

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PİCAN CEVİZİ (*Carya illinoensis*) YEŞİL  
KABUĞUNUN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeynep HAYIRLI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Feridun AKKAFI**

**ŞANLIURFA**

**2019**

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PİCAN CEVİZİ (*Carya illinoensis*) YEŞİL KABUĞUNUN  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeynep HAYIRLI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Feridun AKKAFA**

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Kurulu (HÜBAK) tarafından  
19113 proje numarası ile desteklenmiştir**

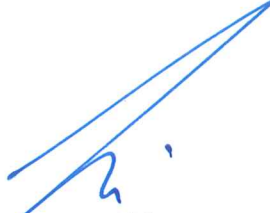
**ŞANLIURFA**

**2019**

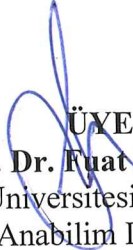
T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zeynep HAYIRLI'nın hazırladığı "Pican cevizi (*Carya illinoensis*) Yeşil Kabuğunun Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi" başlıklı çalışması 24/6/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak kabul edilmiştir.



**BAŞKAN**  
**Doç. Dr. Feridun AKKAFA**  
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



**ÜYE**  
**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**  
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



**ÜYE**  
**Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI**  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/06/2019 tarih ve 2019/11/08 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
**Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ**  
**Enstitü Müdürü**

## **TEŞEKKÜR**

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışmanım Doç. Dr. Feridun AKKAFa ve değerli hocalarım Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ ve Doç. Dr. Halit AKBAŞ'a, laboratuvar çalışmalarında desteklerini gördüğüm Dr. Öğr. Üye. İsmail KOYUNCU ve Öğr. Gör. Ebru TEMİZ'e, tez süresince ailem kadar yanımda olan Ferda ve Aslı ALTAN, Mehtap ve İsmail ÖZERHAN'a, hayatımın her evresinde bana destek olan canım aileme,

Tezimde hocalarım kadar her zaman yanımda olan ve yön veren arkadaşım Esmâ KAPLANER, Esmâ ALTUN, Derya AKÇİÇEK ve Hasine YEL'e,

Yüksek lisansa başladığımdan bu yana destek olan başta laboratuvar sorumlumuz olan Filiz Akın Aksoy, Ayşe ÖZALP, Mehmet Fatih ÖZDEMİR ve eski çalışma arkadaşlarıma,

Ayrıca maddi destek sağlayan HÜBAK'a sonsuz teşekkür ederim.

**ZEYNEP HAYIRLI**

**2019**

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>i</b>
<b>ŞEKİL DİZİNİ .....</b>	<b>ii</b>
<b>TABLO DİZİNİ.....</b>	<b>iii</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
2.1.Kanser .....	2
2.2.Kanser Epidemiyolojisi.....	2
2.3.Kanserin Oluşum Nedenleri .....	3
2.3.1. Mutasyonlar .....	4
2.3.2.Genetik Polimorfizmler.....	5
2.4.Kanserin Oluşum Süreci .....	5
2.4.1.Hücre Sinyal Yolaklarının Etkisi .....	6
2.4.2.Transkripsiyon Faktörlerinin Etkisi .....	7
2.4.3. Epigenetik Düzenlemenin Etkisi.....	7
2.4.4.DNA Metilasyonu .....	8
2.4.5. miRNA'ların Etkisi .....	9
2.4.6. Kromatin Modifikasyonları.....	9
2.5. Kansere İlgili Temel Hücresel Süreçler .....	9
2.5.1. DNA Hasarı ve Onarımı.....	9
2.5.2. Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler .....	10
2.6. Prostat Kanseri ve Anatomisi.....	11
2.6.1.Prostat Kanserinde Genetik ve Epigenetik Değişiklikler.....	12
2.6.2. Androjen Bağımsızlığı .....	13
2.7. Apoptozis .....	13
2.7.1. Apoptoziste Görevli Protein Ailesi .....	13
2.7.2. Apoptoziste Kimyasal Değişiklikler .....	14
2.8. Kanserin Tedavi Yöntemleri .....	15
2.8.1.Kemoterapi.....	15
2.8.2.Radyoterapi .....	17

2.8.3. İmmunoterapi .....	19
2.8.4. Fitoterapi .....	20
2.9. Pikan Cevizi ve Özellikleri (Caryaillinoisensis).....	21
2.10. Pikan Cevizi Kabuğunun İçeriği .....	23
2.11. Pikan Cevizi Kabuğuyla Daha Önce Yapılan Çalışmalar.....	25
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması:.....	27
3.2. Antikanser Özellikle İlgili Yöntemler .....	27
3.2.1. Sıvı Azot Tankından Alınan Hücrelerin Kültürünün Yapılması ve Tripsinizasyonu .....	27
3.2.2. Hücre sayımı .....	28
3.2.3. Hücre Ekimi .....	28
3.2.4. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması.....	28
3.3. MTT Hücre Proliferasyon Kiti İle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi .....	28
3.3.1. Hücre Kültürü Etken Dozunun Hesaplanması .....	29
3.3.2. Akım (flow) Sitometride Apoptozis Seviyelerine Bakılması .....	29
3.3.3. Akım (flow) Sitometride Hücre Döngüsü Analizi .....	30
3.4. İstatistiksel Analiz.....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>32</b>
4.1. MTT Hücre Proliferasyon Kiti İle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi .....	34
4.2. Flow sitometrik annexin-V- P1 Apoptoz/Nekrozanalizi .....	36
4.3. Flow sitometrik Hücre Döngüsü Analizi .....	38
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>41</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>45</b>
<b>7. EKLER .....</b>	<b>46</b>
7.1. Orjinallik Raporu.....	47
7.2. Turnitin .....	48
7.3. Tez Veri Giriş Formu.....	49

## ŞEKİL DİZİNİ

## Sayfa No

Şekil 4.1. PC-3 ve PNT1-A hücrelerinin IC <sub>50</sub> değerleri .....	34
Şekil 4.2. DU-145 ve PNT1-A hücrelerinin IC <sub>50</sub> değerleri. ....	35
Şekil 4.3. HT-29 ve HUVEC hücrelerinin IC <sub>50</sub> değerleri.....	35
Şekil 4.4. HCT-116 ve HUVEC hücrelerinin IC <sub>50</sub> değerleri .....	36
Şekil 4.5. PC-3 Sitometrik Annexin-V-PI boyaması sonucu IC <sub>50</sub> değerleri.....	37
Şekil 4.6. PNT1-A Sitometrik Annexin-V-PI boyaması sonucu IC <sub>50</sub> değerleri.....	38
Şekil 4.7. Bitki ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücre döngüsündeki yüzdeleri ..	39
Şekil 4.8. Bitki ekstraktı ile muamele edilen PNT1-A hücrelerinin hücre döngüsü aşamasındaki yüzdeleri .....	40



## TABLO DİZİNİ

Sayfa No

<b>Tablo 2.1.</b> Türkiye Nüfusunun 2009-2013 Yılları Arasındaki Kanser İnsidansı Cinsiyet Dağılımı.....	3
---	---



## **SİMGE ve KISALTMALAR**

**HUVEC:** İnsan Göbek Ven Endotel Hücresi

**HCT-16:** İnsan Kolon Kanseri Hücresi

**IC<sub>50</sub>:** Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyonu

**FBS:** Fetal Bovin Serum

**D-MEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**SNP:** Tek Nükleotit Polimorfizmi

**DPPH :**2,2-difenil-1- pikrilhidrazil

**ABTS :**2,2'-azino-bis-(3- ethylbenzotiazoline- 6-sulphonic acid)

**PC-3:** Prostat kanseri hücre hattı

**PNT1-A:**Normal prostat epitel hücreleri

**CKI:** cdk-siklin kinaz inhibitörleri

**DNA MTase:** DNA metil transferazlar

**BH:** Bcl-2 homologisi

**PKE :** Pikan Kabuğu Ekstraktesi

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**HAT:** Histon Asetil Transferaz

**HDAC:** Histon deasetilaz

## ÖZET

# PİCAN CEVİZİ (*Carya illinoensis*) YEŞİL KABUĞUNUN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zeynep HAYIRLI

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması sonucu ortaya çıkan ve her geçen yıl daha da yaygınlaşan hastalıkların başında gelir. Mevcut yöntemlerin, iyileştirme sürecinde vücudun immün sistemine verdiği hasarlar göz ardı edilememektedir. Yapılan çalışmada son yıllarda kanser tedavi yöntemlerinden biri olarak yaygınlaşan fitoterapi yönteminin avantajları göz önünde bulundurulmuştur. Bu yöntemden yola çıkılarak pican cevizinin (*Carya illinoensis*) yeşil kabuğunun antioksidan ve fenolik bileşen içeriğinin yüksekliği de göz önüne alınarak, kanserle mücadele de yeni bir tedavi yönteminin bulunması hedeflenmiştir. Pican cevizi yeşil kabuğunun çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesi hücre kültürü yöntemi kullanılarak gözlemlenmiştir. Hücre kültürü laboratuvarında, PC-3 ve PNT1-A, HUVEC, DU-145 ve HT-29 hücre hatları üzerinde, hekzan çözeltisiyle hazırlanan pican cevizi kabuğu ekstraktlarının, apoptotik etkisi, sitotoksosite ölçümü ve hücre döngüsü aşamalarında apoptotik etki Annexin-V Apoptosis tayini yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen deney sonuçlarına göre PC-3 prostat kanseri hücre hattı üzerine pican cevizi yeşil kabuğu ekstraktlarının uygulanması sonucunda  $IC_{50}$  : 40,32 olarak ölçülmüştür.

Bu çalışma sonucunda PC-3 hücrelerini apoptozis yolağına sürüklemesi nedeniyle farmakolojik alanda pican cevizi kabuğunun spesifik kanser türleri üzerinde faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Carya illinoensis*, antikanser, apoptozis

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTICANCER PROPERTIES OF PECAN NUT(*Carya illinoensis*) SHELL

**Zeynep HAYIRLI**

**Medical Biology Department, Master Thesis**

Cancer is one of the diseases that are caused by uncontrolled proliferation of cells and become more common with each passing year. In the process of healing of existing methods, damage to the body's immune system can not be ignored. In the study, the advantages of the phytotherapy method, which has become wide spread as one of the cancer treatment methods, have been taken into consideration. Based on this method, considering the high content of antioxidant and phenolic component content of green shell of pecan nut (*Carya illinoensis*), it is aimed to find a new treatment method in the fight against cancer. The anticancer activity of the pecan nut green shell on various cancer cell lines was observed using the cell culture method. Cell culture laboratory, PC-3 and PNT1-A, HUVEC, DU-145 and HT-29 cell lines, prepared with hexane solution of pecan nut shell extract, apoptotic effect, cytotoxicity measurement and cell cycle stages of the apoptotic effect was determined by the method of Annexin V Apoptosis determination. According to the results of the experiment, the results of pecan nut green shell extracts on PC-3 prostate cancer cell line were measured as IC<sub>50</sub>: 40,32.

As a result of this study, it has been concluded that pecan nut shell may be useful on specific types of cancer in the pharmacological field because of draining PC-3 cells to apoptosis pathway.

**Key words:** *Carya illinoensis*, anticancer, apoptosis

## 1. GİRİŞ

Kanser günümüzde en sık rastlanan hastalıklar arasındadır. Kanser bu ölçüde yaygınlaşması bu hastalığın teşhisi ve tedavisi için yapılan çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Ancak kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı olarak profilerasyon hızının yüksek olması, yoğunluğa-bağlı inhibisyon olmaması, telomerazaktivitesinin yüksek olması, invazyon ve metastaz özelliğinden ötürü vücudun diğer yerlerine yayılabilmesi gibi özelliklere sahip olmasından ötürü kanserli hücrelerle mücadele etmek oldukça güçtür. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemleri de hastalığa tam anlamıyla çözüm olamamasının yanı sıra normal vücut hücrelerine de zarar vermektedir. Bu yöntemlerdeki dezavantajları ortadan kaldırarak ve daha etkin tedavi yöntemleri keşfetmek için alternatifler aranmaya başlanmıştır. Normal hücrelere zarar vermezken kanserli hücreleri öldürmesi amacıyla doğada bulunan bitkisel ürünlere yönelim artmıştır. Bu yöntem de fitoterapi olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntemde bitkilerin özelliğine göre spesifik kanserler üzerinde etki gösterebilen özellikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmada da kansere alternatif bir çözüm olarak düşünülen fitoterapi yöntemi baz alınarak antioksidan özellik gösteren fenolik içeriği yüksek pıcan cevizi yeşil kabuğu kullanılarak, kanserli hücreleri apoptozise sürükleyip, normal hücrelerin süreçten etkilenmemesi hedeflenmiştir. Ayrıca pıcan cevizinin kabuğu geri dönüşümle kazandırılmış olacaktır. Pıcan cevizinin yeşil kabuğunun antikanser özelliğiyle ilgili çalışmaların sayısının sınırlı olması nedeniyle bu projeden elde edilen bulgular bu konuda uluslararası alanda bilgi birikiminin artırılmasına ve uluslararası dergilerde yayımlanan konuyla ilgili yeni araştırmalarda üniversitemizin ve ülkemizin ön sıralarda olmasına katkı sağlayacaktır. Proje sonunda ulaşılan sonuçlar, ileri düzey ön klinik çalışmalar için değerlendirilebilecek ve bu alanda daha geniş kapsamlı yeni çalışmalar için kılavuz görevi görecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanser**

Kanser; bir organizmadaki hücrelerin hayati fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmalarında meydana gelen mutasyonlar sonucu sınırsız bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve yayılmasıdır. Kanserin klinik olarak etkileri; yaş, büyüme oranı, yayılımı, evresi ve tedaviye karşı vermiş oldukları cevaba göre çeşitlilik göstermektedir (1). Kanserin oluşum süreci ve mekanizmasında etkili olan birçok genetik faktör vardır.

### **2.2. Kanser Epidemiyolojisi**

Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında en sık rastlanan hastalık kanserdir ve 2030 yılına kadar hızla artarak birinci sıraya yerleşeceği düşünülmektedir. Globocan 2018 verilerine göre 2018 yılında Dünya’da toplam 18.1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 9.6 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19.3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Gerek kanser vakalarının (%56.8) gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64.9) yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu gösterilmiştir (1).

Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerin çoğunda kanser insidansı ve mortalite oranları artmaktadır. Sosyoekonomik faktörlerin yanı sıra, gelişmekte olan ülkelerin en belirgin özelliklerinden biri yaşa bağlı demografik yapılarının farklılığıdır. Türkiye’de, kanserinsidans oranları bireysel ve çevresel risk faktörlerine bağlı olarak ve bunun yanında kayıt sistemindeki iyileşme ve sağlık hizmetlerine erişime bağlı olarak artmıştır. Sağlık Bakanlığı Kanseri Kontrol Dairesi Başkanlığından alınan verilere göre veri tabanı kanser insidansı oranları 2009 ve 2013 yılları arasında artmıştır (2).

**Tablo 2.1.** Türkiye Nüfusunun 2009-2013 Yılları Arasındaki Kansere İnsidansı Cinsiyet Dağılımı (2)

Yıl	Toplam	Erkek	Kadın
2009	72.561.3	36.462.4	36.098.8
2010	73.722.9	37.043.1	36.679.8
2011	74.724.2	37.532.9	37.191.3
2012	75.627.3	37.956.1	37.671.2
2013	76.667.8	38.473.3	38.194.5

### 2.3. Kanserin Oluşum Nedenleri

Kanser gelişimine yol açan temel anormallik, kanser hücrelerinin sürekli çoğalması ve kontrol edilememesidir. Normal hücre davranışını kontrol eden sinyallere uygun şekilde cevap vermek yerine, kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde büyür ve bölünür, normal doku ve organları istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılır. Kansere hücreleri tarafından sergilenen genelleşmiş büyüme kontrolü kaybı, çoklu hücre düzenleyici sistemlerde biriken anormalliklerin bir sonucudur (3).

