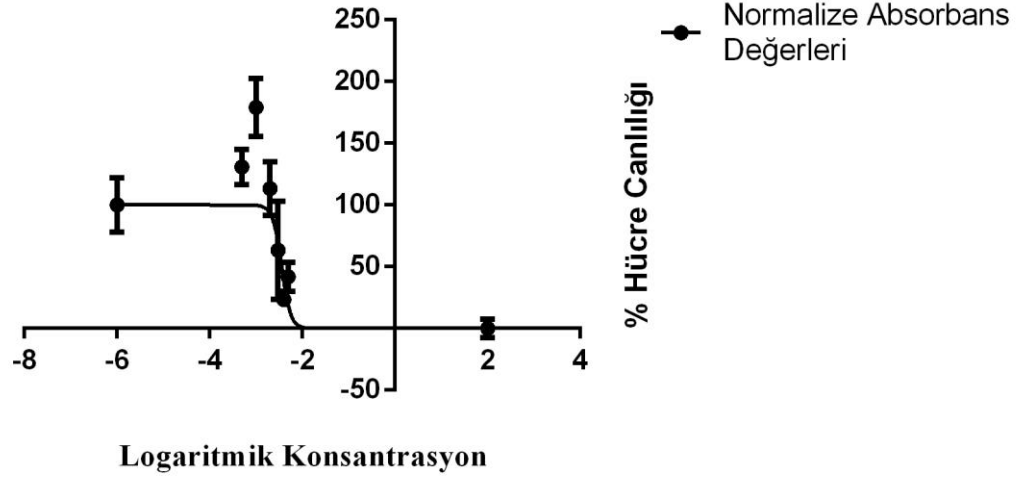
Şekil 6.1.2.2. *O. albiflora*'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O.argyrea 24 sa. IC₅₀: 3,749 mg/ml



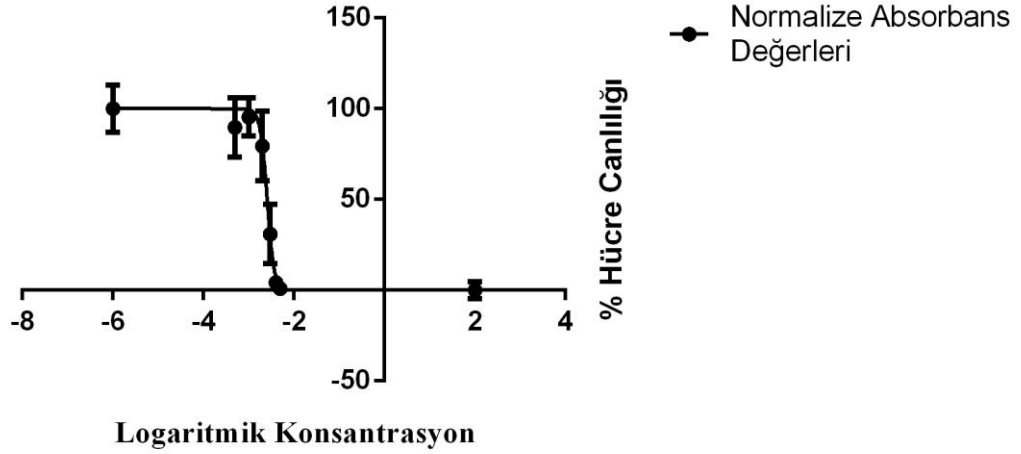
Şekil 6.1.2.3. *O. arygre*a'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O. argyrea 48 sa. IC₅₀: 3,611 mg/ml



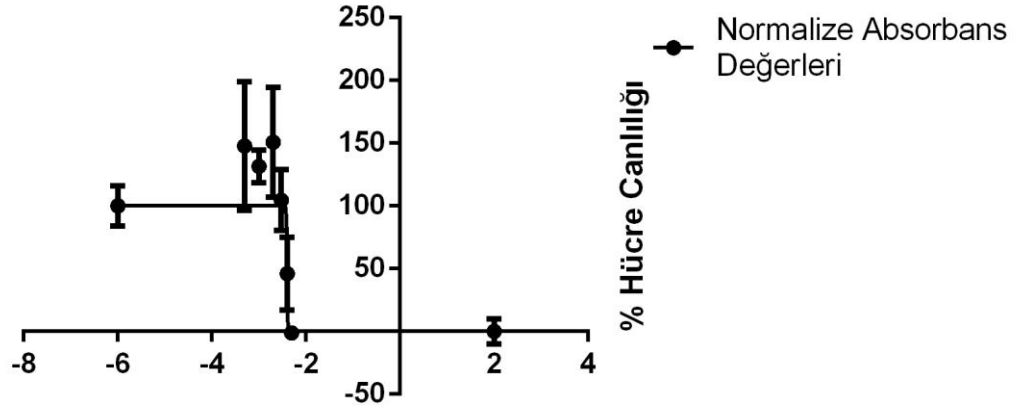
Şekil 6.1.2.4. *O. argyrea*'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

O. galegifolia 24 sa. IC₅₀: 2,563 mg/ml



Şekil 6.1.2.5. *O. galegifolia*'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

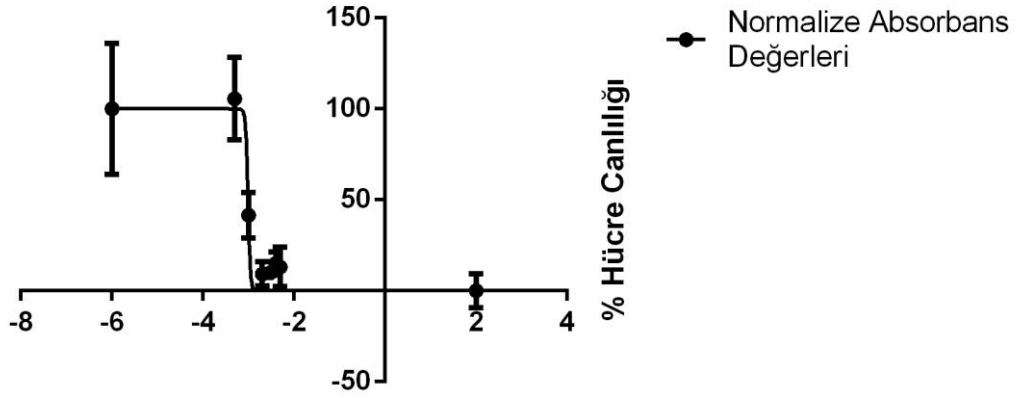
O.galegifolia 48 sa. IC₅₀: 3,989 mg/ml



Logaritmik Konsantrasyon

Şekil 6.1.2.6. *O. galegifolia*'nın HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri.

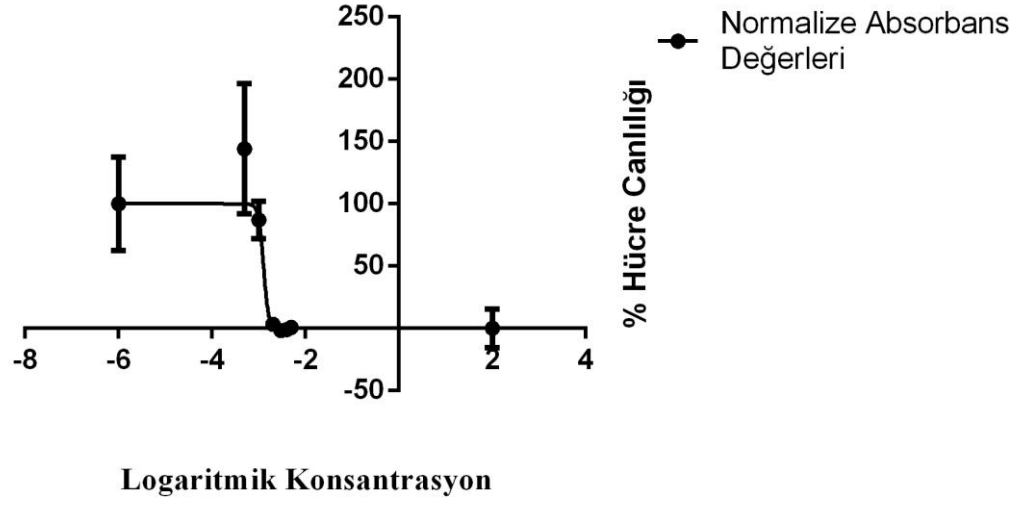
O.tournefortii 24 sa. IC₅₀: 0,9797 mg/ml



Logaritmik Konsantrasyon

Şekil 6.1.2.7. *O. tournefortii*'nin HEK-293 hücreleri üzerindeki 24 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve İK₅₀ değeri

O.tournefortii 48 sa. IC50: 1,269 mg/ml

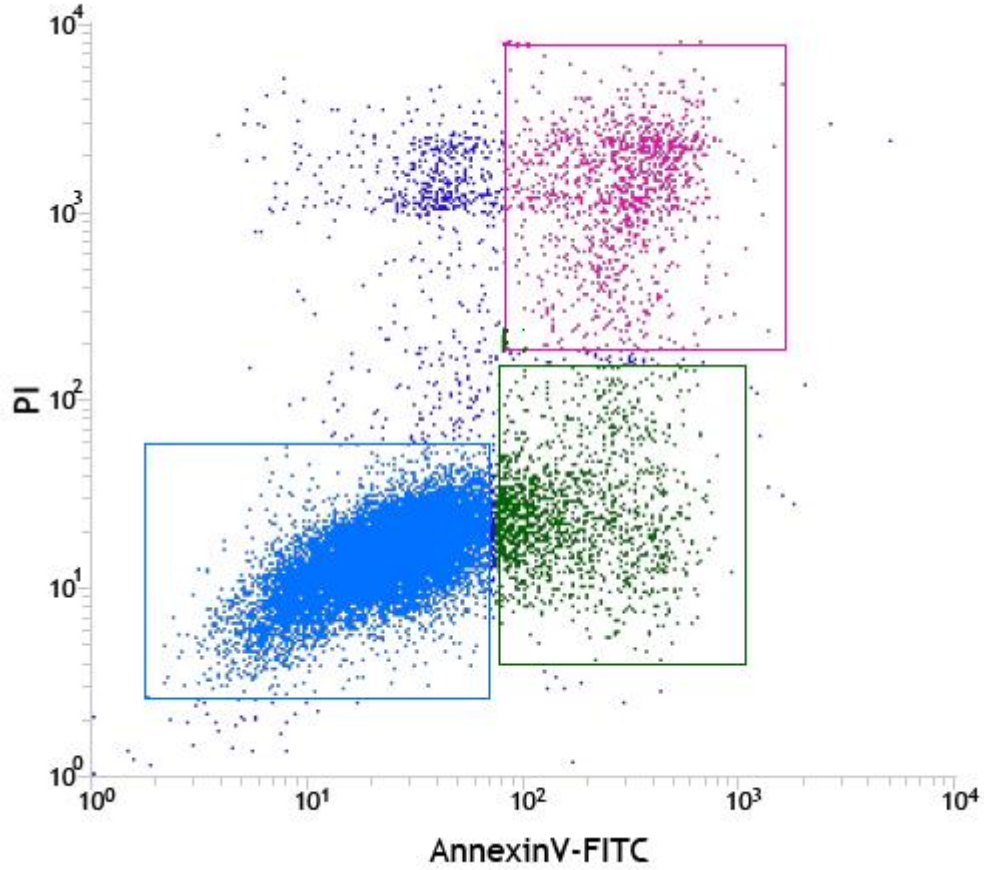


Şekil 6.1.2.8. *O. tournefortii*'nin HEK-293 hücreleri üzerindeki 48 saatlik inkübasyonu sonucu bulunan canlılık eğrisi ve $İK_{50}$ değeri.