Kansere oluşumu, çok sayıda moleküler değişimin birikimi ile bağlantılı çok aşamalı kompleks bir süreçtir. Bu moleküler değişiklikler, tümör içindeki ve mikro-ortamındaki hücreler işlevi etkiler ve kanserin belirleyici özellikleri ile sonuçlanır. Sürekli proliferatif sinyalleşme, apoptoz direnci, yaşlanma, anjiyogenez, istila ve metastaz direnci, hücreler enerjiyi serbest bırakma, immün tahribatını önleme, tümör teşvik eden enflamasyonu, genom kararsızlığı ve mutasyonu çok sayıda genetik değişiklik (mutasyonlar, heterozigotluk kaybı, anöploidi, vb.) kanserogenez (4) ile ilişkilendirilmiştir. Bazen bu durumlarda kansere sürekli mutasyonlar olarak kabul edilen bir onkogenik işlev gösterebilir(5). Tüm bu genetik değişiklikler anormal gen ekspresyonu ile sonuçlanır. Bununla birlikte, genetik değişikliklerin varlığı, yaygın gen ekspresyonu değişikliklerini ve kanserdeki hücreler fonksiyondaki değişiklikleri açıklamak için yetersizdir (6). Örneğin, Knudson “çift vuruş hipotezi, tümör baskılayıcı genlerin her iki alelinde delesyon olması, hücrede anormal hücreler büyüme önleyen mekanizmaları engeller” (7, 8) ifadesini kullanmıştır. Birçok kanserde, bu değişikliklerden biri, bir tümör baskılayıcı gende kalıtsal veya somatik bir mutasyondur ve ikinci "vuruş", diğer allelde edinilmiş bir mutasyondur. Bazen, ikinci genetik “vuruş”

gözenmez. Bunun yerine, epigenetik değişiklikler, genetik değişiklikler yerine tümör baskılayıcıların gen ekspresyonunda değişikliklere neden olur.

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinden bağımsız gen ekspresyonuna müdahale ederek fenotipi etkileyen kalıtsal özelliklerdir (9, 10). Bu epigenetik mekanizmalar; DNA metilasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi, kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), düzenleyici proteinlerin ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması şeklindedir (11,12).

Epigenetik olaylar ayrıca kalıcı gen ekspresyonu ve fonksiyonel değişikliklere sahip olması için normal durumlar veya hastalığıdaki diğer moleküler işlemlerle de birlikte hareket edebilir. Örneğin, transkripsiyon faktörü bağlanmasını etkileyen epigenetik değişiklikler, kanserdeki genetik varyasyondan bağımsız olarak genom çapında transkripsiyon bozukluğunu açıklayabilir (13). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, kanser mutasyonlarının, kromatin yapısı ile ilişkili olduğunu da göstermiştir. Bu mutasyonlar, replikasyon sırasında DNA tamir genlerine erişilemeyen kapalı kromatin bölgelerinde daha sık görülür. Bu nedenle, kromatin yapısındaki değişiklikler kanserin kritik nedenleri olabilir (14).

### **2.3.1. Mutasyonlar**

Bir hücrenin, hücre döngüsü sırasında DNA'sını doğru şekilde kopyalamaması veya DNA hasarını onarmaması, mutasyon adı verilen DNA dizisinde kalıcı bir değişime neden olabilir. Mutasyonların büyüklüğü, tek bir nükleotiddeki bir değişiklikten tüm kromozom bölümlerindeki değişikliklere kadar değişebilir. Bazı mutasyonların potansiyel olarak faydalı etkileri olabilir bu doğal seleksiyonla evrim olasılığını destekler ve diğerleri nötr veya zararlı olabilir (14).

Mutasyonlar, bir genin ekspresyonunu baskılayarak protein üretimini durdurabilir veya görevini yapamayan protein üretilmesine sebep olabilir. Canlı hücrelerde DNA değişikliklerinin birikmesi de genomik kararsızlığa neden olabilir. Bu hücreler bir kanser hücresi oluşturmak için gerekli genetik değişikliklerin biriktirilmesinde daha hassastır. Kansere neden olan birçok dış ajan mutasyonlara neden olarak etki gösterir (14).

### **2.3.2. Genetik Polimorfizmler**

DNA'nın nükleotit sekansındaki en yaygın kalıtsal varyasyonlara (her 100 kişiden birden birinde görülür) tek nükleotit polimorfizmi (SNP) denir. DNA dizisindeki bu değişimler, bireyler arasındaki genetik farklılıkların çoğundan sorumludur. SNP'ler gibi yaygın genetik varyantların kanserle ilişkisi, geçtiğimiz yıllarda yoğun bir araştırma alanı olmuştur (16).

Genom boyunca binlerce varyantı aynı anda değerlendiren genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), kansere bağlı yüzlerce varyantın keşfedilmesine neden olmuş ve kanser gelişimine yol açabilecek birçok farklı genetik anormalliklerin anlaşılmasına katkı sağlamıştır (16). Genetik polimorfizmlerin kanser sürecine etkisi ve bu tür genetik değişkenler ile çevresel riskler arasındaki ilişki keşfedilmeyi beklemektedir.

### **2.4. Kanser Oluşum Süreci**

Gen fonksiyonunu kontrol eden düzenleyici süreçler, döllenmiş yumurtanın bir embriyoya normal gelişiminde merkezi rol oynar (17). Genlerin işlevini organize bir şekilde açma veya kapama işleminin düzenlenmesi normal gelişim için ve hücrelerin normal işlevi için çok önemlidir. Dokular olgunlaştıkça hücreleri, atalarının hücrelerinin gelişim sırasında gösterdiği işlevlerden sorumlu genetik program bozulmadan kalmasına rağmen bu özellikleri göstermez. Örneğin, hücrelerin yeni kan damarlarının gelişimini (doku büyümesini desteklemek için) ve hücrelerin gelişmekte olan embriyo içinde göç edebilme kabiliyetleri, hücrelerin hızlı bir şekilde bölünmesi ve komşu dokuları kolonileştirmesi normal gelişimin bir parçasıdır ancak dokular olgunlaştıkça bu işlevleri göstermezler (17).

#### **2.4.1. Hücre Sinyal Yolaklarının Etkisi**

Hücreler dış uyaranlara, hücre sinyali olarak bilinen moleküler bir mekanizma yoluyla yanıt verir. Bir doku içindeki hücreler normal olarak sitokinleri, büyüme faktörlerini ve hormonları içerebilen vücut tarafından salınan kimyasallar ağı kullanarak birbirleriyle iletişim kurarlar (18).

Bu sinyaller proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlemek için kritiktir. Örneğin, hücre çoğalması, dengeli bir şekilde

büyüme faktörleri tarafından uyarılan, sıkı kontrol edilen ve koordine edilmiş bir işlemdir. Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki spesifik alıcılara bağlanır ve çekirdeğe iletilen hücreye bir sinyal iletir. Çekirdekte, hücre bölünmesi için gerekli proteinleri üretmek için genler uyarılır. Büyüme sinyalinin hücre dışından çekirdeğe iletilmesi gerekir. Büyüme faktörü bağlandığında, alıcının şekli değişir ve reseptörün bir kısmının, genellikle fosforilasyon adı verilen bir işlemle aktif hale gelmesine neden olur. Sinyallerin uygun şekilde başlatılması, iletilmesi ve bırakılması için düzenlenmiş bir fosforilasyon ve defosforilasyon işlemi gereklidir. Bu, hücrenin maruz kaldığı enerji ve beslenme ortamından etkilenebilir. Kanser hücrelerinde genetik değişiklikler tümörigenez ile ilişkili süreçleri kontrol eden sinyal yolları ile bağlanabilir. Her durumda, sonuç normal kontrol mekanizmalarına tabi olmayan düzensiz bir sinyallemedir (18).

Onkogenik mutasyonlar, etkilenen genlerin aşırı eksprese edilmesine (örn. Gen amplifikasyonu) neden olabilir veya aktivitesi düzensiz olan mutasyona uğramış proteinlerin (örn. nokta mutasyonları, kesikler ve füzyonlar) üretilmesine neden olabilir (18). Örnekler arasında, büyüme faktörü reseptör tirozinkinazlar (RTK'lar; örneğin, epidermal büyüme faktörü reseptörü, EGFR), küçük GTPazlar (örn. Ras), serin / treoninkinazlar (örneğin, Ras), serin / treoninkinazlar (RTK'lar; örneğin, Raf ve Akt), sitoplazmik tirozinkinazlar (örneğin, Src ve Abl), lipidkinazlar (örneğin, fosfoinositid 3-kinazlar, PI3K'ler) ve ayrıca nükleer reseptörler (örn; östrojen reseptörü, ER), transkripsiyon faktörleri (örneğin, Myc ), kromatin yeniden şekillendiricileri ve hücre döngüsü efektörleri (örneğin, siklinler) bulunur. Alternatif olarak, delesyon ve diğer mutasyonlar normalde tümör baskılayıcı olarak işlev gören negatif regülatörleri etkisiz hale getirebilir. Kanserde en yaygın mutasyona uğrayan genlerden biri, "genomun koruyucusu" olarak adlandırılan tümör baskılayıcı p53' tür (18). P53 hücre çoğalmasını, apoptoz ve DNA hasar tepkileri gibi stres sinyallerini kontrol eden kritik bir noktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarından sorumlu diğer proteinler pRB ve p16 gibi CKI'ler, bu proteinler mutasyonu, hücre döngüsünü düzenleyen diğer tümör baskılayıcılardır (18).

### **2.4.2. Transkripsiyon Faktörlerinin Etkisi**

Gen ekspresyonunu kontrol eden bir mekanizma, DNA'ya bağlanan ve dış hücre ortamından sitoplazma veya çekirdeğe bilgi aktarma sürecini içeren, transkripsiyon faktörleri adı verilen bir dizi proteini içerir. Transkripsiyon faktörleri, genlerin spesifik bölgelerine bağlanır ve gen ekspresyonunu destekleme veya bastırma etkisine sahiptir(18). Genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, transkripsiyon faktörlerinin bağlanamaması nedeniyle gen ekspresyonu gerçekleşemeyecektir. Bu bozuklukların birikmesi neticesinde hücre döngüsünün stabilitesi bozulacak ve bozukluğa yatkınlık artacaktır (18).

### **2.4.3. Epigenetik Düzenlemenin Etkisi**

Gen ekspresyonundaki değişiklikler, epigenetik değişiklikler olarak bilinen DNA ve kromatin yapısındaki modifikasyonların bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Epigenetik değişiklikler, geri dönüşümlüdür, genomun kalıtsal modifikasyonlarıdır. DNA'daki nükleotitlerin sırasındaki değişiklikleri içermeyen gen ifadesini değiştirir.

Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi birkaç farklı biyokimyasal tarafından yönetilmektedir. Örneğin, bir metil ( $CH_3$ ) grubunun, CpG adaları adı verilen DNA'nın belirli kısımlarına kovalent olarak bağlanması sonucu meydana gelen DNA metilasyonudur. Sağlıklı hücrelerde metilasyon için DNA promotör bölgelerinin kullanımı, gen ekspresyonunun uygun düzenlenmesine yardımcı olur. DNA metil transferazlar (DNA MTase) normal metilasyonun gerçekleşmesi ve korunmasından sorumlu enzimlerdir. Sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında, kötü huylu hücreler anormal DNA metilasyon modellerine sahiptir. Çok sayıda gen hipermetile olabilir (artmış DNA metilasyon seviyesine sahip). Öte yandan, hipometilasyon (genel olarak DNA metilasyonunun azalması) genomik instabiliteye neden olur ve bu da kanser gelişimini destekler. Bir başka epigenetik düzenleme şekli de histon yapısının değiştirilmesidir. Histonların yapısı, metilasyonla (DNA'nın yapısı gibi) veya daha yaygın olarak asetilasyonla (bir asetil grubu ilavesiyle) değiştirilebilir. Histonların asetilasyonu (veya metilasyonu), daha açık bir DNA yapısı oluşturma eğilimindedir ve

mRNA'ya gen transkripsiyonunu ve daha sonra mRNA'nın proteine (gen ifadesi) çevrilmesini kolaylaştırır. Asetilasyon ve deasetilasyon (asetil gruplarının çıkarılması), sırasıyla histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri aracılık eder (19).

#### **2.4.4. DNA Metilasyonu**

DNA metilasyonu, CpG dinükleotidlerin desitozin kalıntıları (5mC) üzerindeki 5-karbona bir metil radikalinin (CH<sub>3</sub>) eklenmesidir (20, 22). DNA metilasyonundaki modifikasyonlar, insan gelişiminin farklı aşamalarında kritik rolleri; genomda tekrarlayan elementlerin susturulması, viral sekansların entegrasyonuna karşı koruma, genomik baskılama, kadınlarda X kromozomu inaktivasyonu ve transkripsiyonel düzenleme gibi normal olaylardır (23). CpG metilasyonu tümör ve normal dokular arasında farklılık gösterir. Kanser hücrelerine özgü CpGmetilasyonunun giderilmesine, hipometilasyon ve kanser hücrelerine özgü CpGmetilasyonuna, anormal metilasyon veya hipermetilasyonu denir. Bu CpG adacıkları, genomun geri kalanı ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonda CpG (~10%) ve C + G içeriği (>% 55) olan uzun sekanslardır (24, 25). Kanserde DNA metilasyonundaki değişiklikler, CpG adacıklarının ötesine uzanır (26). Genom çapında hipometilasyon, kanserde ilk tanımlanan epigenetik bozukluktur (27). DNA metilasyonu Arginin, serin ve treonin gibi diğer amino asit kalıntılarına yayılan fosforilasyon, ubikitasyon ve glikosilasyon da dahil olmak üzere daha birçok modifikasyon mevcuttur (28, 31). Histon kuyruklarının kritik aminoasitleri epigenetik modifikasyonların sık hedefleridir. Bu kuyruklarda bu amino asitleri kodlayan genler de kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrar (32, 34).

#### **2.4.5. miRNA'ların Etkisi**

microRNA'lar gibi kodlayıcı olmayan RNA moleküllerinin aktivitesinden kaynaklanır. MikroRNA'lar, proteinleri kodlamayan ve gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicileri olarak ortaya çıkan küçük RNA molekülleridir. Protein kodlayan mRNA'ya bağlanarak çalışırlar, böylece mRNA stabilitesi ve translasyonu etkilenir. Memeli hücrelerinde ifade edilen tüm genlerin yarısından fazlasının düzenlenmesinde rol alabilirler (35).

## **2.4.6. Kromatin Modifikasyonları**

Histon modifikasyonları, kromatin yapısını etkileyen çekirdek histon proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonlarıdır (36). Bu modifikasyonlar, kromatinin açık veya kapalı konformasyonları ile ilişkilidir ve genlerin transkripsiyon faktörlerine ve düzenleyici proteinlere farklı erişimini sağlar. Bu nedenle hücreler, gen ekspresyonlarını dinamik olarak düzenlemek için histon değişikliklerini kolaylaştırabilirler. Kromatin yapısındaki değişiklikler, DNA metilasyonunun değişmesiyle birlikte ortaya çıkar. Histonmetilasyonu (20 varyant) ve asetilasyon (18 varyant), esas olarak histonkuyruklarının lizin kalıntılarına hedef alan en yaygın modifikasyonlardır (37).