6.2. Akış Sitometri Analizleri (FACS)

HCT-116 hücre hattı *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edildi. Deney ve kontrol gruplarının ayrı ayrı akış sitometri analizleri yapıldı.

6.2.1. FACS ,Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz Analizi

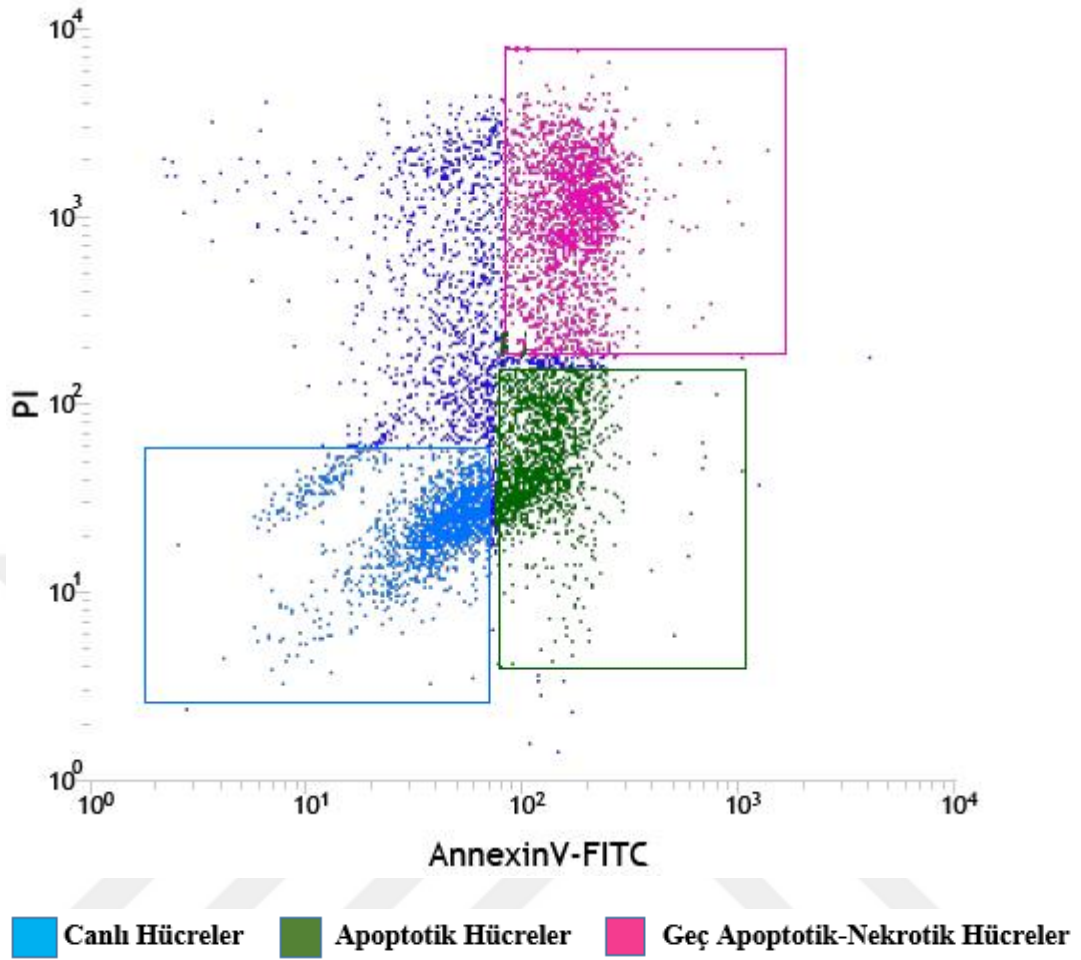


Canlı Hücreler **Apoptotik Hücreler** **Geç Apoptotik-Nekrotik Hücreler**

Şekil 6.2.1.1 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubu hücrelerinin akış sitometrik analiz diyagramı.

Tablo 6.2.1.1 *Onobrychis albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubu hücrelerinin akış sitometrik analizi % değerleri.

	Hücre Populasyonu	% değer
Tüm Hücreler	18.857	%100
Geç Apoptotik-Nekrotik	1.198	% 6.35
Apoptotik	1.615	% 8.56
Canlı Hücreler	15.199	% 80.60



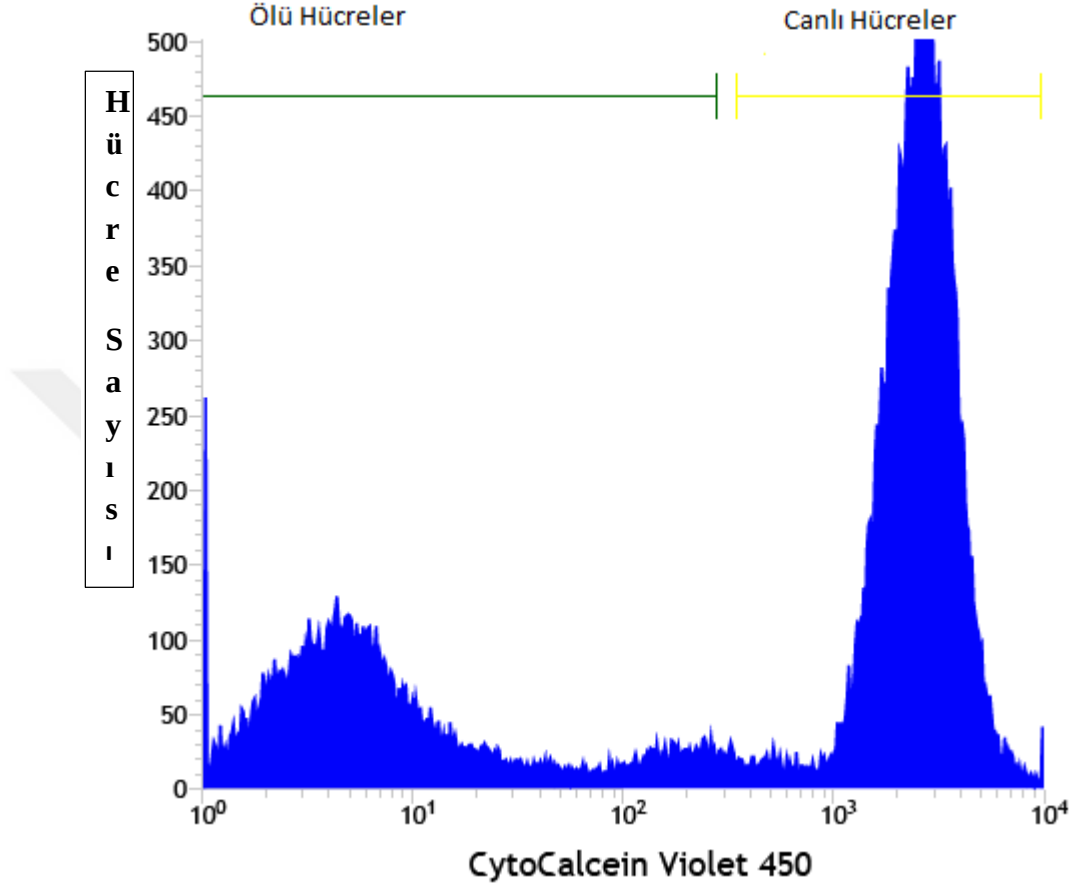
Şekil 6.2.1.2 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin akış sitometrik analiz diyagramı.

Tablo 6.2.1.2 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin akış sitometrik analizi % değerleri.

	Hücre Populasyonu	% değer
Tüm Hücreler	7.167	% 100
Geç Apoptotik-Nekrotik	2.237	% 31.21
Apoptotik	1.860	% 25.95
Canlı Hücreler	1.733	% 24.18

6.2.2. FACS, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz Analizi

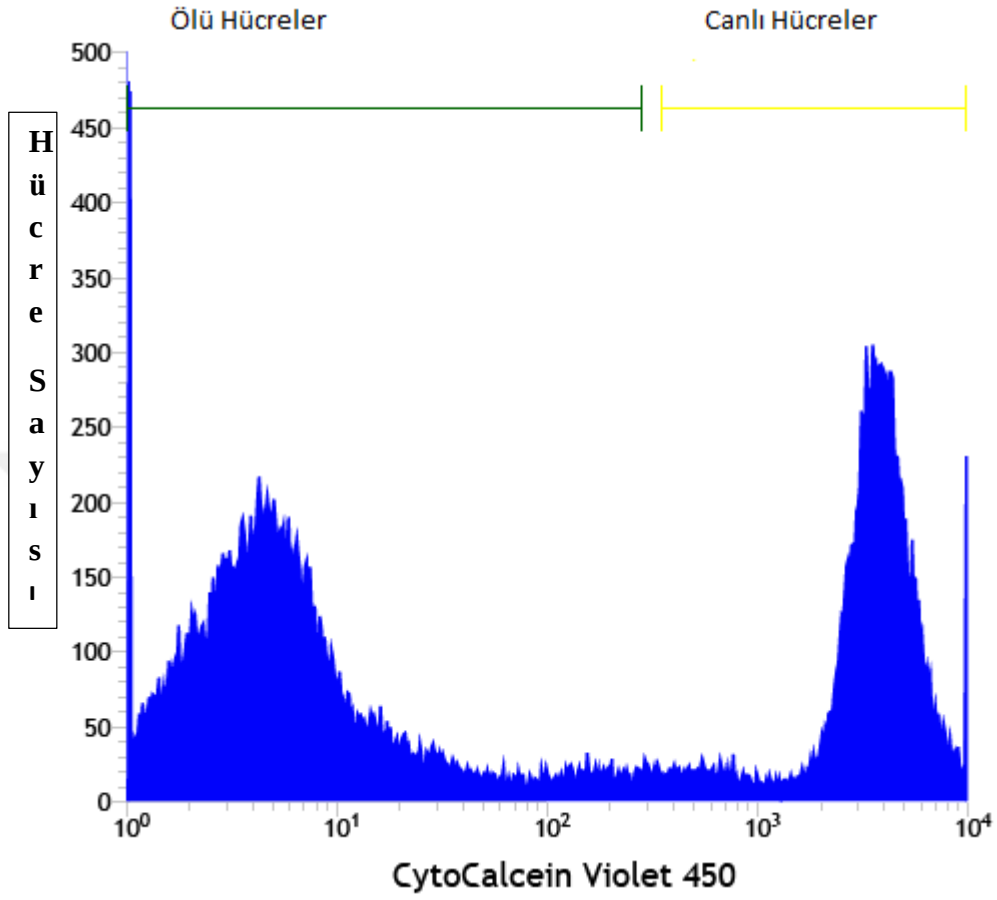
Akış sitometri analizi ile elde edilen faz pikleri ve hesaplanan hücre yüzdeleri gösterildi.



Şekil 6.2.2.1 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin CytoCalcein Violet 450 pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.1 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin CytoCalcein Violet 450 ile belirlenen canlılık % değerleri.