## **2.5. Kansere İlgili Temel Hücresel Süreçler**

### **2.5.1. DNA Hasarı ve Onarımı**

Vücuttaki bir hücre iki yeni yavru hücreye bölündüğü zaman, DNA'nın replikasyonunda hata potansiyeli vardır. DNA dizisindeki mutasyonlar, işlev görmeyen genlere veya hücrelerin işleyişinde değişikliklere yol açabilecek, değiştirilmiş amino asit dizilerine sahip proteinlerin üretilmesine neden olabilir. Ayrıca, DNA reaktif oksijen türleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit dahil normal hücre içi metabolizma ürünlerine; herhangi bir zamanda yapısını ve bütünlüğünü etkileyen DNA'ya zarar verebilecek ultraviyole (UV) ışık ve sigara dumanı gibi dış çevresel faktörlere sürekli olarak maruz kalır. DNA hasarına verilen fizyolojik tepkiler, diyet faktörlerine, fiziksel aktiviteye ve aşırı vücut yorgunluğuna maruz kalmaya bağlı olabilen hormonların etkisiyle değişebilir (38)

Telomer kısmındaki ve hücre hasarındaki ilerlemeyi kontrol eden DNA hasar kontrol noktalarındaki kusurlar da dahil olmak üzere DNA onarımındaki kusurlar, genomik kararsızlığa yol açar. Zararlı DNA mutasyonlarının etkisi kansere ve ilerleyişine yatkınlığı artırır. Bu genomik instabilite, sağlıklı bir hücrenin, kötü huylu olmak için yeterli mutasyonları biriktirebilmesine yol açar. Bununla birlikte, hücrenin genomik kararsızlığa karşı koruma sağlayan birkaç sistemi vardır; hücre döngüsü kontrol noktaları, kalıcı DNA hasarı veya telomerdisfonksiyonu."Genomun koruyucusu" olarak görev yapan tümör baskılayıcı protein p53, hücrelerin kansere karşı korunmasında merkezi bir rol oynar. İnsan kanserinde TP53'ün (p53 proteinini kodlayan

gen) en yaygın mutasyona uğramış gen olduğu bulgusuna varılmıştır. Bir dizi strese cevap olarak DNA replikasyonundaki hatalar, diğer DNA hasarları, hipoksi veya proliferatif sinyaller dahil p53, hücrelerin hücre döngüsünün durması veya apoptoz geçirmesine neden olur. Hücre döngüsünü durdurma, hücre çoğalmasının normal şekilde ilerlediğini kontrol eden bir noktadır (38).

### **2.5.2. Tümör Baskılayıcı Genler ve Onkogenler**

Kanserojenez ile ilişkili mutant genler sıklıkla tümör baskılayıcı genler veya onkogenler olarak sınıflandırılır.

Tümör baskılayıcı genler, tipik olarak hücre proliferasyonunu yavaşlatan, farklılaşmayı koruyan ve DNA hasarını düzenleyen ve düzelten proteinleri kodlayan kritik öneme sahip genlerdir. Bu genler, hatalar tespit edildiğinde ve tamir edildiğinde hücre döngüsünün ilerlemesini durdurmanın anahtarlarıdır. Bu genler inaktive edilirse (mutasyon veya epigenetik yolla), DNA hasarı daha fazla olur bu durumda kanser gelişimi olasılığı artmış olur. Bu nedenle bu genler “tümör baskılayıcı genler” olarak adlandırılır (38).

Onkogenler, tipik olarak büyüme, replikasyon ve hayatta kalma sinyallerinin (hormonlar ve doku büyüme faktörleri veya bunların reseptörleri ve ayrıca bu ajanlara bağlı hücre içi sinyal yollarında yer alan proteinler gibi) aktivasyonuna katılan genlerin anormal şekilde işleyen versiyonlarıdır veya daha az yaygın olarak, genellikle genin promotör/ düzenleyici bölgesinde bir mutasyonun sonucu olan, uygun olmayan şekilde yüksek seviyelerde eksprese edilen normal bir genidir. Normal koşullar altında, hücre çoğalması, hücre çoğalmasını destekleyen çeşitli proteinlerin hareketi ile birlikte çoğalmayı azaltma eğiliminde olan diğer faktörlerin hareketi arasındaki denge ile düzenlenir. Bu proteinleri kodlayan genler veya apoptoz gibi diğer normal fonksiyonlardan sorumlu olanlar, anormal bir şekilde (tekrar mutasyon veya epigenetik değişim yoluyla) işlev görürlerse, o zaman kanserin karakteristik hücrelerinin anormal veya düzensiz çoğalması oluşabilir. Anormal işleyen genler bu nedenle onkogenler, normal hayat sürecinin devamlılığı için gerekli olanlar ise proto-onkogenler olarak adlandırılır (38).

## 2.6. Prostat Kanseri ve Anatomisi

Prostat, rektum ve mesaneye sıkıca sarılmış şekilde pelvisde bulunur. Normal işlevi tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, seminal sıvı üretimi ve sperm hareketliliğini kolaylaştırdığı bilinmektedir (39)

Prostat, salgı epitel hücreleri ve bazal hücreler ile kaplı kanallara sahip bir yapıdan oluşur (40). Nöroendokrin hücrelerinin de mevcut olduğu ve bezde parakrin işlevi sağladığı düşünülmektedir (41). Salgı epitel hücreleri, bezdeki ana hücre tipini temsil eder, büyüme için androjene bağımlıdır ve PSA ve prostatik asit fosfataz üretir (42-43). Prostat Kanseri, erkeklerin prostat dokusunda meydana gelen bir malignitedir. Çoğunlukla yaşlı erkeklerde sık görülür ve multi-fokal gelişim gösterir (44).

Çoklu faktörler prostat karsinomu gelişimine neden olan faktörler; çevresel faktörler / kanserojenler ve genetik yatkınlıktır. Dokunun karsinogenez için genetik yatkınlığı olduğunda, çevresel faktörler tümör öncüsü lezyonların oluşumunu indükler (45). Farklı oranlarda birçok bölgede lezyonların bağımsız genişlemesi multi-fokal tümör oluşumuna neden olur (45).

Prostat kanseri tedavisi, tanıda belirlenen klinik aşamaya bağlıdır. Hastalık lokalize kanser ise radikal prostat ektomiden daha olası bir tedavi yöntemidir. Ölüm oranı çoğunlukla tanıdaki klinik aşamaya ve genetik değişikliklere bağlıdır. Tümör metastatik evrede ise en sık beklenen sonuç ölümdür (46).

### 2.6.1. Prostat Kanserinde Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

Kanserlerin genetik yatkınlığı ile ilgili olarak başlıca iki terim vardır. Biri kalıtsal, diğeri ise ailesel prostat kanseridir. Kalıtsal prostat kanseri, tümörigeneze neden olan Mendel kalıtımsal mutant genler olan tümörler anlamına gelir. Bununla birlikte, ailesel prostat kanseri terimi, bir ailede prostat kanseri en az iki kişinin aynı patolojiye sahip hastalığı olması durumunda kullanılır (47)

Tümörlerin çoğu gibi, genetik mutasyonların birikmesi tümörigenezisin ortak nedenidir. Bir veya daha fazla tümör baskılayıcı gende eksilmeler ve bazı proto-onkogenlerin over ekspresyonu, prostat karsinogenezinde gözlenebilir (48). Araştırmacılar, hastalığın başlatılması ve ilerlemesinin tanımlanması için genetik,

epigenetik, ekspresyon ve düzenleyici aşamalarda görevli molekülerin seviyelerindeki farklılıkları araştırır (49).

Prostat tümörlerinde iyi bilinen en yaygın serbestleştirilmiş proteinler, prostat spesifik antijen (PSA), prostein (P501s), prostat spesifik membran antijeni (PSMA), NKX3.1 ve PSA'nın öncü formu (proPSA) ve bunlar tanısal tümör belirteçleri olarak da kullanılır (48).

Prostat kanserinde en yaygın düzensiz tümör baskılayıcı gen, diğer tümörlerde olduğu gibi p53'tür (49). P53, hücre döngüsünde G1 / S ve G0 / G / S geçişi ve apoptoz sırasında düzenleyici rolü olan bir transkripsiyon faktörüdür.

P53'ün bir diğer rolü, DNA hasarı ve hücrenin apoptose gitmesi durumunda inhibisyon proliferasyonudur (49). P53 ayrıca, seçici olarak bazı mikroRNA'ların olgunlaşmasında rol oynar (50). P53, p73 ve p63, miR-143, miR-145, let-7, miR200c ve diğerleri gibi bazı miRNA'lar için miRNA işleme elemanlarını kontrol eder (50, 51). P53 geni prostat kanseri hücre hattında ya işlevsiz ya da mutasyona uğramış durumdadır.

### **2.6.2. Androjen Bağımsızlığı**

Prostat dokusunda androjen reseptörü (AR), erkek cinsiyet steroid hormonlarının uyarılması ile işleyen transkripsiyon faktörüdür. AR proliferasyon, hücre siklusu, farklılaşma ve lipid metabolizmasında işlev gören yüzlerce genin transkripsiyonunu başlatır (52).

Androjen eksikliği tedavisi, prostat tümör hücrelerinin çoğunun inhibisyonunu sağlar, ancak az miktarda androjenden bağımsız tümör hücreleri varsa, o zaman prostat kanseri, androjenden bağımsız veya androjenin tükenmesinden bağımsız hale gelir (53).

### **2.7. Apoptozis**

Apoptoz bir DNA hasarı gibi hücresel bozukluklar normal fonksiyonun tehlikeye gireceği, potansiyel onkojenik mutasyonların devam etmesini önlemek için geçici veya kalıcı olarak hücre döngüsünde gerçekleşen "hücre intiharı" sürecidir. Bu stresleri yaşayan ve aynı zamanda düzgün işleyemeyen hücreler, p53'ün çoğalmasına engel olarak veya uygun şekilde hayatta kalmamasına neden olarak kanser gelişimini

teşvik eder. Çoğu kanser türü, DNA ve kromozomları ilave mutasyonlara duyarlı hale getiren ve ayrıca kromozomal kararsızlığı içeren genomik kararsızlık gösterir. Kanseri hücreleri, harici sinyallerin yokluğunda bile kontrolsüz çoğalmayı teşvik eden mutasyonlar ve anti-proliferatif sinyallere hatalı tepkiler biriktirir (54).

Birlikte ele alındığında, düzensiz proliferasyon ve mutasyon biriktirme duyarlılığının artması, tümör progresyonuna katkıda bulunur, tümör fenotipleri daha agresif ve kemoterapötik ajanlara dirençli hale gelir (54).

### 2.7.1. Apoptozisde Görevli Protein Ailesi

Bcl-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesinde, özellikle geri dönüşü olmayan hücre hasarında ve esas olarak mitokondri seviyesinde hareketin içsel yolağında önemli bir rol oynayan pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur (55). Bcl-2, 20 yıldan daha uzun bir süre önce tanımlanmış olan bu ailenin ilk proteinidir ve insan B hücreli lenfomalarında t(14;18) kromozomal translokasyonu bulunan bir dizi proteinin ikinci üyesi olan B hücreli lenfoma 2'den köken alan Bcl-2 geni tarafından kodlanır (55).

Tüm Bcl-2 üyeleri dış mitokondriyal zar üzerinde bulunur. Bunlar bir iyon kanalı formunda veya gözeneklerin oluşturulmasıyla membran geçirgenliğinden sorumlu olan dimerlerdir (56). İşlevleri ve Bcl-2 homolojisi (BH) etkilerine dayanarak Bcl-2 ailesi üyeleri ayrıca üç gruba ayrılır (57):

**Birinci grup**, dört BH alanının tamamını içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarıcılardan korurlar. Bazı örnekler Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w, A1 / Bfl-1 ve Bcl-B / Bcl2L10'dur (58)

**İkinci grup**, sadece BH-3 proteinlerinden oluşur, bu nedenle diğer üyelere kıyasla BH-3 alanı ile sınırlıdır. Bu gruptaki örnekler arasında Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve Bik bulunur (58).

**Üçüncü grubun** üyeleri ise dört BH alanının tümünü içerir ve ayrıca pro-apoptotiktir. Bazı örnekler Bax, Bak ve Bok / Mtd'dir (58).

Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerin dengesinde bir bozulma olması sonucunda, hücreler düzensiz apoptosise uğrayabilir. Bu, bir veya daha fazla

anti-apoptotik proteinin aşırı ekspresyonu veya bir veya daha fazla pro-apoptotik proteinin aşırı baskılanması veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanabilir (59). Örneğin, Raffo ve ark. “Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerini apoptozdan koruduğunu göstermiştir ”(59). Fulda ve ark. “Bcl-2 aşırı ekspresyonunun TRAIL kaynaklı apoptozun nöroblastom, glioblastoma ve meme karsinom hücrelerinde inhibe edilmesine yol açtığını bildirmiştir” (60). Bcl-xL'nin aşırı ekspresyonunun, tümör hücrelerinde ilaca çok dirençli bir fenotip sağladığı ve bunların apoptoz geçirmelerini önlediği bildirilmiştir (61). Mikrosatellit kararsızlığı olan kolorektal kanserlerde ise bax genindeki mutasyonlar çok yaygındır. Miquel ve ark. Bax geninde çerçeve kayması mutasyonlarından kaynaklanan bozulmuş apoptozun, kolorektal kanser hücrelerinin antikanser tedavilerine direncine katkıda bulunabileceğini göstermiştir (62). Kronik lenfositik lösemi (CLL) durumunda, kötü huylu hücreler, yüksek seviyede anti-apoptotik Bcl-2 seviyeleri ve düşük miktarda pro-apoptotik protein içeren in vivo Baç gibi anti-apoptotik bir fenotipesahiptir (63). CLL'deki lösemogenezisin, in vivo olarak artmış proliferasyondan ziyade azalmış apoptozisten kaynaklandığı bildirilmiştir (63).

### **2.7.2. Apoptoziste Kimyasal Değişiklikler**

Genel olarak, apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik görülmektedir:

- 1) Kaspazların aktivasyonu,
- 2) DNA ve protein yıkımı,
- 3) Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınması biyokimyasal değişikliklerin üçüncü tipidir. Apoptozun başlarında, hücre zarının dış katmanlarında, iç katmanlardan "ters" çevrilen fosfatidilserin (PS) ifadesi vardır (64). Bu, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasını sağlar ve pro-inflamatuar hücrel bileşenlerin salınması olmadan fagositoz ile sonuçlanır (65). Bunu, DNA'nın karakteristik olarak 50 ila 300 kilobaz büyüklüğünde parçalara ayrılması izler (66). Daha sonra, endonükleazlar tarafından 180 ila 200 baz çiftinin katlarında, DNA'nın Oligo nükleozomlara inter nükleozomal bölünmesi vardır (67). Apoptozun bir başka spesifik özelliği, kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur. Kaspaz'ın "c" si sistein proteazı belirtirken "aspaz", enzimin, aspartik asit kalıntılarından sonra yarıma için benzersiz özelliğini ifade eder (64). Aktif kaspazlar, birçok hayati hücrel proteini

ayırır ve nükleer iskeleyi ve hücre iskeletini parçalar. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da bozan DNAaz'ı aktive ederler (68).

## **2.8. Kanserin Tedavi Yöntemleri**

Geçtiğimiz yüzyıl, kanserin cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile etkili bir şekilde tedavi edilebileceğini göstermiştir (69). Bu tedavi stratejileri, tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanıldığında, tümör büyümesini önemli ölçüde etkileyebilir ve hatta tedaviler üretebilir. Birçok katı tümörde, kolon kanserinde olduğu gibi, erken tanı ve kombinasyon terapileri için geliştirilmiş yöntemler sağkalım üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, tümör metastaz yaptığında, tedavi daha karmaşık hale gelir. Bu gibi durumlarda bile, mevcut tedavi stratejileri kanseri kronik bir hastalığa daha fazla götürebilir. Yine de, erken teşhis, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin bir kombinasyonunun hayatta kalma süresini 1-2 yıldan fazla uzatmadığı glioblastom gibi spesifik kanser türleri için önemli zorlukların devam ettiği belirtilmiştir (54). Bu yöntemlerle birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılmaktadır (69).

### **2.8.1. Kemoterapi**

Ameliyat ve radyasyonun yanı sıra, kemoterapiler genellikle kanseri tedavi etmek için kullanılır. Kanser tedavisi için kemoterapide, kanser hücrelerinin kontrol edilemeyen bölünmeye devam etmesini önlemeyi amaçlayan sitostatik denilen ilaçlar kullanılır (70).

#### **Kemoterapinin Hedefleri;**

Kanser tedavisinde kemoterapinin farklı hedefleri olabilir. Kullanılan kemoterapi türleri ve hedefleri şunlardır:

- **Tedavi amaçlı kemoterapi:** Bu kemoterapi, tüm kanser hücrelerini vücuttan atmayı ve kalıcı bir iyileşme sağlamayı amaçlar.
- **Adjuvan kemoterapi:** Adjuvan kemoterapi, ameliyattan sonra vücutta kalabilecek, ancak tespit edilemeyen kanser hücrelerini hedefler. Bu tür destekleyici terapi nüksleri önlemeyi amaçlar.

- Neoadjuvan kemoterapi: Neoadjuvan kemoterapi ameliyattan önce yapılır. Bazı tümörler direkt olarak ameliyat edilemeyecek kadar büyüktür. Kemoterapi sıklıkla tümörü küçülterek cerrahi olarak çıkarılmasını mümkün kılar. Aynı zamanda daha az invaziv cerrahiye izin vermeyi de hedefleyebilir.
- Palyatif kemoterapi: Tüm tümör hücrelerini çıkarmak artık mümkün olmadığına kemoterapiye palyatif denir. Kemoterapi daha sonra belli semptomları hafifletmeye, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya veya geçici olarak durdurmaya ve komplikasyonları önlemeye yardımcı olabilir.

Kemoterapide vücuda ilaçlar verilir. Bu genellikle damar içine bir infüzyonla yapılır, ancak bazı ilaçlar tablet olarak da alınabilir. Genellikle birbirleriyle kombinasyon halinde verilen birçok farklı sitostatik vardır. Bu şekilde verilen ilaçlar kan dolaşımında hareket ettiğinden, genellikle vücudun her yerine etki ederler. Böylece muayenelerde tespit edilmeyen ve bu nedenle ameliyat veya radyasyonla hedeflenemeyen kanser hücrelerine de ulaşabilirler.

Nadir durumlarda, lokal kemoterapi kullanmak da mümkündür. Daha sonra ilaçlar kan dolaşımına verilmemektedir, ancak doğrudan etkilenen vücut bölgesine, örneğin spinal kanallara enjekte edilmektedir.

Kemoterapi genellikle radyoterapiyle birleştirilir, buna “radyokemoterapi” denir. Radyoterapi aynı anda veya kemoterapiden sonra yapılabilir. Bazı kemoterapötik ilaçlar sadece radyoterapiye maruz kaldıklarında etki ederler. Bu durumda, kemoterapi sadece radyasyonun uygulandığı yerlerde lokal olarak hareket eder. Uzun süre sitostatik alan kişiler bu ilaçları bazen kateter veya port adı verilen bir cihazdan alabilirler. Bir port küçük bir operasyonda cilt altına yerleştirilen ve ince bir tüp ile büyük bir vene bağlanan küçük bir kaptan oluşur. Tedavi sürdüğü sürece vücutta kalabilir. Bu, infüzyonların damara bağlanma avantajı vardır ve her bir tedavi için bir damar aramak ve onu delmek gerekli değildir.

Kemoterapide, kanser belirli aralıklarla sitostatik ile tedavi edilir. Bu aynı zamanda tedavi döngüleri veya tedavi programları olarak da adlandırılır. Çeşitli faktörler döngü sayısını ve bireysel tedaviler arasındaki süreleri etkiler:

- Uygulanan ilacın etkisinin ne kadar sürdüğü,

- Vücudun iyileşmesi için gerekli zaman,
- Genel tedavi süresi.

Günümüzde birçok kanser türü kemoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Bununla birlikte, tedavinin olumsuz etkilerinden büyük korku duyulmaktadır. Sitostatikler genellikle sadece kanser hücrelerine değil, aynı zamanda hızla bölünen sağlıklı hücrelere de saldırır. Bunlar kan üretici hücreleri, saç hücrelerini ve ağız ve boğaz bölgesindeki ve sindirim sisteminin mukoza hücrelerini içerir. Bunun saç dökülmesi, anemi, bulantı, kusma, ishal ve ağızda enfeksiyonlar gibi kısa vadeli etkileri olabilir (69, 70).

### **2.8.2. Radyoterapi**

Radyasyon tedavisi, radyasyonun yüksek dozları kanserli hücreleri öldürmek veya tümörü küçültmek için kullanılan bir tedavi yöntemidir. Yüksek dozlarda radyasyon terapisi kanser hücrelerini öldürür veya DNA'larına zarar vererek büyümelerini yavaşlatır. DNA'sı onarılamayacak kadar hasar görmüş kanser hücreleri, bölünmeyi veya ölmeyi durdurur. Hasarlı hücreler öldüğünde, vücut tarafından parçalanır ve çıkarılır. Ancak bunun yanısıra sağlıklı hücreleri öldürüp vücudun iç dengesini bozmaktadır (71).

Radyasyon tedavisi direkt olarak tedaviye başlanıldığı gibi kanser hücrelerini öldürmez. DNA, kanser hücrelerinin ölmesi için yeterince zarar görmeden günler veya haftalar sürer. Ardından, kanser hücreleri radyasyon tedavisi sona erdikten sonra haftalar veya aylarca ölmeye devam eder (72).

Uygulanacak olan radyasyon terapisi tipi, aşağıdakiler dahil çeşitli etkenlere bağlıdır:

- Kanser türü
- Tümörün boyutu
- Tümörün konumlandığı yer
- Tümör radyasyona duyarlı normal dokulara ne kadar yakın
- Genel sağlık ve tıp geçmişiniz
- Diğer kanser tedavisi türlerinin olup olmayacağı
- Yaş ve diğer tıbbi durumlar gibi diğer faktör.

### Harici Radyasyon Tedavisi;

Dış ışın radyasyon tedavisi, kanserli hücreleri hedefleyen bir makineden radyasyonun gelmesidir. Vücudun bir bölümüne hastaya temas etmeden birçok yönden radyasyon gönderen bir tedavi yöntemidir. Dış ışın radyasyon tedavisi, yerel bir tedavidir, yani vücudunuzun belirli bir bölümünü tedavi eder. Örneğin, sadece akciğerde kanser varsa, tüm vücuda değil, yalnızca hastanın tümör hücrelerinin olduğu bölgeye radyasyon verilir (72).

### Dahili Radyasyon Tedavisi;

Dahili radyasyon terapisi, hastanın vücuduna radyasyon kaynağı yerleştirilen bir tedavidir. Radyasyon kaynağı katı veya sıvı olabilir. Sağlam bir kaynağa sahip iç radyasyon terapisine brakiterapi denir. Brakiterapi yönteminde, radyasyon kaynağı içeren şeritler veya kapsüller, kanser hücrelerinin içine veya yakınlara yerleştirilir. Dış ışın radyasyon terapisi gibi, brakiterapi de yerel bir tedavidir ve vücudunuzun sadece belirli bir kısmını tedavi eder (72). Sıvı kaynaklı iç radyasyon terapisine sistemik tedavi denir. Sistemik, tedavinin kanda vücudunuzdaki dokulara geçtiği, tümörlü hücreleri aradığı ve öldürdüğü anlamına gelir. Vücudunuzun bir alanının yaşamınız boyunca güvenle alabileceği radyasyon miktarında bir sınır vardır. Bir alanın ne kadar radyasyonla tedavi edildiğine bağlı olarak, ikinci kez o bölgeye radyasyon tedavisi uygulanamayabilir (72).

Radyasyon kanser hücrelerini öldürürken veya proliferasyonunu yavaşlatırken, diğer yandan tümör hücrelerinin çevresindeki sağlıklı hücreleri de olumsuz etkiler. Hastanın sadece genotipinde değil aynı zamanda fenotipine de olumsuz yönde sebep olabilmektedir. Bu hasarın boyutları tedavi sürecine ve verilen radyasyonun miktarına göre değişmektedir (72).

### 2.8.3. İmmünoterapi

İmmünoterapi, bir kişinin bağışıklık sisteminin kanser gibi hastalıklarla savaşmak için belirli kısımlarını kullanan bir tedavi yöntemidir. Bazı immünoterapi türlerine bazen biyolojik terapi veya biyoterapi de denir. Bu birkaç şekilde yapılabilir;

- Kanser hücrelerine saldırmak ve daha fazla çalışmak için kendi bağışıklık sisteminizi uyarmak,

- İnsan yapımı bağışıklık sistemi proteinleri gibi bazı bağışıklık sistemi bileşenlerini vermek.

Son yıllarda, immünoterapi bazı kanser türlerinin tedavisinin önemli bir tedavi yöntemi olmaya başlamıştır. İmmünoterapi, farklı şekillerde çalışan tedavileri içerir. Bazı tedavi şekilleri vücudun immün sistemine destek olurken, diğer tedavi şekli bağışıklık sisteminin özellikle tümör hücrelerine saldırmasına yardımcı olur. İmmünoterapi bazı kanser türleri için diğerlerine göre daha iyidir. Bu kanserlerin bazıları için kendi başına kullanılır, ancak diğerleri için diğer tedavi türleriyle kullanıldığında daha etkili olduğu görülmektedir (73).

Bağışıklık sistemi vücudun enfeksiyonlardan ve diğer hastalıklardan korunmasına yardımcı olan organlar, özel hücreler ve maddeler topluluğudur. Bağışıklık hücreleri ve salgıladıkları maddeler vücudu dolaşarak enfeksiyonlara neden olan mikroplardan korurlar. Bağışıklık sistemi normalde vücutta bulunan tüm maddeleri kontrol eder. Bağışıklık sisteminin tanımadığı herhangi bir yeni madde, bağışıklık sisteminin ona saldırmasına neden olarak bir alarm verir. Örneğin, mikroplar normalde insan vücudunda bulunmayan belirli maddeler içerirler. Bağışıklık sistemi bunları “yabancı” olarak görür ve onlara saldırır. Bağışıklık tepkisi, mikroplar veya kanser hücreleri gibi yabancı maddeleri içeren her şeyi tahrip edebilir. Bağışıklık sistemi, kanser hücrelerini hedef alan daha zor bir süreci de yönetir. Bunun nedeni kanser hücrelerin değişmesi ve immün sistemin hücrelerin kontrol dışına çıkmaya başladığında devreye girmesidir. Bağışıklık sistemi kanser hücrelerini her zaman yabancı olarak tanımaz, çünkü hücreler normal hücrelerden yeterince farklı değildir. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin kanserle kendi başına savaşabilme yeteneğinin sınırları vardır. Bazen bağışıklık sistemi kanser hücrelerini tanır, ancak cevap kanseri yok edebilecek kadar güçlü olmayabilir. Kanser hücrelerinin kendileri de bağışıklık sistemini kontrol altında tutan maddeleri salgılayabilirler. Bunun üstesinden gelmek için, araştırmacılar bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasına ve tepkisini güçlendirmelerine yardımcı olacak, böylece onları yok edecek yollar bulmaya çalışmışlardır (74).

Kanseri tedavi etmek için şu anda kullanılan başlıca immünoterapi türleri şunlardır:

- Monoklonal antikorlar: Bunlar, immün sistem proteinlerinin insan yapımı versiyonlarıdır. Antikorlar kanser tedavisinde çok faydalı olabilir çünkü kanser hücrelerinin çok özel bir kısmına saldırarak şekilde tasarlanabilirler.
- İmmün kontrol noktası inhibitörleri: Bu ilaçlar temel olarak bağışıklık sistemindeki 'kontrol noktalarını' alır ve bu da kanser hücrelerini tanımasına ve saldırmasına yardımcı olur.
- Kanser aşılıları: Aşılar, bazı hastalıklara karşı bağışıklık tepkisi başlatmak için vücuda enjekte edilen maddelerdir. Bazı aşılar kanseri önlemeye veya tedavi etmeye yardımcı olabilir. Diğer spesifik olmayan immünoterapiler, bağışıklık sistemini genel bir şekilde artırır, ancak bu hala bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine saldırmasına yardımcı olabilir. İmmünoterapi ilaçları şimdi birçok farklı kanser türünü tedavi etmek için kullanılmaktadır (75).

#### **2.8.4. Fitoterapi**

Fitoterapi; hastalıkları tedavi etmek için veya sağlığı teşvik edici ajanlar olarak bitkilerin kullanıldığı farmakolojik bir alandır. Bitkilerin çeşitli kısımlarından faydalanılması sonucu ortaya çıkmış bir tedavi yöntemidir (76).

Fitoterapilerin geleneksel kullanımı, genel olarak kaynak bitkinin orijinal bileşimini ve bütünlüğünü korur, böylece ya bütün bitkinin ya da asgari olarak ayarlanmış bileşenlerinin istenen bir yüzdesi, tıbbi amaçlar için kullanılır. Bazı tıbbi gelenekler, antropoetik tıp, natropatik tıp, geleneksel Çin tıbbı (TCM), ayurveda tıbbı ve allopatik tıbbı dahil olmak üzere bitki bazlı terapiler kullanır. Doktorlar, ya tek bitki tedavisi, ya tamamlayıcı özelliklere sahip olduğu düşünülen birden fazla ot, ya da mineraller ve vitaminler gibi bitkisel olmayan maddelerle karışımları kullanabilir. Fitoterapinin daha geleneksel kullanımı genellikle papatya otu infüzyonu (çay) gibi bitkinin tamamını içerir; ancak batı bitkisel tıbbı daha çok ekstraktın bir bileşenine standartlaştırılmış tek şifalı otlar kullanır. Buna karşılık, bitkilerden elde edilen tedavi amaçlı ilaçlar tipik olarak, endüstriyel ayrılma ve terapötik özelliklere sahip olarak tanımlanan bileşenlerin çıkarılması yoluyla izole edilen tek bileşiklerdir (76).

Fitoterapi üretimi, kullanılacak olan bitki örneklerinin düzgün bir şekilde işlenmesini içerir böylece son ürün, doğrulanmış bir konsantrasyonda bir referans işaretleyici içerir. Bitkiler birden fazla kimyasal bileşen içerdiğinden, son ürün marker

bileşenine standartlaştırılmış olarak etiketlenmiştir (77). Bir marker bileşenini tanımlamanın amacı, aktif bileşenin en verimli konsantrasyonunu içeren bir ürün üretmektir. Fototerapi yönteminin en önemli noktası etken bileşenin terapötik olarak uygun dozda iletilmesidir (78).

Çaylardan tozlara kadar çeşitli şekillerde popüler olan ginseng'in bilinç, hafıza, yaşam kalitesi ve davranış üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (79). Bitkinin iştah ve uyku üzerindeki olumlu etkileri, özellikle kanser, multipleskleroz ve diğer kronik hastalıkları olan hastalarda yaşam kalitesini ele almak için umut verici bir hedef haline getirmiştir. Ginseng, kimyasal ginsenosidleri ile iltihap önleyici etkiler göstermektedir (80).

Sarımsak (*Alliumsativum*), soğuk algınlığı tedavisinde kullanılmasına ek olarak, sarımsağın hipertansiyon ve periferik arter hastalığı üzerindeki etkisine ilişkin incelemeler kan basıncını düşürmede olumlu etkiler yaratırken, kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkisini gözlemlemek için bir dizi çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (81). Sarımsağın, allisin kökenli olduğu düşünülen antibiyotik ve antiviral özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, hücre çoğalması ve ölümü üzerindeki bir etki, onu kanser ve iyi huylu prostat hiperplazisi araştırmalarında umut verici bir hedef haline getirmiştir (82).

## **2.9. Pikan Cevizi ve Özellikleri (*Carya illinoensis*)**

Pikan cevizi anavatanı Kuzey Amerika kıtası olan Brezilya'da 'Nogueira-pec' olarak bilinen *Carya* cinsi, güney ve güney doğu bölgelerinde (Joly,1993) yetiştirilen Juglandales takımının Juglandaceae familyasından *Carya* cinsine bağlı illinoensis türü olan, sert kabuklu bir meyvedir (83).