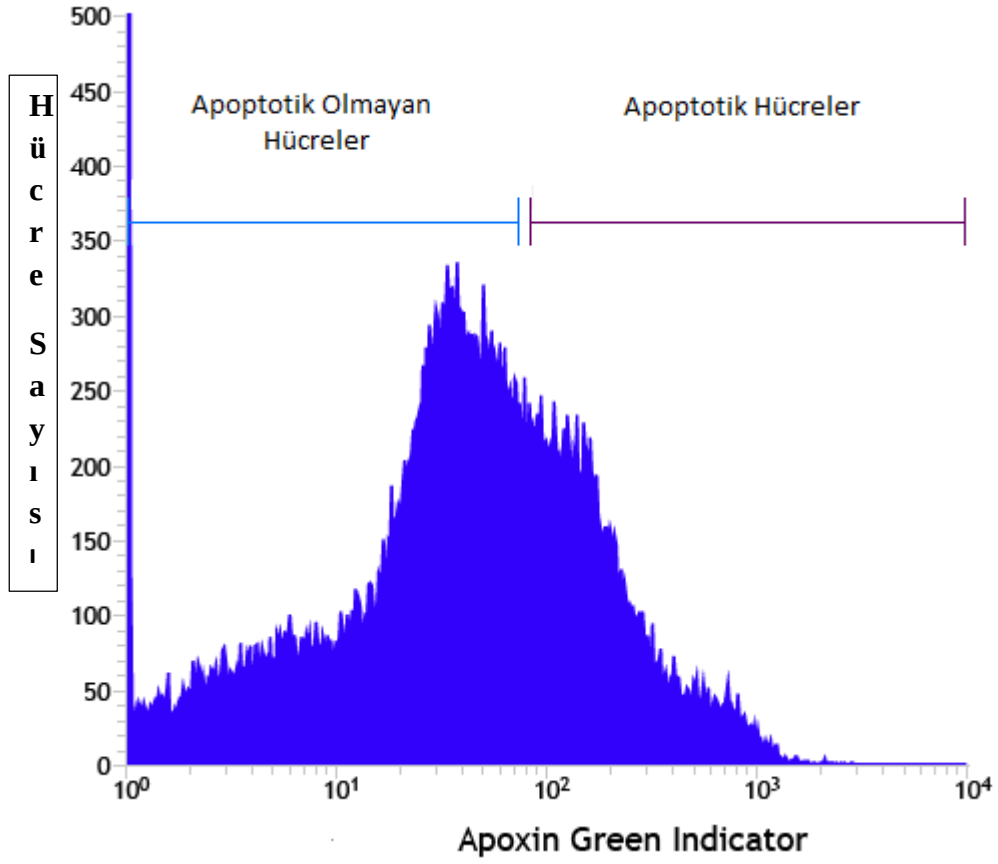
	Hücre Populasyonu	% değer
Canlı Hücreler	27.128	% 66.29
Ölü Hücreler	13.555	% 33.12



Şekil 6.2.2.2 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin CytoCalcein Violet 450 pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.2 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubuna ait hücrelerin CytoCalcein Violet 450 ile belirlenen canlılık % değerleri.

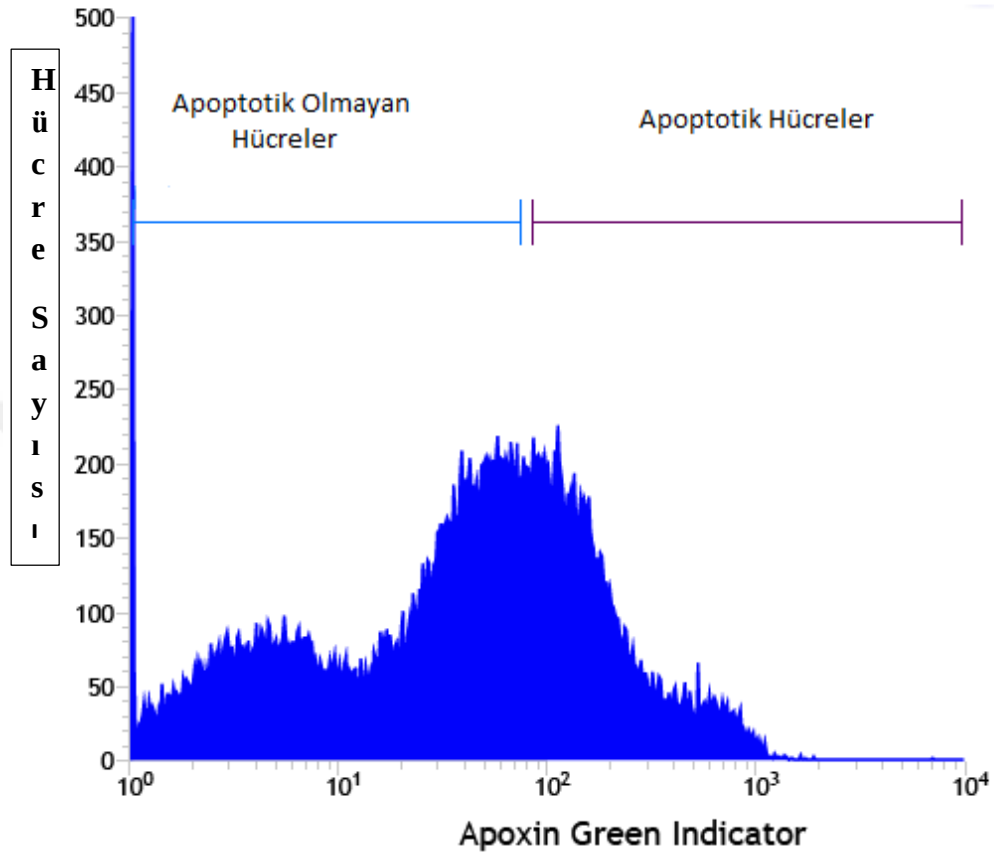
	Hücre Populasyonu	% değer
Canlı Hücreler	14.496	% 39.82
Ölü Hücreler	21.660	% 59.61



Şekil 6.2.2.3 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin Apoptin Green Indicator pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.3 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin Apoptin Green Indicator ile belirlenen apoptotik % değerleri.

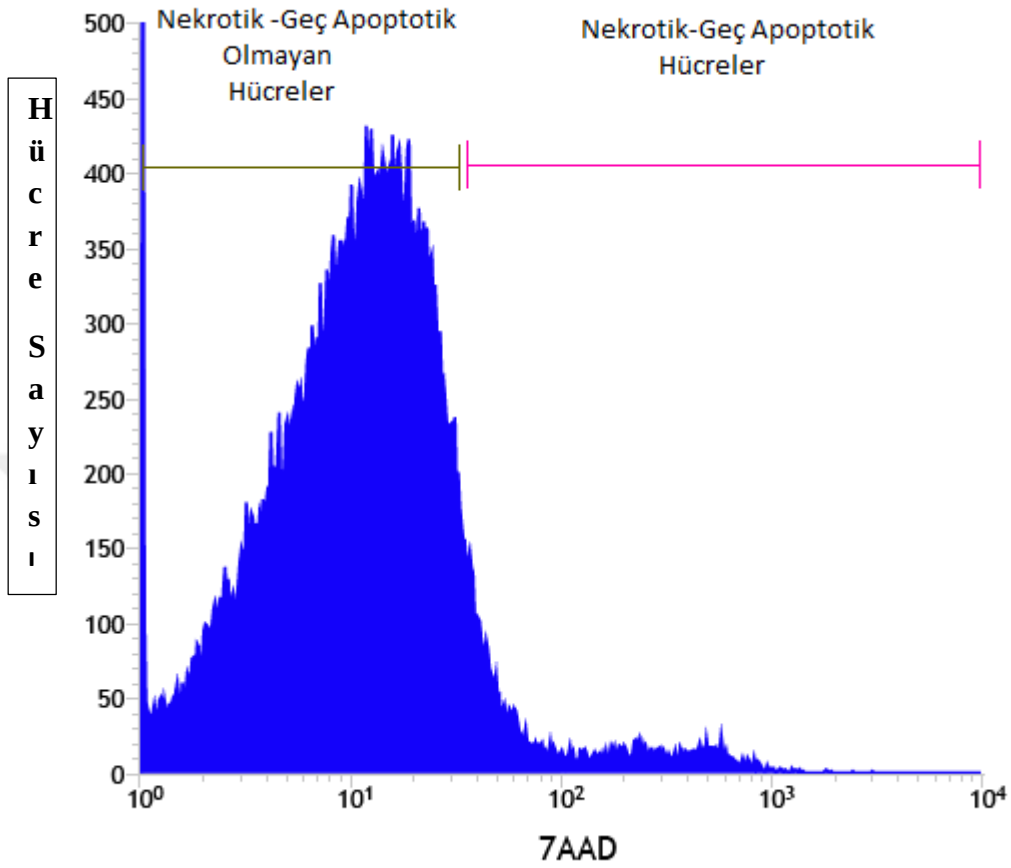
	Hücre Populasyonu	% değer
Apoptotik Olmayan Hücreler	27.002	% 65.98
Apoptotik Hücreler	13.169	% 32.18



Şekil 6.2.2.4 *O. albiflora* ekstresinin İK₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin Apoptin Green Indicator pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.4 *O. albiflora* ekstresinin İK₅₀ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin Apoptin Green Indicator ile belirlenen apoptotik % değerleri.

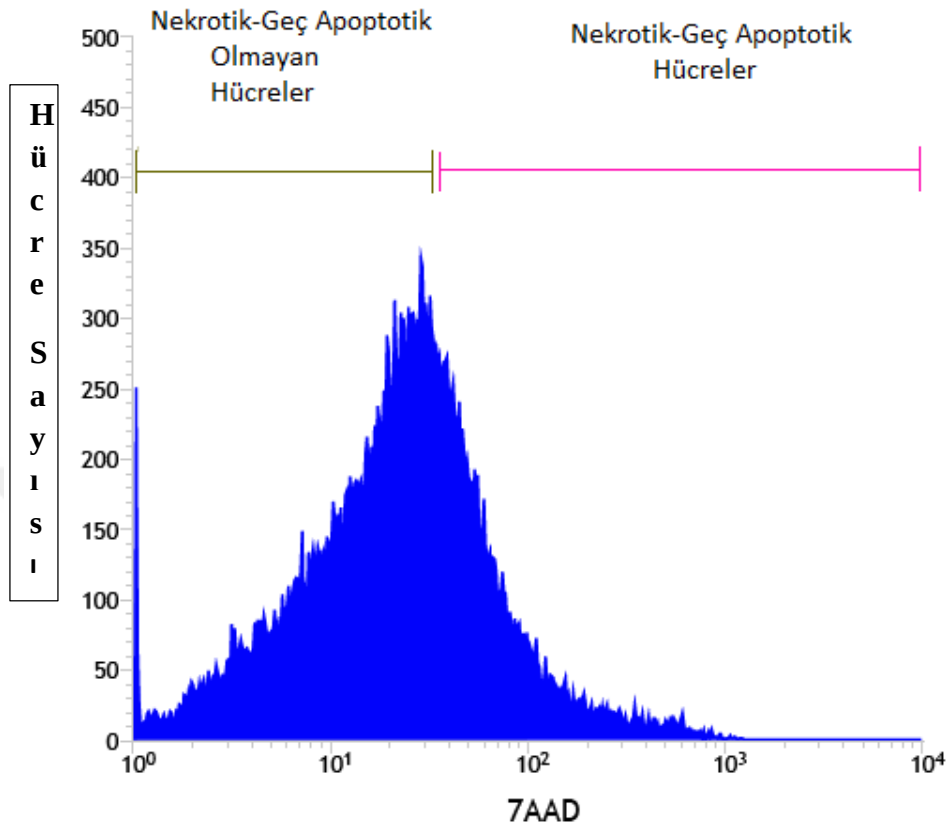
	Hücre Populasyonu	% değer
Apoptotik Olmayan Hücreler	22.727	% 62.55
Apoptotik Hücreler	12.839	% 35.33



Şekil 6.2.2.5 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin 7-AAD pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.5 *O. albiflora* ekstresiyle muamele edilmeyen kontrol grubuna ait hücrelerin 7-AAD ile belirlenen % değerleri.

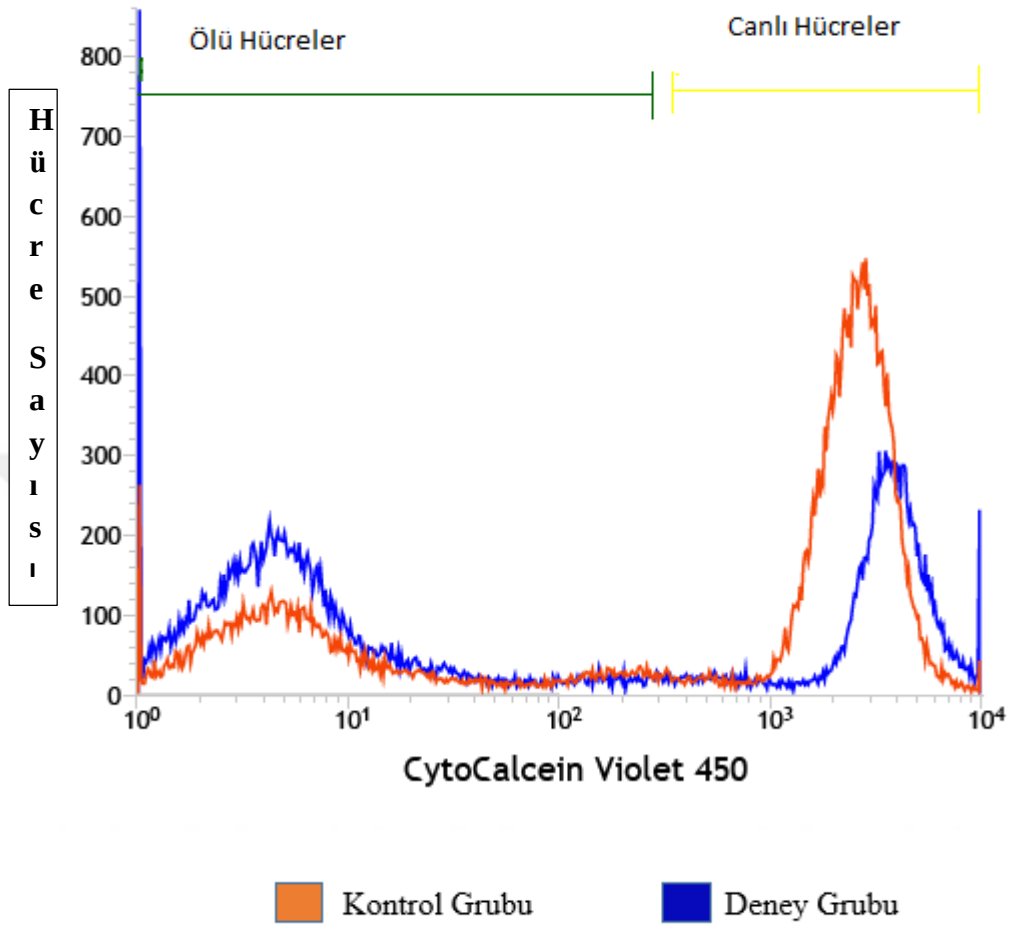
	Hücre Populasyonu	% değer
Nekrotik-Geç Apoptotik Olmayan Hücreler	36.759	% 89.93
Nekrotik-Geç Apoptotik Hücreler	3.874	% 9.47



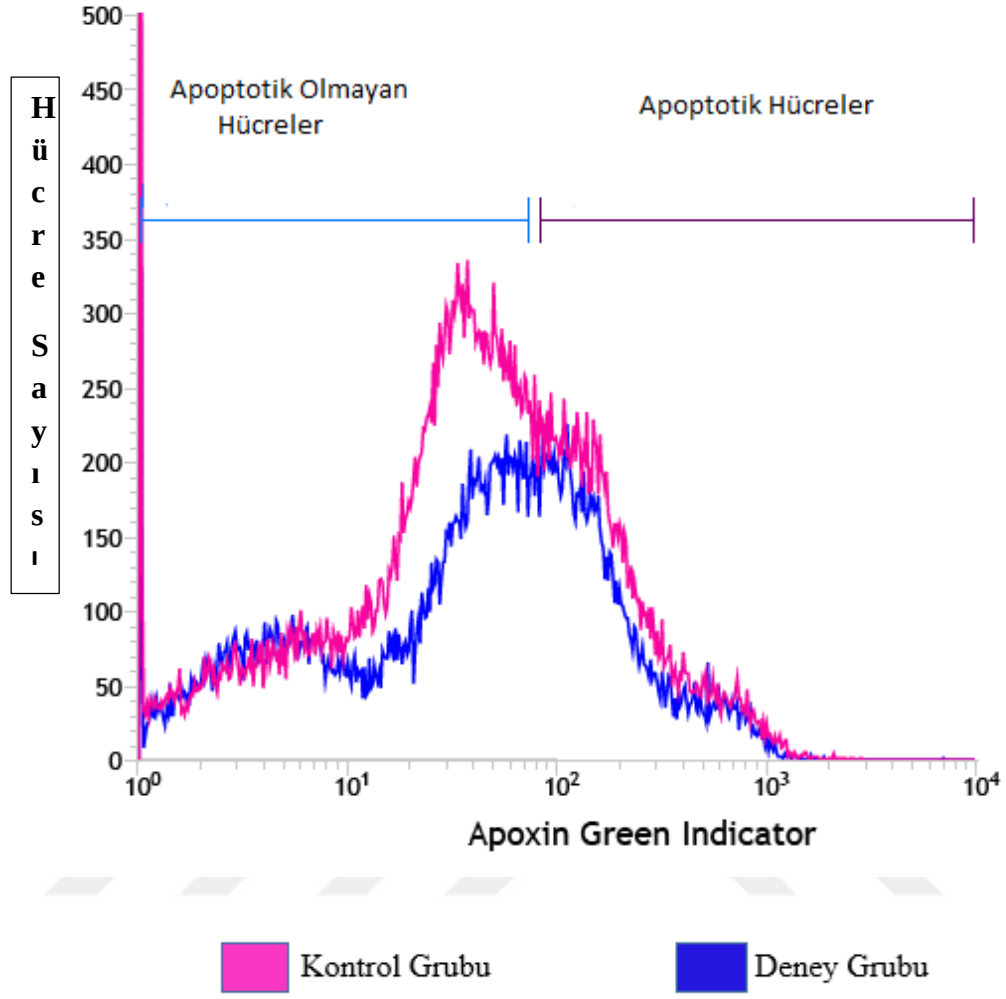
Şekil 6.2.2.6 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin 7-AAD pik oranı diyagramı.

Tablo 6.2.2.6 *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat muamele edilen deney grubu hücrelerinin 7-AAD ile belirlenen % değerleri.

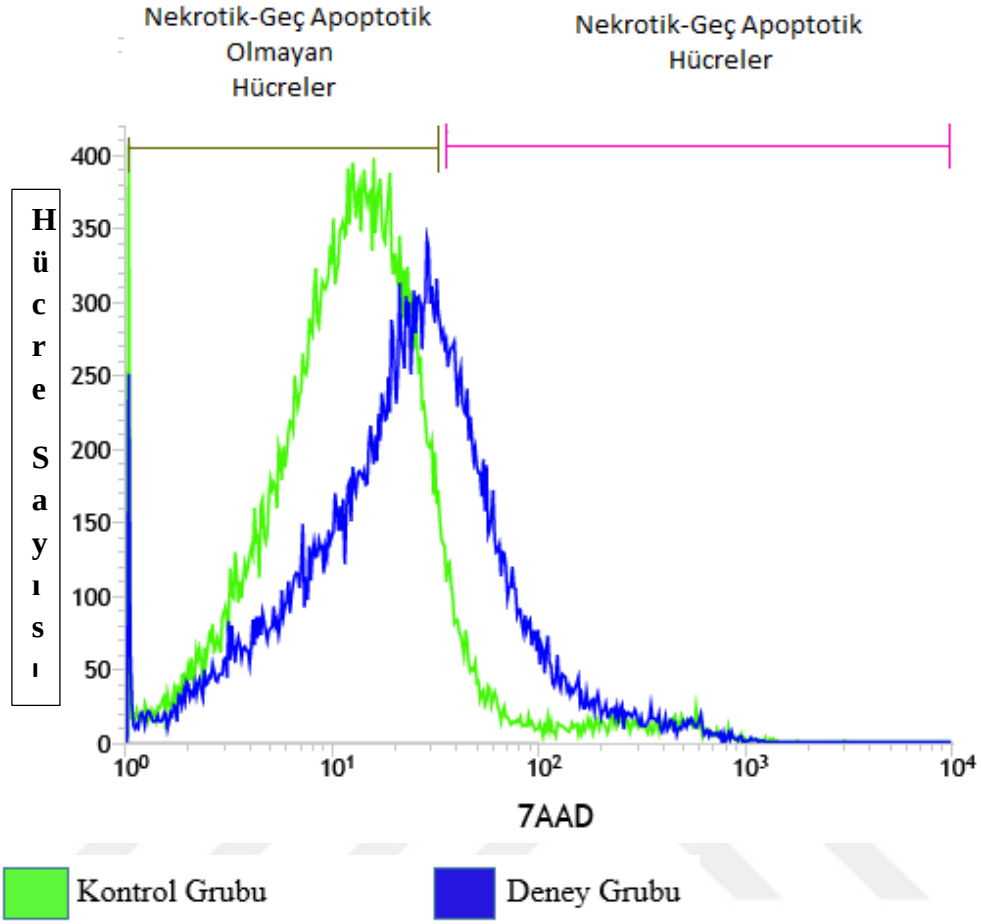
	Hücre Populasyonu	% değer
Nekrotik-Geç Apoptotik Olmayan Hücreler	23.471	% 64.59
Nekrotik-Geç Apoptotik Hücreler	12.305	% 33.86



Şekil 6.2.2.7 Deney ve Kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş CytoCalcein Violet 450 pik oranı diyagramı.

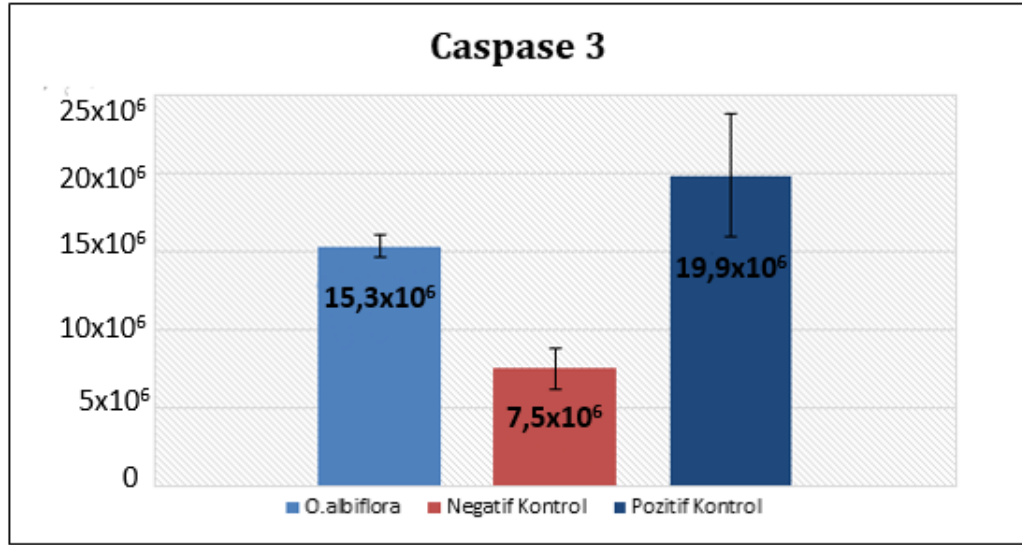


Şekil 6.2.2.8 Deney ve Kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş Apoptin Green Indicator pik oranı diyagramı.



Şekil 6.2.2.9 Deney ve Kontrol grubu hücrelerinin birleştirilmiş 7-AAD pik oranı diyagramı.