Dünyada daha çok Pikan olarak isimlendirilmesine rağmen ülkemizde meyvesi ve tohumu cevize benzediğinden dolayı Pikan cevizi olarak adlandırılmıştır. Cevize (*Juglansregia*) göre iç randımanının yüksekliği, ılıman iklim bölgelerde daha az masrafla yetiştirilebilmesi Pikan cevizini üstün kılan özelliklerdendir (83). Dünyada kültür tarihi Güney Amerika yerlilerinin tarihi ile yakın ilişki içindedir. 19. yüzyılın 2. yarısından itibaren ABD' nin değişik eyaletlerinde pikan cevizi yetiştiriciliği yayılmaya başlamış bu tarihlerden sonra dünyanın değişik yerlerinde (Meksika, Arjantin,

Avustralya, İsrail, Güney Afrika, Türkiye, vs.) yetiştirilmeye başlanmış olsa da Dünya’da ve Türkiye’de yetiştirilme alanının genişletilmeye ihtiyacı vardır. Pikan cevzine yönelik çalışmalara literatürde sıkça rastlanılmasına karşılık yeşil kabuğuna yönelik çalışmaların daha az olduğu görülmektedir. Pikan cevizi kabuğuna ilişkin mevcut bazı çalışmalar dikkate alındığında yüksek lif içeriği ve antioksidan aktivitesi göze çarpmaktadır (83). Antioksidan maddeler; vücuttaki tüm hücreleri etkileyerek, pulmoner sistem ve kardiyovasküler hastalıkları, kanser, yaşlanma, katarakt (83) gibi süreç ve hastalıklarda etkisi olduğu bilinen serbest radikallerin, sağlıklı hücrelerin üzerindeki zararlı etkilerini azaltmada rol oynamaktadır. Bu etkilerini; serbest radikallerin reaksiyonlarını durdurmak, oksijeni ve metalleri bağlayarak oksidasyonun sebep olduğu zararları engellemek (84), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleme yoluyla (85) göstermektedirler. Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yüksek oranda reaktif moleküllerdir (86). İçerdiği Omega 3 yağ asitleri (linolenik asit) açısından zengin olması nedeniyle kalp, damar ve beyin sağlığı ile kanser oluşumunun engellenmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca yüksek antioksidan miktarı ile de diğer kabuklu meyvelerden üstündür.

Fenolik bileşikler ve bazı türleri oto-oksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Yapılan araştırmalar fenolik bileşiklerin; antialerjik, antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik özelliklerini ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmektedir (87,88). Son zamanlarda, polifenoller ve onların antioksidan özellikleri üzerinde yapılan araştırmalarla beraber, özellikle doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır (89,90). Pikan cevzinin kabukları, fındıklardan daha fazla miktarda polifenol ile karakterize edilir ve kabuklardan elde edilen özütler, antioksidan kapasitesini yoğunlaştırır (91).

Yüksek lif içerikleri nedeniyle sağlık yararları, koroner kalp hastalığı, inme, hipertansiyon, diyabet, obezite ve bazı gastrointestinal hastalıkların gelişimi için daha düşük risk içerir (92,94). Diyetin lif içeriğini artırma girişimi için, gıda bileşenleri geliştiricileri, bazıları genetiği değiştirilmiş organizmalar tarafından üretilen yeni lif bileşenleri oluşturdu. Bununla birlikte, tüketicilerin “doğal” içerikler içeren gıdalara

olan talebin artması nedeniyle, “doğal” kaynaklardan yeni lif içeriklerine olan ihtiyaç artmaktadır.

*Carya illinoensis* çeşidinin de dahil olduğu cevizler, Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm kuruyemişler içinden en çok tercih edilenleri ve ekonomik açıdan önemli bir mahsuldür. 2014 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 264 milyon pound ceviz fındık (kabuklu) üretildi(95). Cevizler genellikle kabukları olmadan satılır, bunlar işlem sırasında çıkarılır ve sıklıkla atılır. % 50 kabuk oranına (çekirdek ağırlığının kabuk içi ağırlığına oranı) (96) dayanarak, ABD ceviz endüstrisi tarafından yılda yaklaşık 132 milyon ton ceviz kabuğu üretilmektedir. Ceviz kabuğu lifi (ayrıca ceviz kabuğu unu veya öğütülmüş ceviz kabukları olarak da bilinir), kabukları ve ceviz taneleri hariç, cevizlerin dış kabuğundan üretilen bir besin maddesidir. Ceviz kabuğu lifleri çoğunlukla çözünmeyen liflerden (selüloz, lignin ve hemiselüloz) oluşur ve az miktarda yağ (<% 4) ve protein (<% 3) içerir. Aynı zamanda antioksidan aktivite için tanınan moleküller olarak yaklaşık% 4.5 polifenoller ve % 10 proantosiyanidinler içerir (97). Bu nedenle, ceviz kabuk lifi, gıda formülasyonlarında hem bir lif bileşeni hem de antioksidan olarak kullanma potansiyeline sahiptir.

Pikan cevizinin belirlenen antioksidan özelliğinin ve fenolik içerik oranının yüksekliğinden faydalanılarak antikanser özelliği araştırılarak kanseri önlemek için yeni bir yöntem bulunması amaçlanmaktadır.

## **2.10. Pikan Cevizi Kabuğunun İçeriği**

Pikan cevizi kabuğunun besinsel bileşimi Resmi Analitik Kimyacılar Derneği (AOAC,2005) resmi sonuçlarına göre; nem (925,09); protein (920,87); toplam lipitler (920,85); toplam, çözünür ve çözünmeyen diyet lifi (991,43) ve mineraller, karbonhidratlar; (923,03) olarak belirlenmiştir(97).

Pikan cevizi düşük doymuş yağ asit içeriği ve yüksek miktarda tekli doymamış ve çoklu doymamış yağ asitleri içerir. Ayrıca bu gibi biyoaktifmoleküllerinsteroller ve tokoferoller ve olası fenolik olan toplam fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite varlığını gösterir. Sebzelerde bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir grubu tanenler, ikincil bitki metabolitleri yoğunlaşmış veya hidrolize edilmiş formda bulunabilir. Bu

moleküller, güçlü antioksidan kapasiteleri nedeniyle, büyük bir beslenme ve tıbbi ilgi alanına sahiptir (97).

### **2.11. Pıkan Cevizi Kabuğuyla Daha Önce Yapılan alışmalar**

Pıkan cevizi, Amerika'da ve Brezilya'da yoğun olarak yetiştirilmektedir. Türkiye'de ise yetiştiriciliği Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bünyesinde faaliyet gösteren Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) tarafından yapılmaktadır. Bununla birlikte Antalya bölgesinde pıkan cevizi yetiştiren özel işletmeler de bulunmaktadır. Prado ve ark. tarafından " Brezilya'nın güney bölgesinde pıkan cevizi üretiminde %40-50 civarında kabuğun açığa çıktığı ve parçalanmış olarak satışa sunulan bu materyalin su içerisinde demlenmesi ile ayının tüketildiği bildirilmiştir".Ratlarda yapılan in vivo çalışmalarda, pıkan cevizi kabuğundan hazırlanan çayın kronik etanol alımını takiben oluşan oksidatif stresin yol açtığı karaciğer hasarını minimize edebileceği belirtilmiştir (98,99).

Pıkan cevizi kabuğunun antioksidan özellikleri bilinen fenolik bileşikler (fenolik asit, flavonoid asit ve proantosiyanidin) bakımından zengin olduğu ve çeşitli gıda patojenlerine karşı doğal bir antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte; Van Loo ve ark. "Pıkan kabuğu ile ilgili yaptıkları çalışmalarda antimikrobisyonların inhibisyon gücünün, antimikrobiyal bileşiklerin kaynağından ziyade ekstraksiyonu metoduna bağlı olduğunu vurgulamışlardır" (83). Bu nedenle Pıkan kabuğuna yönelik olarak yapılmış çalışmalarda özellikle ekstraksiyonu yöntemleri ele alınmıştır. Pıkan cevizi kabuğu medikal alanda çalışan araştırıcıların da ilgisini çekmektedir. Özellikle ağrı kesici ve ödem azaltıcı etkileri fareler üzerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alındığı ifade edilmiştir.Diyetlerine pıkan cevizi kabuğu ilave edilen (50 000, 100 000 ve 150 000 ppm) ratlarda özellikle 100 000 ve 150 000 ppm grubundaki erkek hayvanların besin tüketiminde istatistik olarak artış belirlendiği bildirilmiş; klinik kimya, hematoloji ve idrar parametrelerinde toksikolojik bir bulguya rastlanmadığı ifade edilerek, ürünün non-mutajenik ve non-klastojenik özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Bu araştırmanın sonuç kısmında, pıkan cevizi kabuğu liflerinin insanlar tarafından güvenli bir şekilde tüketilebileceği ve diyetlerde önemli bir lif kaynağı olarak değerlendirilebileceği önerilmiştir (83).

Pikan cevizi kabuğuna yönelik bazı araştırmalarda kullanılan ekstraksiyon teknikleri ve belirlenen antioksidan kapasitesi bitki aylarının hazırlanmasında kurutulmuş toprak üstü kısımları (yaprak, iek, kabuk, meyve, tohum) ya da toprak altı kısımlarının (kök, rizom, yumru) sıcak su içerisinde demlenmesi işlemine infüzyon, kaynatılması işlemine de dekoksasyon adı verilmektedir. Pikan kabuğundan ekstrakt eldesi için birçok araştırmada infüzyon tekniği kullanıldığı bildirilmektedir. 2006 yılında hasat edilen bazı pikan cevizi türlerine (Bardon, Shoshone, Shawnee, Choctaw ve Cape Fear) ait kabukları harmanlanarak oluşturulan karışımlar incelenmiş ve infüzyon tekniği kullanılarak antioksidan seviyeleri ölçülmüş. Araştırmacılar yaptıkları deney sonucunda elde ettikleri değerler bakımından; kuru ekstrakt miktarını  $23\pm 5$  g/100 g, toplam fenolik düzeyini  $138\pm 26$  mg GAE(Gallik asit cinsinden eşdeğer)/g, kondanse tanen miktarını  $43\pm 7$  mg CE (Kateşin eşdeğer)/g ve antioksidan kapasitesini (ABTS = radikal katyon)  $1404\pm 330$   $\mu$ mol TEAK (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite)/g olarak değerlendirilmiş (102) Aynı zamanda bu çalışmada; tokoferollerin, pikan kabuğu ekstraktlarının ve ekstrakt+tokoferol karışımının oksidasyon inhibisyonu üzerindeki etkileri de kıyaslanmıştır. Araştırmacılar, maksimum oksidasyon inhibisyonunun infüzyona tabi tutulan ekstraktlarda karışılaşıldığını bildirmişler ve ekstrakt + tokoferol karışımındaki bileşenlerin aralarında herhangi bir etkileşim oluşturmadıkları noktasına vurgu yapmışlardır (100).

Pikan cevizi kabuğunun antimikrobiyel özelliği; fenolik bileşikler mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ajan olarak da görev yapmaktadırlar. Kafeik, gallik, p-kumarik, protokateşik ve ferulik asit gibi fenolik asitlerin çeşitli bakterilerin (*Escherichiacolispp.*, *Salmonellaspp.*,*Bacilluscereus*,) gelişmesini inhibe edici aktiviteye sahip olduğu; kateşin ve kuersetin gibi flavonoid bileşiklerin *E.coli*, *Shigellaspp.*, *Staphylococcusaureus*,*Salmonellaspp.*, *Bacillus spp.* ve *Vibriospp.* türlerine karşı bakteriyostatik veya bakterisid etki gösterdiği bildirilmiştir (101).

Babu ve ark.yeni bir ekstraksiyon yöntemi (zcsz) kullanarak organik pikan cevizi kabuğundan ekstrakte ettikleri doğal antimikrobiyellerin 7 farklı *Listeria* türünün baskılanmasındaki etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, söz konusu antimikrobiyellerin bakterileri inhibe edici minimum konsantrasyonları (MIK) ile ilgilenilmiştir. Çalışmada bildirilen yönteme göre; ceviz kabuklarını kırarak parçalanmış, bunların bir kısmını

direk olarak ekstraksiyona tabi tutulurken (Pikan Kabuğu Ekstraktesi=PKE) diğer kısmı kurutularak toz haline getirdikten sonra ekstrakte edilmiştir (Pikan Kabuğu Tozu=PKT). Araştırmacılar; taze tavuk bağetlerinden peeling yöntemi ile elde ettikleri deri örneklerinin bir kısmını bakteri kültürleri (*Listeria* spp.) ile inoküle ettiklerini ve daha sonra da antimikrobiyellerle muamele ettiklerini belirtmişler, bir kısım deri örneğini ise inoküle etmeden kendi üzerinde mevcut olan bakterilerle değerlendirdiklerini ifade etmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre kullanılan *Listeria* türleri içerisinde ikisi hariç diğerlerinin her iki ekstrakta karşı önemli düzeyde duyarlı oldukları bildirilmiştir (101).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması:**

Çalışmada kullanılacak olan pecan cevizi bitkisinin yeşil dış kabuk örtüsü kısımları 40 °C etüvde kurutuldu. Kuruyan bitki örnekleri toz haline getirildikten sonra, 500 gr alınarak (1:1) oranda hazırlanan metanol: su: hekzan, içerisinde 40 °C'de bir gece boyunca inkübe edildikten sonra, küçük porsiyonlar haline getirilip 15 dk ultrasonikatör ile iyice homojenize edildikten sonra, whatman filtre ile süzülüp, 40 °C sıcaklığı geçmeyecek şekilde rotaryevaporator yardımıyla alkol solventleri uçurulup, liyofilizatörde toz haline getirilip ham MESH ekstreleri elde edildi. Kuru ham MESH ekstresi küçük porsiyonlar halinde hekzan ile yıkanarak lipofilik kısımlar, uçucu yağlar ve klorofilli kısımlar ekstreden uzaklaştırıldı. Birleştirilen hekzan porsiyonları da aynı şekilde rotary evaporatör ve liyofilizatör yardımıyla kurutulup hekzan ekstresi elde edildi.

#### **3.2. Antikanser Özellik İle İlgili Yöntemler**

##### **3.2.1. Sıvı Azot Tankından Alınan Hücrelerin Kültürünün Yapılması ve Tripsinizasyonu**

Sıvı azot tankından çıkarılan donmuş haldeki hücreler 37 °C'de çözülerek steril ortamda Laminar kabin içerisinde 15 ml' lik falkon tüpe 5 ml% 10 FBS içeren DMEM-F12/RPMI medyumunu konup ve tanktan çıkarılarak çözülen hücreler falkona aktarıldı. Falkon 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek, süpernatant atılarak, pellet el yardımı ile hafifçe vurularak süspanse edildi. Süspansiyondan alınan hücreler thoma lamında sayılarak 25 cm<sup>2</sup> lif faska 5 ml % 10 FBS içeren DMEM-F12 medyum koyduktan sonra üzerine 1x10<sup>5</sup> hücre eklenerek flask 37 °C' de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kapağı hafif açık olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alınıp steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum dökülerek flaskın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücreler 1 ml PBS ile yıkandı. PBS döküldükten sonra 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 5-10 dakika inkübatörde bekletilip mikroskopik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden kaldırıldıkları mikroskopik olarak gözlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler Falkon tüpe aktarılarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı ve alt kısımda kalan hücre pelleti süspanse edildi.