6.3. Florometrik Kaspaz 3 Analizi



Şekil 6.3.1 Deney grubu, pozitif ve negatif kontrol gruplarının Kaspaz 3 floresan değerleri.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tamamlayıcı tıp kullanımı son yıllarda, gelişmekte olan ve endüstrileşmiş birçok ülkede düzenli bir şekilde artmıştır. Buna paralel olarak kanser oluşumunun toksik olmayan doğal ürünler kullanılarak önlenmesi ve tedavisi ile ilgili yapılan araştırma sayısında da belirgin bir artış gözlenmektedir.

Biz de çalışmamızda kullanacağımız *Onobrychis* (Korunga) türlerinin (*Onobrychis argyrea*, *Onobrychis galegifolia*, *Onobrychis tournefortii*, *Onobrychis albiflora*) içeriğindeki flavonellerin, flavonların ve flavanların insan kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyonu önleyici ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz.

Onobrychis türlerinin içinde bulunduğu, halk arasındaki adıyla Korunga, soğuğa ve kurağa çok dayanıklı, diğer bitkilerin yetişmediği kıraç, kireçli topraklarda iyi gelişen ve sulanmayan topraklarda daha verimli olan bir bitkidir (129). Hem bu açıdan hem de yüksek besin değerine sahip olması açısından ülkemizin özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde yem bitkisi olarak geleneksel yöntemlerle kullanımı yaygındır. Korunga'nın farklı türleriyle yapılmış antikanser, antioksidan ve antibakteriyel etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (25-41).

Bitkilerin içeriğindeki bileşiklerin etanol ve/veya metanolde daha iyi çözündüğüne ve metanollü ekstrelerin sulu ekstrelerden daha fazla antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (44). Buna rağmen çalışmamızda sulu ekstre kullanmamızın nedeni *O. albiflora*, *O. argyrea*, *O. tournefortii* ve *O. galegifolia* türlerinin doğal yollarla tüketilmesinin barsak hücreleri üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesinde sulu ekstrenin daha uygun olacağı ve etanol ve/veya metanolün normal hücreler üzerinde toksik etkilerinin olabileceğinin düşünülmesinden dolayıdır. İzlediğimiz bu yöntem Isırgan Otu eksterisinin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmanın referansı ile de desteklenmiştir (130).

Bu çalışmada Korunga'ya ait *O. albiflora*, *O. argyrea*, *O. tournefortii* ve *O. galegifolia* türlerinin sulu ekstrelerinin kolon kanseri epitel hücreleri olan HCT-116 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri incelendi. Bunun yanında sağlıklı hücre

hatlarına karşı toksik etkilerinin anlaşılması için ise İnsan Embriyonik Kök Hücre Hattı olan HEK-293 hücreleri üzerinde de antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin incelemesi yapıldı.

Kolon kanseri olgularının çoğu adenokarsinoma olduğundan bu alanda yapılan çalışmalarda sıklıkla HT29 kolon adenokarsinoma hücre hattı tercih edilmektedir (126). Çalışmamızda HT-29 hücreleriyle benzer morfolojiye sahip HCT-116 hücreleri kullanılmıştır. (127).

Çalışmamızda herbaların 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml ve 0.5 mg/ml (w/v) konsantrasyonlarındaki ekstraktları kullanıldı. Bu konsantrasyonlarla yapılan MTT analizleri ile her bir konsantrasyonun HCT-116 ve HEK-293 hücre hatları üzerindeki IK_{50} değerleri belirlendi. HCT-116 hücrelerinde yapılan MTT analizleriyle 24 saatlik inkübasyon sonucunda *O. albiflora*'nın IK_{50} değeri 1.4 mg/mL, *O. galegifolia*'nin IK_{50} değeri 2.7 mg/mL, *O. tournefortii*'nin IK_{50} değeri 2 mg/mL ve *O. argyrea*'nin IK_{50} değeri 3.3 mg/mL olarak belirlenmiştir. Dört farklı tür arasından, *O. albiflora* HCT-116 hücre hattına karşı en aktif apoptotik etkiye sahipken, *O. argyrea* en az aktif olarak bulundu.

48 saatlik inkübasyon sonucunda ise *O. albiflora*'nın IK_{50} değeri 1.3 mg/mL, *O. galegifolia*'nin IK_{50} değeri 2.8 mg/ml, *O. tournefortii*'nin IK_{50} değeri 2.2 mg/ml, *O. argyrea*'nin IK_{50} 1.2 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Her iki inkübasyon süresinde de sonuçlar hücre canlılığı ve bitki ekstresinin konsantrasyonunun ters orantılı olduğunu ortaya koydu. IK_{50} değerleri açısından, 24 saatlik inkübasyon süresinin 48 saatlik inkübasyon süresine kıyasla çok da farklı olmadığı görülmüştür. 24 saat inkübasyonun, zaman açısından hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda avantaj sağlayacağı da göz önüne alınarak daha uygun olduğu görüşüne varılmıştır. Dört farklı tür arasından, HCT-116 hücre hattının *O. albiflora*'ya karşı en duyarlı olduğu ve minimum hücre canlılığının 4 mg/ml dozda elde edildiği görülmüştür. Öte yandan aynı hücre hattı ve *O. argyrea*'ya karşı en az duyarlı olup maksimum hücre canlılığı 1 mg /ml ile elde edilmiştir.

HEK-293 hücrelerinde yapılan MTT analizleriyle, 24 saatlik inkübasyon sonucunda *O. albiflora*'nın $İK_{50}$ değeri 1.7 mg/mL, *O. galegifolia*'nın $İK_{50}$ değeri 2.6 mg/ml, *O. tournefortii*'nin $İK_{50}$ değeri 1 mg/ml, *O. argyrea*'nın $İK_{50}$ 3.8 mg/mL olarak belirlenmiştir. Dört farklı tür arasından, *O. tournefortii* HEK-293 hücre hattına karşı en aktif apoptotik etkiye sahip olurken, *O. argyrea* ise en az aktif olarak bulundu.

48 saatlik inkübasyon sonucunda ise *O. albiflora*'nın $İK_{50}$ değeri 1.6 mg/mL, *O. galegifolia*'nın $İK_{50}$ değeri 4 mg/ml, *O. tournefortii*'nin $İK_{50}$ değeri 1.3 mg/ml, *O. argyrea*'nın $İK_{50}$ 3.6 mg/mL olarak belirlenmiştir. Dört farklı tür arasından *O. tournefortii* HEK-293 hücre hattına karşı en aktif olarak bulunurken, *O. galegifolia* ise en az aktif olarak bulundu.

Antikanser ilaçlarının tümör hücrelerine karşı seçici olması istenirken, bunun yanında sağlıklı hücreleri de öldürebildiği gözlenmektedir. Esas istenen ise sağlıklı hücre hatlarına karşı herhangi bir toksik etki göstermemesidir (6). Bu sebeple çalışmamıza, MTT analizi sonuçlarına göre belirlemiş olduğumuz, HCT-116 hücrelerine karşı en toksik etkiyi gösterirken HEK-293 hücrelerine karşı olabildiğince az aktif olan *O. albiflora* ekstresi ile devam etme kararı aldık.

İnsan diyetindeki ve tıbbi bitkilerdeki antioksidan ve flavonoid kaynaklar araştırılması gereken önemli konular arasındadır. Fenolik bileşiklerin ve özellikle flavonoidlerin kanserin görülme sıklığını azalttığı ve kanserin tedavisinde, özellikle tamamlayıcı tedavide önemli yeri olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (128). Fabacea familyasına ait *Onobrychis* cinsinin içerdiği flavonlardan; afzelin (27), kuersetin (28), inositol (29), viteksin (37), mirisetin (39), Ebenfuran III (40) ve 2 arylbenzofuran (41), hidroksibenzoik asitlerden; sinamik asit (31), gallik asit (32), vanilik asit (33), kafeik asit (34), kumarik asit (35), ferulik asit (36) antikanserojen etkiye sahip bileşiklerdir. Literatürde *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine dair daha önce yapılmış çalışmalar mevcut değildir. Fakat *O. albiflora* içeriğindeki flavonların ve hidroksibenzoik asitlerin ayrı olarak kolorektal kanser ve farklı kanser hücre hatları üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (25-41).

Bitki fenoliklerinden olan ferulik asit ve kumarik asit'in kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin gen ekspresyonunu

azaltma yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsan kolorektal kanser hücre hattı HCT 15 üzerinde yapılan sitotoksikite deneyleri, her iki bileşiğin, kontrollü konsantrasyon temelinde kolorektal kanser hücrelerinin öldürülmesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte yapılan PCR analizleriyle EGFR ekspresyonunun, bu bileşikler varlığında azalarak düzenlendiği gözlemlenmiştir (35).

Flavonid ve fenolik türevi olmadığı halde kolon kanseri hücre hattında anti-proliferatif etki gösteren farklı türde maddeler de bulunmaktadır. Bunlardan biri sinnamik asit türevi olan trans sinnamik'dir. Kolon kanseri hücre serisi olan HT29 hücrelerinin sinnamik asit türevi olan Trans-sinamik asit (tCA) ile muamele edildiği bir çalışmada MTT analizleri sonucu hücre proliferasyonunda %50 azalmaya *neden* olan konsantrasyonun (IK_{50}) ~1 mM olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında yapılan Western Blot Analizleri ile, tCA'nın HDAC inhibitörü Trichostatin A'nın etkileri ile tutarlı olan asetil-H3 ve asetil-H4 proteinlerinin ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca hücre proliferasyonunun bir belirteci olan Bcl-2'nin ekspresyonunun azaldığı ve apoptozun indüklendiği kaydedilmiştir (31).

Ratlarda 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ile indüklenmiş kolon kanseri modeli üzerinde İnositol heksafosfat'ın (IP6) antikanserojenik etkisi ve altında yatan mekanizmanın araştırıldığı bir çalışmada IP6'nın PI3K / Akt ve Wnt yolaklarında gerçekleştirdiği değişimlerle antiproliferatif etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir (29).

Tüm bu bileşiklerin yanı sıra çok sayıda medikal çalışmada kullanılan D-Pinitol'ün ana kaynağının ise Onobrychis cinsinin de içinde bulunduğu Fabaceae (Legüminosae) familyası olduğu gösterilmiştir (25). 1950'li yıllarda Plouvier Victor Fabacea familyasına ait 54 türden yüksek oranda Pinitol izolasyonu gerçekleştirmiştir (26).

D-Pinitol'ün, prostat kanseri hücreleri (PC3 ve DU145) ile yapılan çalışmada invazyon ve hücre göçünü azalttığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. D-Pinitol ile tedavi edilen prostat kanseri hücrelerinde $\alpha\beta3$ integrin'in (hücre adezyon molekülü) mRNA ve hücre membranı ekspresyonlarının azaldığı kaydedilmiştir (30). Başka bir çalışmada ise D-Pinitol'ün, p53 ve Bax'ın indüklenmesi ve Bcl-2 ve

NF-kB'nin inhibisyonu yoluyla MCF-7 hücrelerinde apoptozu desteklediği görülmektedir (13).

Benzer birçok çalışmada, yapılan hücre canlılığı analizleri referans alındığında, sonuçlar çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz hücre canlılığı deneyleriyle belirgin olarak paralellikler göstermektedir.

Hücre canlılık testi olan MTT analizi sonuçları, AnnexinV-FITC Apoptoz/Nekroz Akış Sitometri Analizi, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz Akış Sitometri Analizi ve Florometrik Kaspaz 3 Analizleri ile desteklendi.

FACS analizleri yapılırken dublet diskriminasyonu metodu ile birbirine yapışmış olan hücreler analiz dışı bırakıldı. Ayrıca Akış Sitometrisi Analizi sırasında örnekler içerisindeki hücre dışı partiküllerin analiz dışında bırakılması için yalnızca Draq5 (çekirdek boyası) ile işaretlenmiş olan hücreler alt grup olarak seçildi, hücre debrisleri analiz dışında bırakıldı.

AnnexinV-FITC Apoptoz/Nekroz kitiyle yaptığımız Akış Sitometrisi Analizleri sonucunda kontrol grubuna ait HCT-116 hücrelerinin % 80.60'nın canlı, % 8.56'sının apoptotik, % 6.35'inin nekrotik olduğu tespit edildi. *O. albiflora* ekstresinin İK₅₀ değeri ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinin ise % 24.18'inin canlı, % 25.95'inin apoptotik ve % 31.21'inin nekrotik olduğu gösterildi. Kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 hücrelerini apoptoza oranla daha çok nekroza yönlendirdiği görüldü.

Onobrychis cinsinin de içeriğinde bulunan flavonlardan olan Kuersetin ile yapılan bir çalışmada 10, 20, 40, 80 ve 120 µM dozları, Kolon kanseri CT-26 hücreleri üzerine uygulanmıştır. AnnexinV/PI boyamasıyla Kuersetin'in, kontrol grubuna kıyasla CT-26 hücre dizilerinin apoptozunu önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (28). Bu sonuçlar çalışmamızda uyguladığımız AnnexinV/PI analiz sonuçlarıyla yüksek düzeyde benzerlik göstermektedir.

Yapılan Annexin V-FITC Apoptoz/Nekroz analizleri, Apopxin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz kiti ile akış sitometri yöntemiyle desteklendi. CytoCalcein Violet 450

boyası canlı hücrelerin sitoplazmalarında tutunarak mavi floresan renk verir. Bu sayede canlı hücreleri kolayca ayırt etmeyi sağlar. Akış sitometri analiziyle *O. albiflora* ekstresiyle inkübe edilmeyen kontrol grubuna ait HCT-116 hücrelerinin Cytocalcein Violet 450 ile belirlenen canlılık testinde, hücrelerin % 66.29'unun canlı, % 33.12'sinin ölü olduğu gösterildi. *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin ise % 59.61'inin canlı, % 39.82 'sinin ölü olduğu tespit edildi. Sonuçlar beklediğimiz gibi neredeyse kontrol grubuyla tam tersi oranlar sergiledi.

Apopxin Green indikatörü ajanı apoptozun erken safhasında hücre membranının dış yüzeyine yer değiştirmiş fosfatidilserin molekülleriyle bağlanarak apoptotik hücrelerin yeşil floresan vermesini sağlar. Akış sitometri analiziyle *O. albiflora* ekstresiyle inkübe edilmeyen kontrol grubuna ait HCT-116 hücrelerinin, Apopxin Green Indicator ile belirlenen apoptoz testinde hücre popülasyonunun % 32.18'sinin apoptotik, % 65.98'sinin apoptotik olmayan hücrelerden oluştuğu gösterildi. *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat inkübe edilen hücre popülasyonunun ise % 35.33'ünün apoptotik, % 62.55'inin apoptotik olmayan hücrelerden oluştuğu belirlendi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında apoptotik hücre sayısında belirgin bir değişim olmaması ölüm mekanizmasında apoptoz yerine nekrozun öne çıktığı fikri üzerine yoğunlaşmamıza neden oldu.

Plazma bütünlüğünün kaybedilmesi apoptozun ileri safhalarında ve nekrozda karakteristik bir olaydır. 7-AAD membran geçirimsiz bir boyadır. Membran bütünlüğünü kaybetmiş hücrelerde ise zardan geçerek çekirdeği boyayıp kırmızı floresan vermesini sağlar. *O. albiflora* ekstresiyle inkübe edilmeyen kontrol grubuna ait HCT-116 hücrelerinin 7-AAD ile belirlenen nekroz testinde hücre popülasyonunun % 9.47'sinin nekrotik hücrelerden, % 89.93'ünün nekrotik olmayan hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. *O. albiflora* ekstresinin $İK_{50}$ değeri ile 24 saat inkübe edilen hücre popülasyonunun ise % 33.86'sının nekrotik hücrelerden, % 64.59'unun ise nekrotik olmayan hücrelerden oluştuğu belirlendi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 hücrelerini belirgin şekilde nekroza yönlendirdiği kaydedildi.

Onobrychis cinsi içeriğinde bulunan Kafeik Asit ile ilgili Kolon Kanseri Hücre hattında FACS yöntemi ile gözlenmiş spesifik bir Apoptoz/Nekroz bulunmasa da İnsan Servikal Karsinom SiHa hücrelerinde yapılan FACS analizleri, Kafeik asit'e maruz kalan serviks kanseri hücrelerinde en belirgin ölüm şeklinin nekroz olduğu kaydedilmiştir (34). Apoptin Green ve 7-AAD Apoptoz/Nekroz çalışmamızdaki sonuçlarla uyumluluk göstermiştir.

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünde rol oynayan bir proteaz enzimi ailesidir. ICE (interlökin-1-beta converting enzim) ailesinden proteazların/kaspazların aktivasyonu, memeli hücrelerinde apoptozu başlatır. Bu nedenle apoptoz mekanizmalarında Kaspaz 3'ler majör belirteçlerden biridir. Çalışmamızın devamında *O. albiflora* ekstresinin HCT-116 hücreleri üzerindeki ölüm mekanizmasındaki apoptoz düzeyini daha açık bir şekilde tespit edebilmek için Florometrik Kaspaz 3 Analizi yapıldı. Florometrik Kaspaz 3 Analizinde Negatif kontrol grubunun Kaspaz 3 ekspresyonu floresan değeri $7,5 \times 10^6$ olarak belirlenirken deney grubuna ait floresan değeri neredeyse iki kat artarak $15,3 \times 10^6$ belirlendi. Buna ek olarak Pozitif Kontrol Grubunun floresan değeri $19,9 \times 10^6$ ile belirgin bir paralellik gösterdi. Çalışmamıza benzer olarak gerçekleştirilen başka bir deneyde, CaCo-2 kolon kanseri hücreleri üzerinde *Onobrychis* cinslerinin içeriğinde de bulunan Viteksinin, Kaspaz etkinlik testleri yoluyla da pro-apoptotik etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak Kaspaz 9, 8 ve 3'ün aktivasyonu yoluyla CaCo-2 hücrelerinin proliferasyonunu engellediği ortaya konmuştur (37).

Oksijenin normal fizyolojik konsantrasyonları hücrelerin metabolik aktivitleri için gerekli iken yüksek miktarda oluşan reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikaller oluştururlar ve DNA mutasyonlarına sebep olurlar. Kanserin birçok türünün serbest radikal oluşumuyla yakından ilgili olduğu bilinmektedir. *O. hypargyrea*, *O. Armena* ve *O. viciifolia* türlerinin ekstratlarıyla yapılan analizlerde, bu türlerin belirgin antioksidan etkiler sergiledikleri gösterilmiştir (46,47,48,49). Bu referanslar göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda kullandığımız *O. albiflora* türünün kanser hücrelerindeki apoptotik etkisinin yanı sıra, analizlerin devamı halinde, antioksidan potansiyele sahip etkisinin de ortaya çıkarılarak dolaylı olarak kanser oluşumunu önleyebileceğini düşündürmektedir.

Kronik iltihap oluştuğunda, makrofajlar zararlı bir etkiye sahiptir. Hücre dışı matriksi yok etmeyi, apoptozu, hücre çoğalmasını ve anjiyogenezi teşvik ederler. Fakat böyle durumlarda apoptoz mekanizmasında kontrol rolü oynayan enzimler ve genler mutasyona uğramış veya hasar görmüş ise tümör gelişiminin ortaya çıkması da söz konusudur (76,77). Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar kaynaklı olan hastalarda KKK gelişimi riski artmaktadır. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında kolorektal kanser yatkınlığını açıklayan bilinen bir genetik temel bulunmamaktadır. Burada kansere neden olan etmenin kronik iltihaplanma olduğu varsayılmaktadır. İltihaplanmaya bağlı kolon kanseri Kolit Bağımlı Kolon Kanseri olarak da adlandırılır (70). Bu yüzden inflamasyonun ve onun inhibisyonunu sağlayacak mekanizmaların iyi bilinmesi gerekir (76,77). 5-lipoksigenaz enzimi (5-LOX) ve COX-2 enzimi inflamatuvar yanıtta en önemli iki yolaktır (81, 82). İnsan kolon karsinomlarının % 80'inden fazlasında COX-2'nin aşırı ekspresyonu kaydedilmiştir ve kanser hücresi sağkalımını tümör anjiyogenezisini destekleyen önemli bir oyuncu olduğu düşünölmektedir (80). İnflamasyona bağlı kolon kanserinde COX-2 ekspresyonunun artışıının inflamatuvar cevabı uzatmada etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, COX-2'nin inhibe edilmesinin kanser gelişimini azaltabileceği düşünölebilir. Sentetik ve non-steroidal anti-inflamasyon ajanlarının yan etkileri dikkate alındığında ise doğal COX-2 önleyicilerin daha güvenilir olduğu söylenebilir. Fakat bunun kanıtlarını ortaya koymak için etkili doz ve sürenin nasıl olacağı üzerinde yapılan çalışmaların artırılması gerekir. *Onobrychis* sp. türleri içinde bulunan bileşiklerden Afzelin, Kaempferol ve Arbutin'in, COX-2 inhibitörü özelliğine sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (83, 84, 85). Ayrıca ana kaynağının *Onobrychis* sp. olduğu belirtilen Pinitol'ün de antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (93). Bu bilgiler dikkate alındığında *Onobrychis* türlerinde bulunan değişik kimyasal bileşenlerin seçici COX-2 inhibitörü olma özellikleri sayesinde de kanser gelişiminin önlenmesinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceği söylenebilir.

Tamamlayıcı tedavi yöntemlerinin son yıllarda gelişmesiyle birlikte insanların fitoterapiye olan ilgileri ve kullanım sıklıkları artmıştır. Geleneksel olarak bitkilerin çeşitli kısımlarını sulu çözelti halinde kaynatarak, demleyerek ve su içinde bekletme şeklinde kullanım yöntemleri mevcuttur. Bu şekilde kullanım yaygın olsa da yeterince

güvenilir değildir. Çünkü geleneksel kullanım yöntemlerindeki dozlar bilimsel yaklaşımlarla belirlenmemektedir. Bu da beklenmedik akut veya kronik problemler doğurabilir. Örneğin ana kaynağı Fabaceae familyası olan D-Pinitol'un antikanser özelliğinin yanı sıra, insülin benzeri kan şekeri düşürücü etkisinin olduğu da gösterilmiştir (131). Bu açıdan bakıldığında doz bilgisi olmadan, geleneksel yöntemlerle kullanılan D-Pinitol içerikli bitkilerin doz aşımı halinde şeker metabolizmasına zarar vererek ciddi problemler yaratabileceği düşünülebilir.

Çeşitli bitkilerin ekstraktlarından izole edilen etken maddelerle yapılan ilaçların ve araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktaysa da insanların geleneksel yöntemlerle kullandıkları bitkilerin içeriğindeki kimyasalları izole etmeleri mümkün değildir. Bu yönüyle etkiyi bitkinin bütününden beklemektedirler. Mevcut birçok çalışmada bitki içeriğindeki bileşiklerin ayrı ayrı tıbbi etkileri araştırılmaktadır. Fakat bu yöntem içerikteki bütün kimyasalların bir arada kullanılması halinde birbirileriyle etkileşimlerinin doğuracağı sonuçları öngörememektedir. Çalışmamız bu yönüyle özgün ve önemlidir.