### 3.2.2. Hücre sayımı

Hücreler sitotoksisite, çalışmalarında kullanılmadan önce hücre sayımı thoma lamı adı verilen özel sayım lamalarında yapıldı. Steril santrifüj tüpüne alınan hücre çözeltisi santrifüj işleminden sonra süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti besiyeri ile seyreltildi. Vortekslenen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ve 90 µl Tripan mavisi ile karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnek, hemositometre lamına aktarıldı ve ışık mikroskobu ile 10X büyütmede incelendi. Lamdaki boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre süspansiyonunun ml'sindeki canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı} = A \times B \times C \times 10^4$$

A = Hücre solüsyonunun hacmi (ml)

B = Dilüsyon faktörü (Tripan mavisi ile)

C = Boyanmamış hücrelerin ortalama sayısı formülü ile hesaplandı.

### 3.2.3. Hücre Ekimi

Hücreler stoktan açılarak 75 cm<sup>3</sup>flasklara ekilip ve hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyuluklu steril plaklara ekildi.

### 3.2.4. Bitki Ekstrelerinin Uygulanması

Hücreler stoktan açılarak 75 cm<sup>3</sup>flasklara ekilip ve hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 96kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik İnkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırıldı, yerine 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200µg/ml konsantrasyonlarında ekstre içeren 200 µl besileri hücrelere eklenerek 24, 48, 72 saat inkübe edildi.

### 3.3. MTT hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak bitki ekstrelerinin sitotoksik etkileri incelendi. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturmasını prensibine dayanarak yapıldı. Hücreler stoktan açılarak 25 cm<sup>3</sup> flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk

olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve her bir ekstre için 0,2,5,5,10,25,50,100 ve 200µg/ml olacak şekilde uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. Bitki ekstraları her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süresince %5 CO<sub>2</sub> 'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 20 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plaklardaki besileri uzaklaştırıldı ve formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

### **3.3.1. Hücre Kültürü Etken Dozunun Hesaplanması**

Mikroplağın her bir kuyucuğunda bulunan ekstrakt ile muamele edilmiş hücrelerin morfolojileri mikroskopik olarak değerlendirildi ve her bir kuyucuktaki hücreler üzerine MTT ilave edildi ve formazan kristallerinin oluşumu gözlemlendi. Oluşan kristaller DMSO ile çözdürülerek mikropalak spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlara göre, hücreli ve hücreli her bir konsantrasyon için kuyucuklardan okunan değerlerin ortalaması alındı ve hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hücreli kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alınıp ve formüle uygulanarak % canlılık hesaplandı. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden kültürün % 50'sini enfekte eden doz hesaplandı.

### **3.3.2. Akım (flow) Sitometride Apoptozis Seviyelerine Bakılması**

Hücre apoptozu Annexin V ve 7AAD içeren kit kullanılarak üretici firmanın (Becton Dickinson, Pharmingen, UK) tavsiyeleri doğrultusunda çalışıldı. Apoptotik hücrelerle nekrotik hücreleri ayırmak için, hücreler Annexin V (yeşil floresan) ve 7AAD (kırmızı floresan) ile aynı anda boyandı.

1. Well platalere total hücre 1.000.000 olacak şekilde ekildi.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ml tripsin ve 1ml fcs ile kaldırıldı.
3. Kaldırılan hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, pellete dokunulmadan süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml PBS eklenip, 5 saniye vorteksle pellet çözüldü, 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, üst faz döküldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan sonra, hücre süspansiyonlarının üzerine binding buffer eklendi. ( 1mlbindingbuffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
5. Hücre süspansiyonların üzerine 500µlbindingbuffer eklendi. Kısaca vortekslendi ve yeni tüplere 100µlolacak şekilde transfer edildi.
6. 100µl hücre süspansiyonun üzerine 5µl Annexin, 5µl 7AAD eklenip, hafif karıştırılarak 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Hücre süspansiyonlarının üzerine 500µlbindingbuffer (1ml binding buffer + 9 ml distile su ile seyreltildi) eklendi.
9. Hücre süspansiyonları daha sonra Bectoncoulter NAVIOUS tipi akım (flow)sitometre ile değerlendirildi. Kaluzaanalysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

### **3.3.3. Akım (flow) Sitometride Hücre Döngüsü Analizi**

Hücre döngüsü için BD Cycletest™ Plus DNA Reagent kiti ( biosciences, Almanya) kullanıldı.

Kitin çalışma prosedürü:

1. Hücreler 1.000.000 olacak şekilde sayıldı.
2. 12'lik well plate ekilmiş olan hücreler 300 ul tripsin, 1ml fcs'li dmem ile kaldırıldı.
3. Kaldırılacak hücreler 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek, pellete dokunmadan süpernatant uzaklaştırıldı.
4. Hücre süspansiyonlarının üzerine buffer solution eklendi. ( 1mlbuffersolution + 9 ml destile su ile seyreltildi) 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant uzaklaştırılacak, bu işlem iki defa tekrarlandı.
5. Hücre süspansiyonunun üzerine 250µlsolution A eklendi. Tüplerin dibine hafifçe vurularak karışması sağlandı (vorteks kullanılmadı).10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.

6. Hücre süspansiyonun üzerine 200µl solution B eklendi. Yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
7. Hücre süspansiyonunun üzerine 200µl solution C eklenip ve yine tüplerin dibine hafifçe vurularak karıştırılması sağlandı. 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Hücre süspansiyonları daha sonra Becton Coulter NAVIOUS tipi akım (flow) sitometre ile değerlendirilip, kaluza analysis programı kullanılarak her numune için hücreler sayılıp analiz edildi.

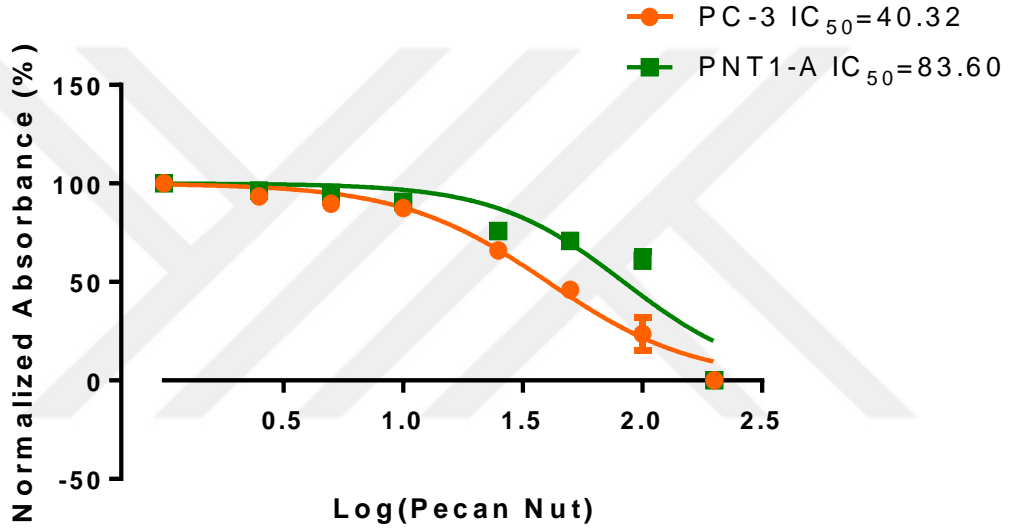
### **3.4. İstatistiksel Analiz**

Çalışmalar tamamlandıktan sonra; öncelikle veriler değerlendirildi. Daha sonra verilerin normal dağılımlı olup olmadıklarına bakılıp, duruma göre tek yönlü varyans analizi yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında; verilerin normal dağılıma sahip olup olmadığını tespit etmek için Shapiro-Wilk tanıtıcı testi kullanıldı. Shapiro-Wilk testi sonucunda gruplarda normal dağılım çıktığında anlamlı fark testi için Student t- test, normal dağılım çıkmadığında ise anlamlı fark testi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel analizler için SPSS 25 (SPSS, Inc, Chicago, IL) ve Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, USA) kullanıldı.

## 4. BULGULAR

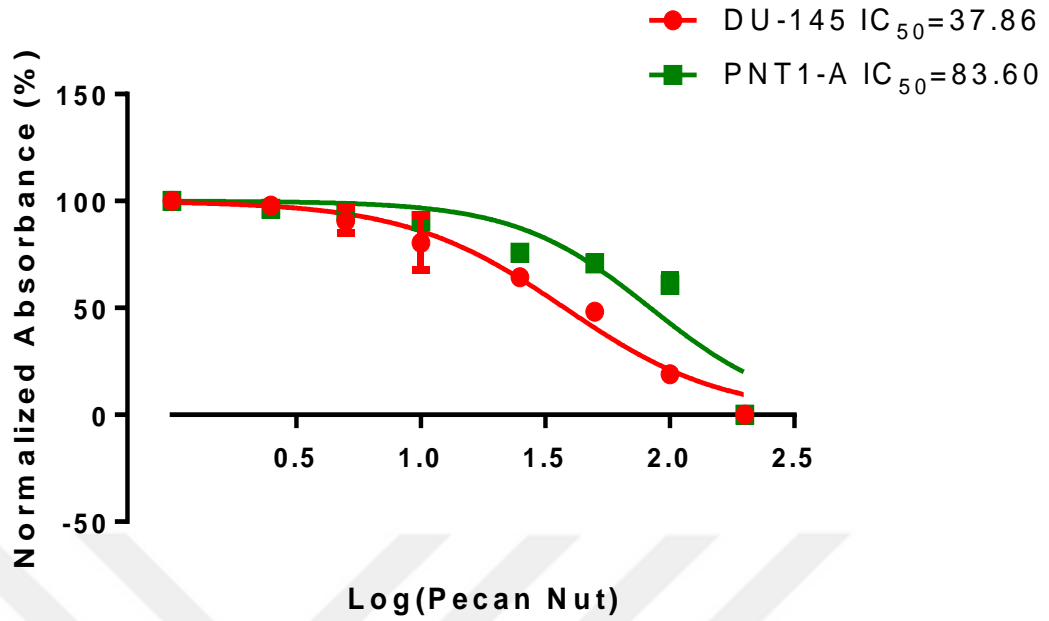
### 4.1. MTT Hücre Proliferasyon Kiti ile Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Çeşitli hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksik inceleme sonucunda en anlamlı sonuçlar PC-3 ve PNT1-A hücre hatlarından elde edilmiştir. *Caryaillinoensis* bitkisinin hekzan ile hazırlanan fraksiyonunun prostat kanser (PC-3) ve normal prostat epitel hücreleri (PNT1-A) üzerine etkisi MTT Assak (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, sigma) yöntemi kullanılarak tespit edildi.



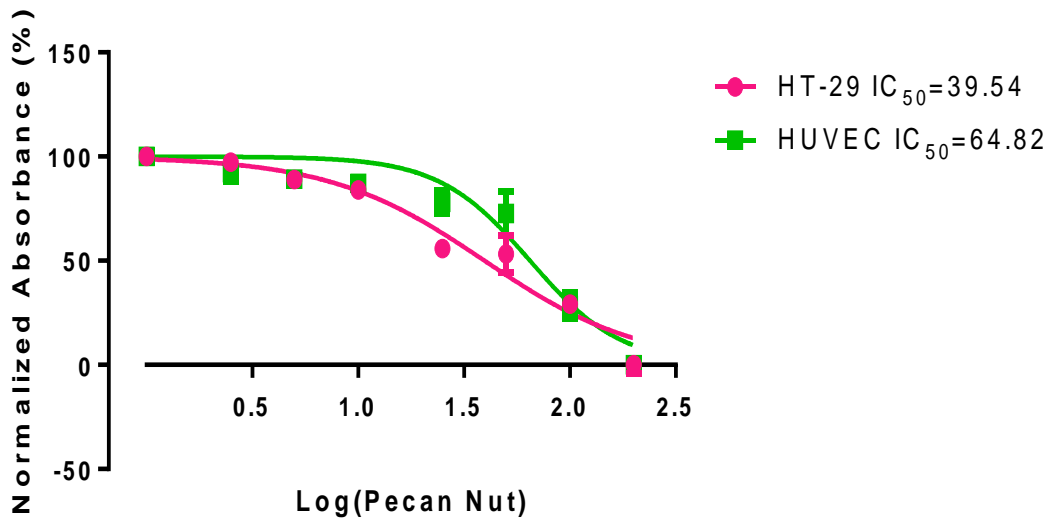
Şekil 4.1. PC-3 ve PNT1-A hücrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri

24 saat sonunda prostat kanseri üzerinde sitotoksik etkisi (IC<sub>50</sub>) 40.32 µg/mL olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisinin ise yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.1). Ayrıca hekzan fraksiyonunun neredeyse kemoterapik ilaca eşdeğer bir etki gösterdiği ve normal hücreyi kemoterapik ilaçtan daha az öldürdüğü gözlemlendi.



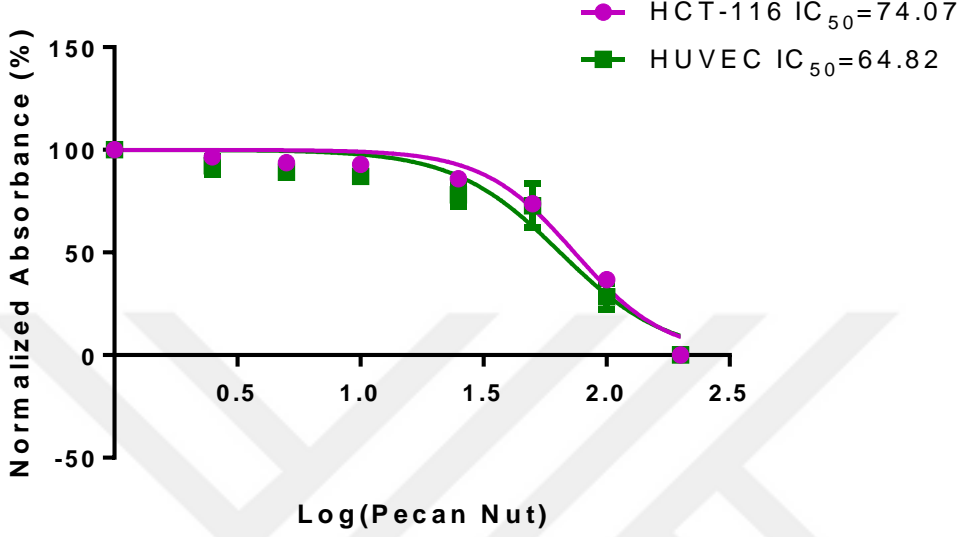
Şekil 4.2. DU-145 ve PNT1-A hücrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri

Prostat kanser (DU-145) ve normal hücreleri (PNT1-A) üzerine etkisi 24 saat sonunda sitotoksik etkisi (IC<sub>50</sub>) 37.86 µg/mL olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisi ise (IC<sub>50</sub>) 83.60 olarak kanser hücreleri üzerindeki etkinin iki katından bile daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.3. HT-29 ve HUVEC hücrelerinin IC<sub>50</sub> değerleri

Kolon kanseri (HT-29) ve normal hücreleri (HUVEC) üzerine 24 saat sonundaki etkisi kolon kanseri üzerinde sitotoksik etkisi ( $IC_{50}$ ) 39.54  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisinin ise ( $IC_{50}$ ) 64.82 olarak hesaplandı (Şekil 3).

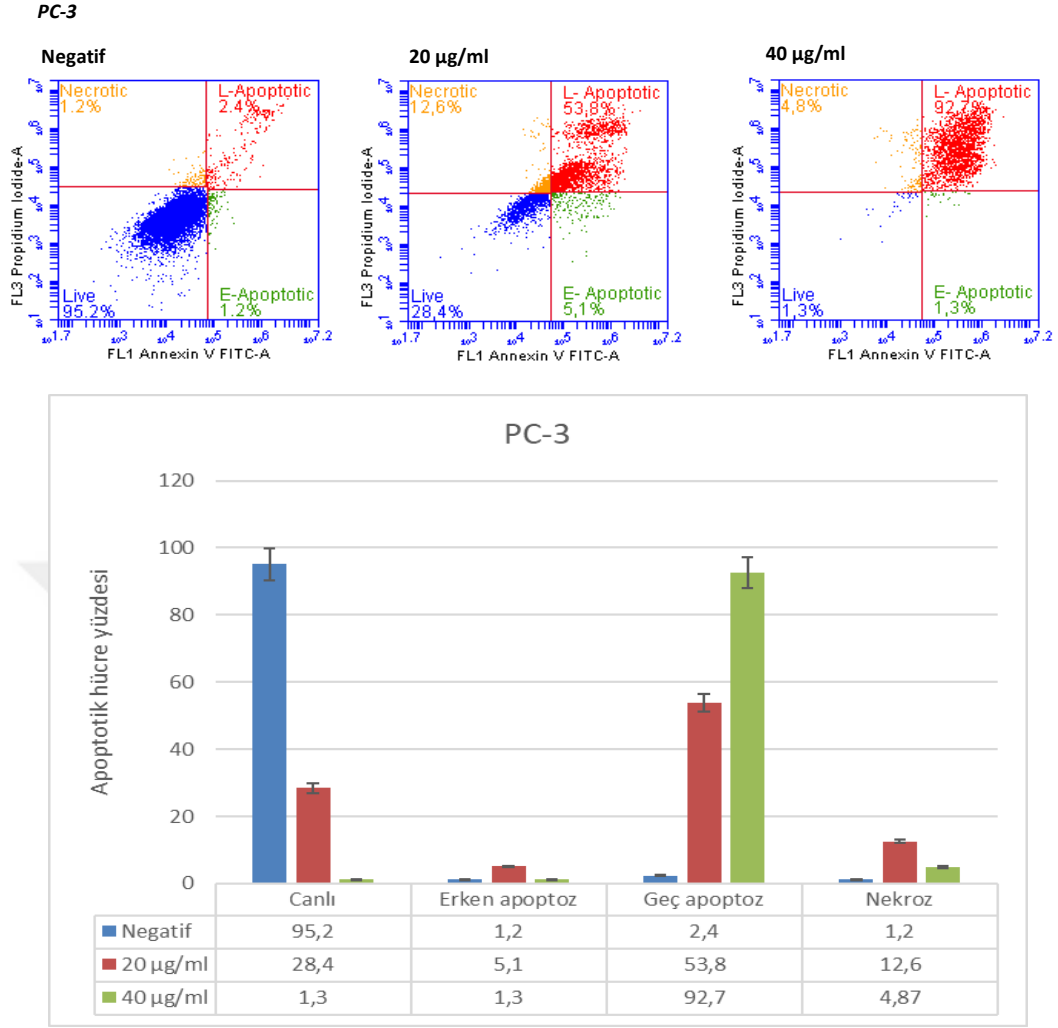


Şekil 4.4. HCT-116 ve HUVEC hücrelerinin  $IC_{50}$  değerleri

Kolon kanseri (HCT-116) ve normal hücreleri (HUVEC) üzerine 24 saat sonundaki etkisi kolon kanseri üzerinde sitotoksik etkisi ( $IC_{50}$ ) 74.07  $\mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanırken, normal hücreler üzerindeki etkisi ( $IC_{50}$ ) 64.82 olarak hesaplandı(Şekil 4.4).

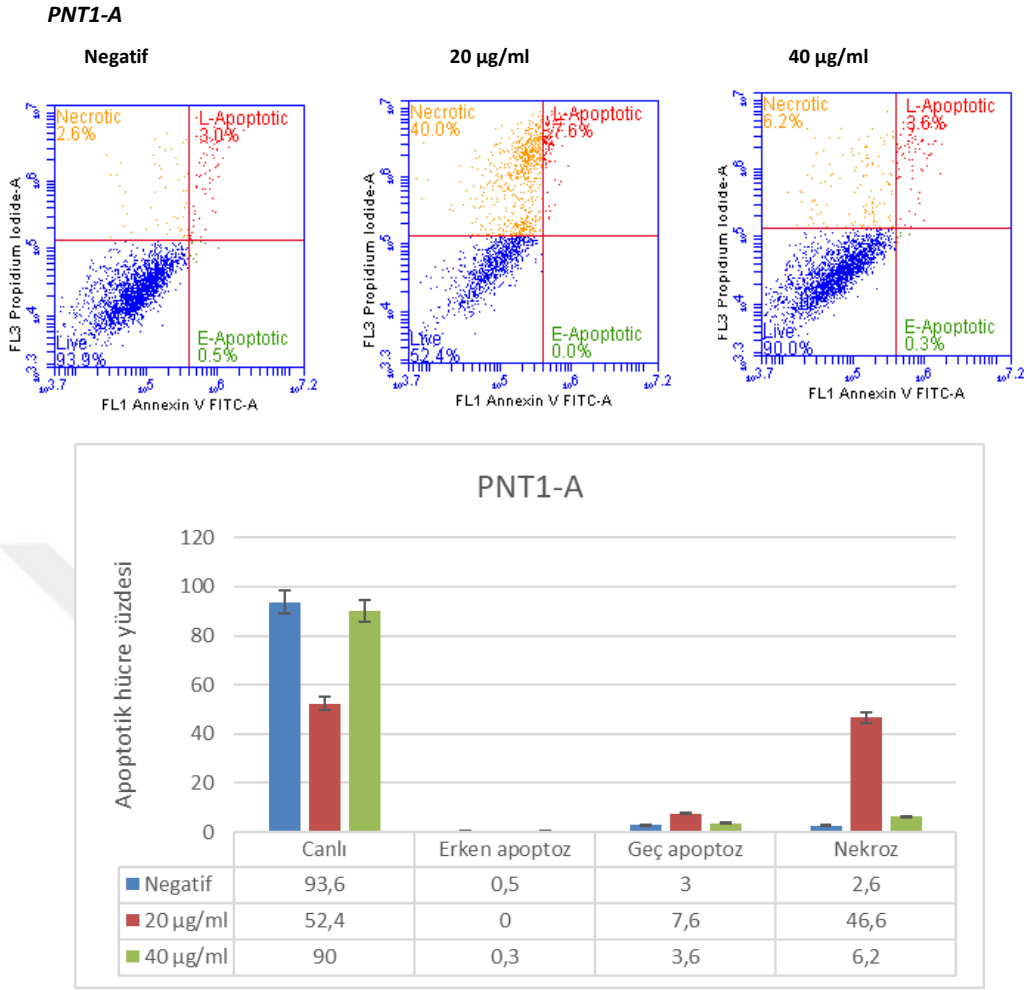
#### 4.2. Flow Sitometrik Annexin-V- PI Apoptoz/Nekroz Analizi

Hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri ile tespit edilen  $IC_{50}$  değerlerine göre 40 $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde PC-3 ve PNT1-A hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre ölümünün ağırlıklı olarak apoptotik hücre ölümü olup olmadığı Akış Sitometrik Annexin-V-PI boyamaları ile tespit edildi.



**Şekil 4.5.** PC-3 hücrelerinin Sitometrik Annexin-V-PI boyaması sonucu IC<sub>50</sub> değerleri

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi 40 µg/ml dozlarında anlamlı bir etki gösterdiğini (%94,0) ve doz artışına bağlı olarak hücre ölümünün arttığını tespit ettik ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.001^{**}$ ,  $p < 0.0001^{***}$ ). Buna karşın artan dozlar (20 ve 40 µg/ml)’da normal hücrede ölüm oranında anlamlılık tespit edilmemiş, en yük doz olan 40 µg/ml’de % 94,0 oranında apoptotik hücre tespit edilmiştir. Normal hücre aynı dozda muamele edildiğinde ise %3,9 olarak hesaplanmıştır.

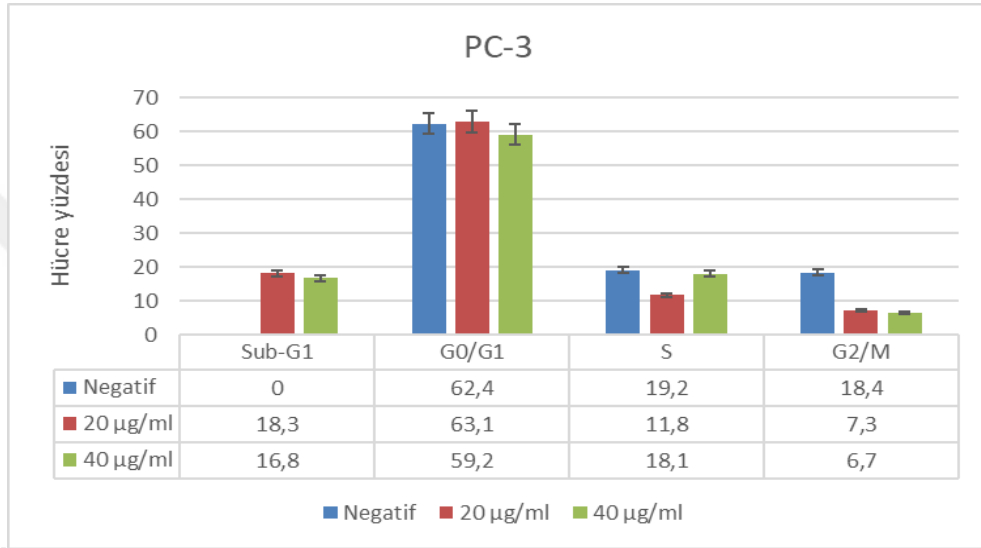
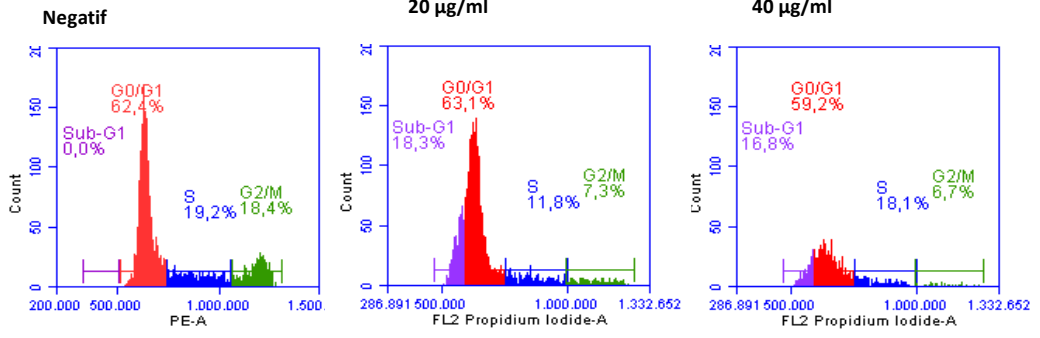


Şekil 4.6. PNT1-A hücrelerinin Sitometrik Annexin-V-PI boyaması sonucu IC<sub>50</sub> değerleri

### 4.3. Flow Sitometrik Hücre Döngüsü Analizi

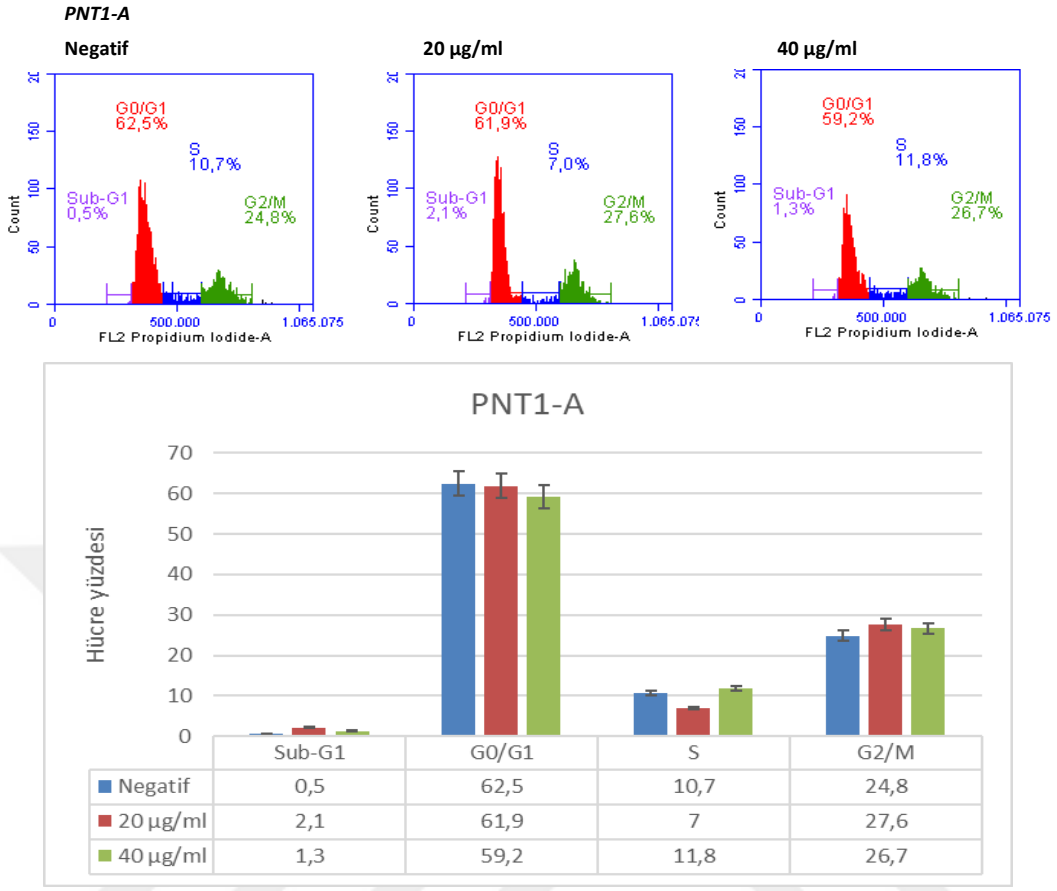
Batik extract ile muamele edilen PC-3 hücrelerin bölünmesi üzerinde etkisi 20 µg/ml dozundan başlayarak görüldü ve etkin dozun hücre bölünmesini yavaşlattığı tespit edildi.

### PC-3



Şekil 4.7. Bitki ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin hücre döngüsü aşamasındaki yüzdeleri

40 µg/ml dozda, hücre döngüsü aşamaları Şekil 4.7’de Sub-G1’de %16,8 , G0/G1 fazında %59,2, S fazında % 18,1 ve G2/M fazında % 6,7 olarak belirlendi



**Şekil 4.8.** Bitki ekstraktı ile muamele edilen PNT1-A hücrelerinin hücre döngüsü aşamasındaki yüzdeleri

40 µg/ml dozda, hücre döngüsü aşamaları Şekil 4.8’de Sub-G1’de %1,3, G0/G1 fazında %59,2 , S fazında % 11,8 ve G2/M fazında % 26,7 olarak belirlendi.

## 5.TARTIŞMA

Son yıllarda kanser hastalarının oranındaki hızlı artış araştırmacıları yeni tedavi yöntemi bulmaya yönlendirmiştir. Bu yöntemlerde; mevcut kullanılan ilaçlardaki zararlı kimyasal etkiyi düşürebilmek adına doğal yollarla elde edilebilen ürünlere ilgiyi arttırmak amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda özellikle immun sistemi güçlendirecek yönde anti-mikrobiyal ve anti-oksidan içeriği yüksek olan bitkilere dikkat çekilmiştir. Ancak bu bitkilerin etkin dozlarının belirlenebilmesi ve doğru şekilde tedavi amaçlı kullanılabilmesi için detaylı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yeni perspektif fitoterapi adıyla karşımıza çıkmaktadır.