Çalışmamızla elde edilen datalar dikkate alındığında ve analizlerin devamı halinde daha birçok endemik türün tıbbi amaçlarla kullanım potansiyellerinin incelenmesine ışık tutulacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanseri İstatistikler, Ankara, 2016.
2. Skibber, John M., B. D. Minsky, and P. M. Hoff. "Cancer of the colon." *Cancer: principles and practice of oncology*, 1216-1270, 2001.
3. Özçelik, Gökhan, and Dilek Toprak. "Why is Phytotherapy Preferred? " *Ankara Medical Journal* 15.2, 2011.
4. Yıldız, İ. "Kanserli Hastalarda Tamamlayıcı-Alternatif Tedavi Kullanımı" *Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul*, 2006.
5. Rostami S. "Yaygın veya Endemik Olan Bazı Bitki Türlerinin Antiproliferatif ve Antiinflamatuvar Etkilerinin Araştırılması" *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 2013.
6. Desai AG, Ghulam NQ, Ramesh KG, et al. "Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Curr Drug Metab*" 9: 581-591, 2008
7. Jian, Le, et al. "Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China." *International journal of cancer* 108.1, 130-135, 2004.
8. Baytop, T. "Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)" , 480, 1998.
9. Aktoklu, E. "Türkiye’de yetişen Onobrychis Miller (Fabaceae) türlerinin revizyonu " *T.C. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Sivas*, 1995.
10. Marais JPJ, Mueueller-Harvey I, Brandt EV, Ferreira D: Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J Agric Food Chem*, 48, 3440–3447, 2000.
11. Meli, R., G. Di Carlo, and F. Capasso. "Inhibitory action of quercetin on intestinal transit in mice." *Phytotherapy Research* 4.5: 201-202, 1990.
12. Poongothai, G., and SHUBASHINI K. Sripathi. "A review on insulinomimetic pinitol from plants." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4.2: 992-1009, 2013.

13. Rengarajan, Thamaraiselvan, et al. "D-Pinitol Promotes Apoptosis in MCF-7 Cells via Induction of p53 and Bax and Inhibition of Bcl-2 and NF-kappa B." *Asian Pac J Cancer Prev* 15.4: 1757-1762, 2014.
14. Lin, Tien-Huang, et al. "D-pinitol inhibits prostate cancer metastasis through inhibition of $\alpha V\beta 3$ integrin by modulating FAK, c-Src and NF- κ B pathways." *International journal of molecular sciences* 14.5: 9790-9802, 2013.
15. Rengarajan, Thamaraiselvan, et al. "d-pinitol mitigates tumor growth by modulating interleukins and hormones and induces apoptosis in rat breast carcinogenesis through inhibition of NF- κ B." *Journal of physiology and biochemistry* 71.2: 191-204, 2015.
16. Çeçen S, Öten M, and Erdurmuş C. "Antalya doğal florasında bulunan korunga (*Onobrychis sativa* L.) populasyonlarının toplanması ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi." *Derim* 32.1: 63-70, 2015.
17. Halabalaki, Maria, et al. "Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*." *Planta medica* 72.06: 488-493, 2006.
18. Açıkgöz, E. Annual Forage Legumes in The Arid and Semi-Arid Regions of Turkey. Nitrogen Fixation By Legumes İn Mediterranean Agriculture. (Eds.: D.B. Beck And L.A. Materon). Martinus Nijhoff Publ. Pp. 47-54, 1988.
19. Akcelik, E. Bazı Yabani KORUNGA (*Onobrychis* sp.) Türlerinin Kromozom Sayılarının tespiti ve Karyotip Analizi, Ankara, 2009.
20. Türkiye Bitkileri Veri Servisi, www.tbves.com, Erişim Tarihi: 05.12.2017
21. Marais, Jannie PJ, et al. "Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48.8: 3440-3447, 2000.
22. Lu, Yinrong, et al. "Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*." *Phytochemistry* 55.1: 67-75, 2000.
23. Halabalaki, Maria, et al. "Ebenfurans IV– VIII from *Onobrychis ebenoides*: Evidence that C-Prenylation is the Key Determinant of the Cytotoxicity of 3-Formyl-2-arylbenzofurans." *Journal of natural products* 71.11: 1934-1937, 2008.
24. Regos, Ionela, Andrea Urbanella, and Dieter Treutter. "Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*)." *Journal of agricultural and food chemistry* 57.13: 5843-5852, 2009.

25. Poongothai, G., and Shubashini K. Sripathi. "A review on insulinomimetic pinitol from plants." *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4.2: 992-1009, 2013.
26. Plouvier Victor, Pinitol in legumes. Quercitol in *Pterocarpus lucens*, *Compt. rend*, 241: 1838-1840, 1955.
27. Zhu, Kai Chang, et al. "Afzelin exhibits anti-cancer activity against androgen-sensitive LNCaP and androgen-independent PC-3 prostate cancer cells through the inhibition of LIM domain kinase 1." *Oncology letters* 10.4: 2359-2365, 2015.
28. Hashemzaei, Mahmoud, et al. "Anticancer and apoptosis inducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo*." *Oncology Reports* 38.2: 819-828, 2017.
29. Yu, Wenyang, et al. "Inositol hexaphosphate suppresses colorectal cancer cell proliferation via the Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling cascade in a 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model." *European journal of pharmacology* 805: 67-74, 2017.
30. Lin, Tien-Huang, et al. "D-pinitol inhibits prostate cancer metastasis through inhibition of α V β 3 integrin by modulating FAK, c-Src and NF- κ B pathways." *International journal of molecular sciences* 14.5: 9790-9802, 2013.
31. Zhu, Bingyan, et al. "Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice." *Molecular medicine reports* 13.5: 4159-4166, 2016.
32. Pang, Jong-Hwei S., et al. "Gallic Acid Inhibited Matrix Invasion and AP-1/ETS-1-Mediated MMP-1 Transcription in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 18.7: 1354, 2017.
33. Anbalagan, Vinoth, KowSAlyA RAju, and MAnohARAn ShAnMugAM. "Assessment of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Vanillic Acid Treated 7, 12-Dimethylbenz [a] anthracene Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis." *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 11.3, 2017.
34. Tyszkka-Czochara, Malgorzata, Karolina Bukowska-Strakova, and Marcin Majka. "Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation." *Food and Chemical Toxicology*, 2017.

35. Roy, Nabarun, et al. "Plant phenolics ferulic acid and p-coumaric acid inhibit colorectal cancer cell proliferation through EGFR down-regulation." *Asian Pac J Cancer Prev* 17.8: 4019-4023, 2016.
36. Eitsuka, Takahiro, et al. "A combination of δ -tocotrienol and ferulic acid synergistically inhibits telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells." *Journal of nutritional science and vitaminology* 62.5: 281-287, 2016.
37. Scarpa, Emanuele Salvatore, et al. "Antiproliferative activity of vitexin-2-O-xyloside and avenanthramides on CaCo-2 and HepG2 cancer cells occurs through apoptosis induction and reduction of pro-survival mechanisms." *European Journal of Nutrition*: 1-15, 2017.
38. Borse, Vikrant, et al. "Epigallocatechin-3-gallate, a prototypic chemopreventative agent for protection against cisplatin-based ototoxicity." *Cell Death & Disease* 8.7: e2921, 2017.
39. Zheng, Ai Wen, et al. "Myricetin induces apoptosis and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells." *Oncology Letters* 13.6: 4974-4978, 2017.
40. Roumeliotis, Theodoros I., et al. "Pharmacoproteomic study of the natural product Ebenfuran III in DU-145 prostate cancer cells: The quantitative and temporal interrogation of chemically induced cell death at the protein level." *Journal of proteome research* 12.4: 1591-1603, 2013.
41. Katsanou, Efrosini S., et al. "Cytotoxic effects of 2-arylbenzofuran phytoestrogens on human cancer cells: modulation by adrenal and gonadal steroids." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 104.3: 228-236, 2007.
42. Watson, Baker, Bell, Gann, Levine, Losick, *Molecular Biology of the Gene*. s.267 Pearson Int, 2008.
43. Kanter, M., Coskun, O , Budancamanak, M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L and *Urtica dioica* L on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World J Gastroenterol*. 11(42): 6684-6688, 2005.
44. Mavi, A., ve ark. Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium*

verum subsp. verum (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). Biol. Pharm. Bull. 27(5): 702—705, 2004.

45. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem;47(10):3954-62. doi:10.1021/jf990146l, 1999.

46. Zengin, Gokhan, et al. "Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey." Advances in pharmacological sciences, 2015.

47. Karakoca, Kubra, et al. "Phenolic compounds, biological and antioxidant activities of *Onobrychis armena* Boiss. & Huet flower and root extracts." Chiang Mai J Sci 42.2: 376-392, 2015.

48. Karamian, Roya, and Mostafa Asadbegy. "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three *Onobrychis* species from Iran." Pharm Sci 22.2: 112-9, 2016.

49. Ince, Sinan, Husamettin Ekici, and Begum Yurdakok. "Determination of *in vitro* antioxidant activity of the sainfoin (*Onobrychis Viciifolia*) extracts." Ank Univ Vet Fak Derg 59.1: 23-7, 2012.

50. Smith JA, Martin L. Do cells cycle? Proc Natl Acad Sci U S A;70:1263-7, 1973.

51. Nigg, Erich A. "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." Bioessays 17.6: 471-480, 1995.

52. D. O. Morgan, Nature 374, 131, 1995.

53. Elledge, Stephen J. "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." Science 274.5293: 1664, 1996.

54. Kastan, Michael B. and Jiri Bartek. "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature432.7015: 316, 2004.

55. Kastan, M. B. & Lim, D.-S. The many substrates and functions of ATM. Mol. Cell Biol. 1, 179–186, 2000.

56. Bartek, J. & Lukas, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell 3, 421–429, 2003.

57. Wahl, G. M. & Carr, A. M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. Nature Cell Biol. 3, E277–E286, 2001.

58. Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol.* Oct;32(5):452-7, 2005.
59. Maller JL. MPF and cell cycle control. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*;24:323-8. Review, 1990.
60. Pazarbaşı, Ayfer, and Mülkiye Kasap. "Kanser Genetiği." *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 12.4, 2003.
61. Lewin B. *Genes*, 1089, 1997.
62. Cooper GM. *The Cell, A Molecular Approach*, 521, 1997.
63. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Erişim Tarihi: 08/05/2017
64. Demant, Peter. "The genetic factors in cancer development and their implications for cancer prevention and detection." *Radiation research* 164.4: 462-466, 2005.
65. Bos, Johannes L. "Ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer research* 49.17: 4682-4689, 1989.
66. Sancar, Aziz, et al. "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annual review of biochemistry* 73.1: 39-85, 2004.
67. <http://www.who.int/cancer/detection/colorectalcancer/en/> Erişim Tarihi: 08/05/2017
68. Disario, James A., et al. "Colorectal cancers of rare histologic types compared with adenocarcinomas." *Diseases of the colon & rectum* 37.12: 1277-1280, 1994.
69. American Cancer Society. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016*. Son Erişim Tarihi: 08/05/2017
70. Terzić, Janoš, et al. "Inflammation and colon cancer." *Gastroenterology* 138.6: 2101-2114, 2010.
71. Jasperson, Kory W. et al. "Hereditary and familial colon cancer." *Gastroenterology* 138.6: 2044-2058, 2010.
72. Burt RW, Bishop DT, Lynch HT, et al. Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ*;68:655-65, 1990.
73. Kemp, Zoe, et al. "An update on the genetics of colorectal cancer." *Human molecular genetics* 13.suppl_2: R177-R185, 2004.

74. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*; 11:738–49, 2011.
75. Barin JG, Rose NR, Cihakova D. Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review. *Immunobiology*; 217:468–75, 2011.
76. Papageorgiou AP, Heymans S. Interactions between the extracellular matrix and inflammation during viral myocarditis. *Immunobiology*; 217:503–10, 2011.
77. Chen YW, Pat B, Gladden JD, Zheng J, Powell P, Wei CC, et al. Dynamic molecular and histopathological changes in the extracellular matrix and inflammation in the transition to heart failure in isolated volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 300:H2251–60, 2011.
78. Itzkowitz, Steven H. and Xianyang Yio. "Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287.1: G7-G17, 2004.
79. Ferrandez, Angel, S. Prescott, and R. W. Burt. "COX-2 and colorectal cancer." *Current pharmaceutical design* 9.27: 2229-2251, 2003.
80. Tong, Xin, et al. "Cyclooxygenase-2 Regulation in Colon Cancer Cells Modulation of RNA polymerase II elongation by histone deacetylase inhibitors." *Journal of Biological Chemistry* 280.16: 15503-15509, 2005.
81. Jia, Qi. "Generating and screening a natural product library for cyclooxygenase and lipooxygenase dual inhibitors." *Studies in natural products chemistry* 29: 643-718, 2003
82. Funk, Colin D. "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *science* 294.5548: 1871-1875, 2001.
83. Huss, U., et al. "Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay." *Journal of natural products* 65.11: 1517-1521, 2002.
84. Kim, Sung Kyu, et al. "Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg." *Archives of pharmacal research* 31.4: 424-428, 2008.
85. Lee, Hyo-Jong, and Kyu-Won Kim. "Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells." *Inflammation Research* 61.8: 817-825, 2012

86. Zhou, Xiang, et al. "Antiinflammatory effects of orientin-2 "-O-galactopyranoside on lipopolysaccharide-stimulated microglia." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37.8: 1282-1294, 2014.
87. U. Schlemmer, W. Frølich, R. M. Prieto, and F. Grases, "Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis," *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 53, no. 2, pp. 330–375, 2009.
88. Shafie, Nurul Husna, et al. "Preventive inositol hexaphosphate extracted from rice bran inhibits colorectal cancer through involvement of Wnt/ β -catenin and COX-2 pathways." *BioMed research international*, 2013.
89. Murakami, Akira, et al. "FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid." *Cancer Letters* 180.2: 121-129, 2002.
90. Narayan CR, Joshi DD, Craig J, Mudjumdar AM, Dhekne VV. Pinitol, a new antidiabetic compound from the leaves of *Bougainvillea spectabilis*. *Curr Sci* 56: 139–141, 1987.
91. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *Br J Pharmacol* 130: 1944–1948, 2000.
92. Davis A, Christiansen M, Horowitz JF, Klein S, Hellerstein MK, Ostlund RE Jr. . Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. *Diabetes Care* 23: 1000–1005, 2000.
93. Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. Antiinflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia* 72: 168– 170, 2001.
94. Kim, Jong Choon, et al. "Synergistic antiinflammatory effects of pinitol and glucosamine in rats." *Phytotherapy Research* 19.12: 1048-1051, 2005.
95. Dolcet, Xavier, et al. "NF- κ B in development and progression of human cancer." *Virchows archiv* 446.5: 475-482, 2005.
96. Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. "Signaling to NF- κ B." *Genes & development* 18.18: 2195-2224, 2004.
97. Bonizzi, G. and Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25: 280–288, 2004.

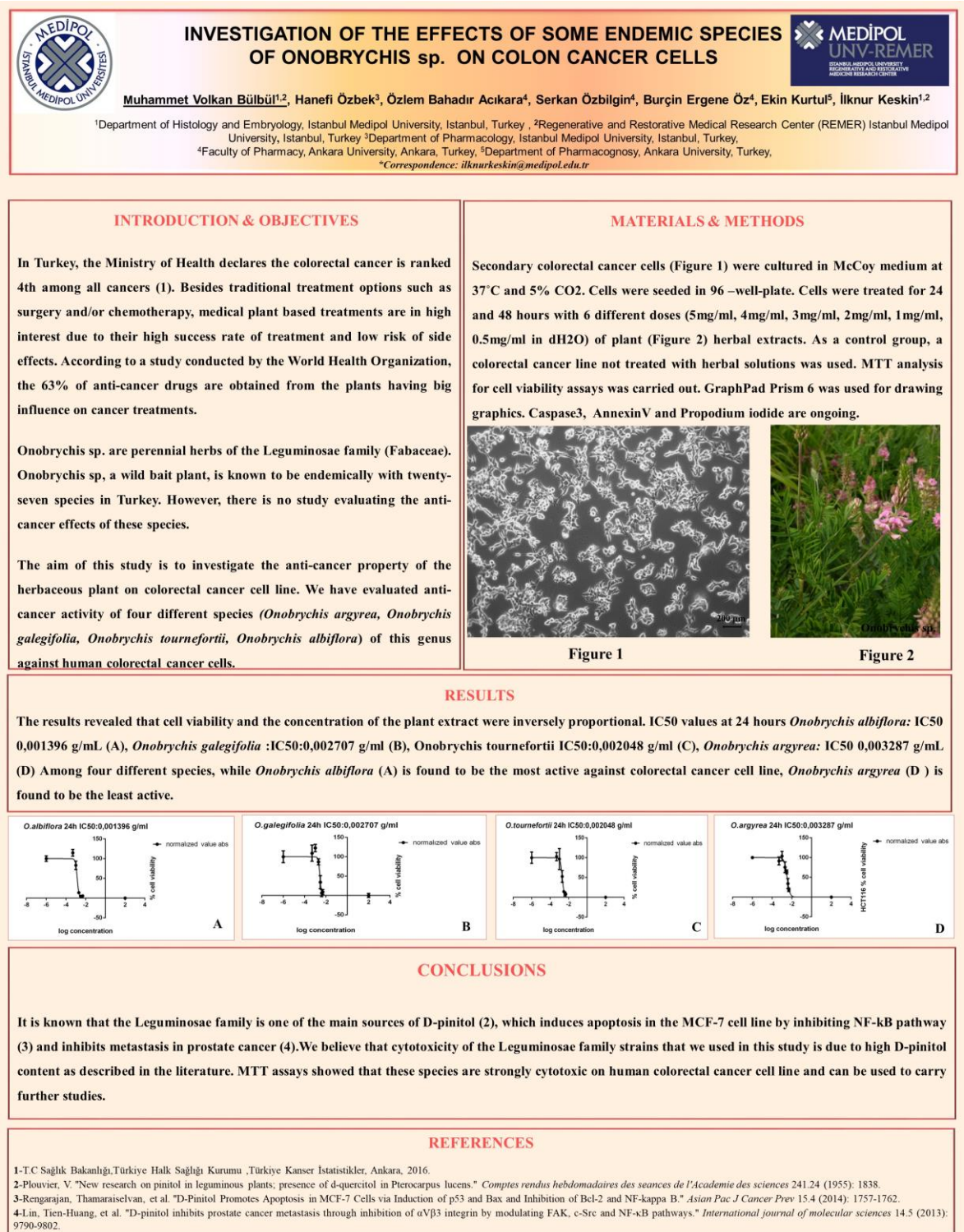
98. Chen F, Castranova V, Shi X New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation. *Am J Pathol* 59:387–397, 2001.
99. Das, Debasish, Nadir Arber, and Janusz A. Jankowski. "Chemoprevention of colorectal cancer." *Digestion* 76.1: 51, 2007.
100. Boyle T, Keegel T, Bull F, Heyworth J, Fritschi L. Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.*;104: 1548-1561, 2007.
101. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartaker A, Langseth H, Bray FI, Larsen IK. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev.*;22: 492-505, 2013.
102. Ma Y, Yang Y, Wang F, et al. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PLoS One*; 8: e53916, 2013.
103. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*; 148: 1244-1260 e1216, 2015.
104. Aune D, Lau R, Chan DS, et al. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol*; 23: 37-45, 2015.
105. Keum N, Lee DH, Greenwood DC, Zhang X, Giovannucci EL. Calcium intake and colorectal adenoma risk: dose-response metaanalysis of prospective observational studies. *Int J Cancer.*;136: 1680-1687, 2015.
106. Zhang X, Keum N, Wu K, et al. Calcium intake and colorectal cancer risk: Results from the nurses' health study and health professionals follow-up study. *Int J Cancer.*;139: 2232-2242, 2016.
107. Baron JA, Barry EL, Mott LA, et al. A Trial of Calcium and Vitamin D for the Prevention of Colorectal Adenomas. *N Engl J Med.* ;373: 1519-1530, 2015.
108. Kim E, Coelho D, Blachier F. Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutr Res.*;33: 983-994, 2013.
109. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.*;16: 1599-1600, 2015.
110. Secretan B, Straif K, Baan R, et al. A review of human carcinogens – Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*;10: 1033-1034, 2009.

111. Yang B, Jacobs EJ, Gapstur SM, Stevens V, Campbell PT. Active smoking and mortality among colorectal cancer survivors: the Cancer Prevention Study II nutrition cohort. *J Clin Oncol.* ;33: 885-893, 2015.
112. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response metaanalysis. *Br J Cancer.* 112: 580-593, 2015.
113. Ghobrial, Irene M. Thomas E. Witzig, and Alex A. Adjei. "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." *CA: a cancer journal for clinicians* 55.3: 178-194, 2005.
114. Gozuacik, Devrim, and Adi Kimchi. "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." *Oncogene* 23.16: 2891, 2004.
115. Ly, Jennifer D., D. R. Grubb, and A. Lawen. "The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update." *Apoptosis* 8.2: 115-128, 2003.
116. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 367: 1456-1462, 1995.
117. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem*; 276:24242–24252, 2001.
118. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*; 348:334 –336, 1990.
119. Korsmeyer, S. J., et al. "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell death and differentiation* 7.12: 1166, 2000.
120. Tsujimoto, Yoshihide. "Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria." *Journal of cellular physiology* 195.2: 158-167, 2003.
121. Myung J, Kim KB, Crews CM. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev*; 21:245–273, 2001.
122. Kaufmann, Scott H., and William C. Earnshaw. "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." *Experimental cell research* 256.1: 42-49, 2000.
123. Jia L, Patwari Y, Srinivasula SM, et al. Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene*; 0:4817–26, 2001.

124. <http://www.citruscollege.edu/lc/archive/biology/Pages/Chapter08-Rabito.aspx> Erişim Tarihi: 22.11.2017
125. Hong, Jongin, et al. "Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study." *Analyst* 136.2: 237-245, 2011.
126. Kang, Hakjung, et al. "Rare tumors of the colon and rectum: a national review." *International journal of colorectal disease* 22.2: 183-189, 2007.
127. Rodrigues, Nanda R., et al. "p53 mutations in colorectal cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.19: 7555-7559, 1990.
128. Nicodemus, Kristin K., David R. Jacobs, and Aaron R. Folsom. "Whole and refined grain intake and risk of incident postmenopausal breast cancer (United States)." *Cancer Causes & Control* 12.10: 917-925, 2001.
129. Açıkgöz, E. Yem Bitkileri (3. Baskı) Uludağ Üniv. Güçlendirme Vakfı Yayın No: 182, Bursa, 2001.
130. Korkmaz F, Isırgan Otu (*Urtica dioica*) Ekstresinin Kolon Kanseri Kolon Kanseri Hücre Serileri Üzerindeki Apoptotik, Antiproliferatif ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s.45-46, Ankara, 2010.
131. Bates, Sarah H., Robert B. Jones, and Clifford J. Bailey. "Insulin-like effect of pinitol." *British journal of pharmacology* 130.8: 1944-1948, 2000.

9. EKLER

Bu araştırmanın MTT analizleri 15. ULUSLARARASI HİSTOKİMYA VE SİTOKİMYA KONGRESİ'nde "Investigation of the effects of some endemic species of *Onobrychis* sp. on colon cancer cells" isimli poster sunumuyla sergilenmiştir.



10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Muhammet Volkan	Soyadı	BÜLBÜL
Doğum Yeri	ERZURUM	Doğum Tarihi	25.02.1993
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi/ Fen-Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	2015
Lise	Hilmi Fırat Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Biyolog	Medipol Üniversitesi- REMER	2017-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi
	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,8	71	74

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İyi

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi	2015
---------------------------------------	--	------