Bitkilerin, insan sağlığında ve sağlık sorunlarının çözümünde üstlendiği önemli rol ve buna ilişkin uygulamalar, çok eski çağlardan beri bilinir. Hipokrat'ın, tedavi amacıyla dörtüüz bitkiden yararlandığı bilinmektedir. Önceleri, gözlem ve deneme-yanılma yöntemleriyle edinilmiş çeşitli alışkanlıklar şeklinde gelişen geleneksel özellikteki bazı uygulamalar, zaman içinde bilim alanına da uyarlanmıştır. Örneğin, söğüt ağacı (Salix L.) kabuğunun veya yapraklarının, tedavide ilaç olarak kullanıldığı, Eski Mısır, Sümer, Hitit yazıtlarında kaydedilmiştir. Yıllar sonra bu veri, bilimsel olarak kanıtlanmıştır; bu bilgiden hareketle, çağımızda dünyanın en çok kullanılan ilacı olan "Aspirin" elde edilmiştir. Günümüzde, ilaçla tedavinin ve ilaçların kökenini oluşturan bitkilerin doğrudan ya da dolaylı biçimlerde kullanımı, bilimsel bir uğraş olarak "Farmakognozi" bilimi kapsamında ele alınmaktadır. Bitkilerle de ilgili kimyasal maddelerin, vücuttaki tedavi edici özellikleri ise "Farmakoloji" biliminin kapsamına girer (102).

Son yıllarda ise farmakolojik alandaki büyük gelişmelerle birlikte bu bitkisel ürünler tıp dünyasının önemli bir kısmını oluşturmaya başlamıştır. Yapılan araştırmalar sonucu anti-kanser etkisi olduğu tespit edilen bitkiler, kanser tedavisinde kullanılmak üzere ilaç üretiminde rol almışlardır (103).

Bitkisel ürünlerin ve onların türevlerinin vücudun immün sistemiyle uyumlu olması ve etkin değer bulunduğunda sağlıklı hücrelere zarar vermeden, vücudun direncini arttırmasına yardımcı olması, onların tedavilerde tercih edilmelerinin başlıca sebeplerindendir (104). Bitki popülasyonunun üyelerinin besin içerikleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle çalışılacak bitkinin besin içeriği hakkında bilgi sahibi olmak çalışmanın yönünün belirlenmesinde ve sonucunun öngörülmesinde etkili olabilir.

Örneğin, sarımsak anti-mikrobiyal özelliğe sahipken, birçok farklı kültürel kökenleri olan çeşitli bitkiler farklı uygulamalardan geçirilerek, hekimler tarafından birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (105).

Pıcan cevizi kabuğuyla daha önce Ana Cristina Pinheiro do Prado ve ark. tarafından yapılan çalışmada; pıcan cevzinin kabuğundan elde edilen sulu ekstraktın [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] , Balb-C farelerinde meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve Ehrlich asit tümörü üzerindeki aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, DNA parçalanması, hücre döngüsü durması ve pıcan cevizi kabuğu ekstraktı ile indüklenen apoptozis ile antitümör aktivitesi arasındaki ilişkisi değerlendirilmiştir (106).

Sitotoksikite, proliferasyon, hücre ölümü ve hücre döngüsü, MCF-7 hücrelerinde sırasıyla MTT, koloni deneyi, diferansiyel renklendirme ve akış sitometri deneyleri ile değerlendirilmiştir. DNA hasarı etkileri, CT-DNA ve plazmid DNA bölünmesi ile birleştirilerek ilişkilendirilen bu çalışmada; Balb / C farelerinde Ehrlich asit tümöründe tümör büyümesinin inhibisyonu, hayatta kalma süresi artışı, apoptoz ve hücre döngüsü durması değerlendirilmiştir (106).

Ceviz kabuğu ekstraktlarının sitotoksik etkisi, apoptoz ile hücre ölümünün indüklenmesi ve ayrıca MCF-7 hücrelerinde hücre döngüsünün durması gösterilmiştir. Ehrlich asit tümörlü farelerde hayatta kalma süresinin % 67 arttığı gözlemlenmiştir. (106).

Bu çalışmanın sonucunda pıcan cevizi kabuğu ekstraktlarının antitümör etkisine dahil olan mekanizma apoptotik hücre ölümünde (Bcl-XL, Baç ve p53) ve hücre döngüsü düzenlemesinde (siklin A, siklin B ve CDK2) yer alan kilit proteinlerin aktivasyonu ile ilgili olabileceği bulgusuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, gallik, 4-hidroksibenzoik, klorojenik, vanillik, kafeik ve ellagik asit ve kateşin, epikateşin, epigallocatechin ve epikateşin gallat gibi bileşikler sunan ekstraktın fenolik profiline bağlanmış. Elde edilen bulgularla, ceviz kabuğu ekstraktlarının tümör hücrelerinin büyümesine karşı etkili olduğu ve kanser tedavisine bir alternatif olarak değerlendirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır (107).

Bir diğerk çalışma Ana CristinaPinheiro do Prado ve ark. tarafından yapılmıştır. Pikan cevizi kabuğunun fenolik içerik düzeyini belirlemek için yapılan deneyler sonucunda pikan cevizi kabuklarında fenolik bileşik içeriği ve ekstraktların antioksidan aktivitesi ölçülmüş. DPPH metodu ilk olarak Branç-Williams ve ark.tarafından 1995 yılında geliştirilmiş olup sonrasında, Sanchez ve ark. tarafından 1998 yılında değiştirilerek kullanılmaya başlanmıştır. DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri doğal ekstraktların antioksidan içeriğinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemden elde edilen datalara göre r :0.9980 olarak bulunmuştur. ABTS [2,2'-amino-biç-(3- ethylbenzotiazoline- 6-sulphonic acid), spektrofotometrik olarak birçok maddenin toplam antioksidan aktivitesininbelirlenmesinde kullanılır (107).

Deney sonucunda ABTS(r:0,9973) olarak bulunmuş.Sonuçlara göre pikan ceviz kabuklarındaki fenolik bileşik içeriği ve ekstraktların antioksidan aktivitesi arasında anlamlı (p 0.05) bir korelasyon olduğu sonucuna varıldığı belirtilmiştir (109)

Mevcut çalışmamızda önceki çalışmadan farklı hücre hatları üzerinde çalışılmış ve sitotoksitite tayini yapılmıştır. İlk aşamada hekzan ile çözdürülen pikan cevizi yeşil kabuğunun ekstraktları elde edilmiştir. Deneyin ikinci aşamasında, elde edilen ekstraktın prostat kanseri (PC-3) ve normal prostat epitel hücreleri (PNT1-A)ve kolon kanser hücreleri (HCT-116), (HT-29) ve normal hücreleri (HUVEC) üzerine etkisi MTT yöntemi kullanılarak sitotoksite ölçümüyle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;PC-3 prostat kanseri hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi (IC<sub>50</sub>) 40.32 µg/mL iken normal prostat epitel hücreleri (PNT1-A) üzerinde sitotoksik etkisi (IC<sub>50</sub>) 83.60 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bulunan bu IC<sub>50</sub> dozunun normal hücrelerde çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. En anlamlı sonuçların prostat kanseri hücre hattı olan PC-3 hücrelerinden elde edilmesinden sonra, bu hücrelerdeki olası sitotoksik etkileri incelemek amacı ile bitki ekstresinin C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> bileşiğinin hücrelerde apoptotik yolağa mı yoksa nekroz ise mi yöneldiğini tespit etmek amacıyla Annexin VApoptosiz tayini yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda hücre sürkülasyonun G1, S, G2 ve M evrelerindeki canlılık oranları tespit edilmiştir. Elde edilen datalar sonucunda, bitki

ekstresinin C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> bileşiminin hücreleri apoptotik yolağa sürükleyerek, hücre ölüm oranında kayda değer bir artış sağladığı tespit edilmiştir.(107)

Yapılan laboratuvar çalışmalarından sonra elde edilen bulgulardan Pican cevizi kabuğunun anti-kanser özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda Pican cevizi kabuğunun fenolik içeriğinin yüksek olduğu belirtilmiştir (108). Fenolik maddelerin büyük olasılıkla hücre metabolizmasında rol alan regülasyon faktörleri olduğu belirtilmektedir ve yapılan çalışmalar flavonoidlerin, anti-mutajen ve anti-kanserojen olduğunu desteklemektedir (108).

Mevcut çalışmalardan pican cevizi kabuğunun anti-mikrobiyal ve antioksidan içeriğinin yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır. Tüm bu bilgiler tarafımızdan yapılmış olan laboratuvar çalışması verileri ile karşılaştırıldığında, hekzan çözeltisiyle ekstrakte edilen pican cevizi yeşil kabuğunun prostat kanseri hücre hattı PC-3 üzerinde kanser hücrelerini apoptozis yolağına sürüklemesine, yapısında bulunan fenolik bileşiklerin sebep olabileceği düşünülmektedir. Pican cevizi yeşil kabuğunun yüksek antioksidan ve anti-mikrobiyal aktiviteciye sahip olmasını sağlayan fenolik bileşenlerin yoğunluğu, bu bitkinin kabuk kısmının, spesifik kanser türleri üzerinde uygulanacak tedaviler için farmakolojik alanda destek sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

## 6.KAYNAKLAR

1. An B, Dang J, Dang P, Mac CM. "Treatment optimization with concurrent SBRT and Intra-cavitary brachy therapy for locally advanced cervical cancer." *J Appl Clin Med Phys*. 2016;17(1): 5610
2. Bilir, N., Cancer Frequency in Turkey, *Kanser*, Scientific Organ of the Turkish Assoc. For Cancer Research and Control. (1981) ; 11: 9397.
3. Aguilera A and Gomez-Gonzalez B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 204–17.
4. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998; 396:643–9
5. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339:1546–58.
6. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* .2016; 8:a019505.
7. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 2011;476:163–9.
8. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retino blastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68:820–3.
9. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429: 457–63.
10. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:143–53.
11. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150:12–27.
12. Gaykalova D, Vatapalli R, Glazer CA, et al. Dose-dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS. *PLoS One*. 2012; 7:e40389.
13. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* .2008;358: 1148–59.
14. Polak P, Karlic R, Koren A, et al. Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer. *Nature*. 2015;518:360–4.
15. Negrini S, Gorgoulis VG and Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:220–8.
16. Jackson SP and Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* .2009; 461:1071–8.
17. Norbury CJ and Zivnotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. 2004; 23:2797.

18. National Cancer Institute. *Causes and Prevention: The Genetics of Cancer*. 2017. Accessed 05/03/2018;
19. Longo VD and Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31:89–98.
20. Jones PA, Laird PW. Cancer Epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999; 21:163–7.
21. Plass C. Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 2002;11:2479–88. 20. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* .2003; 3:253–66.
22. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005; 6:597–610. 26. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261–82.
23. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* .2011;25:1010–22.
24. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG islands. *Nat Genet*. 2009;41: 178–86.
25. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. 2007;315:1141–3.
26. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* .1983;301:89–92.
27. Kagohara LT, Schussel JL, Subbannayya T, et al. Global and gene-specific DNA methylation pattern discriminates scholasticity from gall bladder cancer patients in Chile. *Future Oncol*. 2015;11:233–49.
28. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:1008–16.
29. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell*. 2002; 111:285–91.
30. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403:41–5.
31. Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 2002; 418: 104–8.
32. Chan KM, Fang D, Gan H, et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma programs H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev*. 2013; 27:985–90.
33. Lu C, Jain SU, Hoelper D, et al. Histone H3K36 mutations promote Sarcoma genesis through altered histone methylation landscape. *Science*. 2016; 352:844–9.
34. Tarakhovskiy A. Tools and landscapes of epigenetics. *Nat Immunol*. 2010; 11:565–8.

35. Wang Z, Schones DE, Zhao K. Characterization of human epigenomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:127–34.
36. Barth TK, Imhof A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends BiochemSci.* 2010;35:618–26.
37. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415–28.
38. Hakki Hakan Yılmaz, Cancer Trends and Incidence and Mortality Patterns in Turkey, *Japanese Journal of Clinical Oncology Advance* Access published 2010; June 17.
39. McNeal JE . Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 1988;12:619–33.
40. di Sant'Agnesse PA . Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology.* 1998;51(5A Suppl):121–4.
41. Isaacs JT . Prostatic structure and function in relation to the etiology of prostatic cancer. *Prostate.* 1983;4:351–66.
42. Ware JL . Growth factors and their receptors as determinants in the proliferation and metastasis of human prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1993;12:287–301.
43. Andreoiu, M. and L. Cheng, "Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications", *Hum.Pathol.* 2010; 41(6): p781-793,
44. Reynolds, M.A., "Molecular alterations in prostate cancer", *Cancer Lett.* 2008; 271(1): p13- 24,.
45. Stein, Q.P. and J.D. Flanagan, "Genetic and familial factors influencing breast, colon, prostate and lung cancers", *S D Med., Spec No.* 2010; 16-22.
46. Chuang, A.Y., "Immuno histochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma", *Am.J.Surg.Pathol.* 2007; 31(8): p1246-1255,
47. Humphrey,P.A. and G.L. Andriole, "Prostate cancer diagnosis", *Mo.Med.,* 107(2); p107-112, 2010.
48. Taylor, B.S., "Integrative genomic profiling of human prostate cancer", *Cancer Cell.,* 18(1); p11-22, 2010.
49. Ozen, M. and S. Pathak, "Genetic alterations in human prostate cancer: a review of current literature", *Anticancer Res.,* 20(3B); p1905-1912, 2000.
50. Boominathan, L., "The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex", *PLoS.One.,* 5(5); pe10615-2010.
51. Suzuki, H.I., "Modulation of microRNA processing by p53", *Nature.,* 460(7254); p529-533, 2009
52. Seligson, D.B., "Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence", *Nature,* 435(7046); p1262-1266, 2005.

53. Lamont, K.R. and Tindall, D.J., "Androgen regulation of gene expression", *Adv.Cancer Res.*, 107(137-162, 2010.
54. Albanes D, Jones DY, Schatzkin A, *et al.* Adult stature and risk of cancer. *CancerResearch*1988; 48: 1658–62.
55. Gross A, Mc Donnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899–1911. doi: 10.1101/gad.13.15.1899.
56. Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature.* 1997;385(6614):353–357. doi: 10.1038/385353a0.
57. Dewson G, Kluc RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton.* 2010;2:9–22.
58. Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene.* 2000;21:2283–2294.
59. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res.* 1995;55:4438.
60. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of Bcl-XL can confer a multi drug resistance phenotype. *Blood.* 1995;86:1903–1910.
61. Miquel C, Borrini F, Grandjouan S, Aupérin A, Viguier J, Velasco V, Duvillard P, Praz F, Sabourin JC. Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *Am J Clin Pathol.* 2005;23(4):562–570
62. Goolsby C, Paniagua M, Tallman M, Gartenhaus RB. Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukaemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;63(1):36–46.
63. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with *in vitro* apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer.* 1997;76(7):935–938. doi: 10.1038/bjc.1997.487.
64. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robins and Cotran: pathologic basis of disease.* 8. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. pp. 25–32.
65. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 2000;104:325–328.
66. Vaux D, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;203:449–504.

67. Mc Carthy NJ, Evan GI. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol.* 1998;36:259–278.
68. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2665–2672. doi: 10.1172/JCI26252. [
69. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's Principles of internal medicine.* New York: McGraw-Hill Companies. 18th ed; 2011.
70. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch.* Berlin: De Gruyter; 2014
71. Faiz M. Khan “The Physics of Radiation Therapy” ,Third edition.Lippin cott Williams&Wilkins, 2003; P:3 - 58.
72. Mundt AJ, Roeske JC, Weichselbaum RR. Physical and biologic basis of radiation oncology. In: Banst RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland CF,
73. Frei E, editors. *Cancer medicine.* Hamilton: Decker, 2000; 465-78.
74. The National Cancer Institute(NCI), Radiation Therapy Side Effects, May 1, 2018
75. The American Cancer Society medical and editorial content team, Last Medical Review: July 23, 2015 Last Revised: August 8, 2016
76. Chrea B, O'Connell JA, Silkstone-Carter O, et al. Nature's antidepressant formild to moderate depression: isolation and spectral characterization of hyperforin from 224 Falzon&Balabanova a standardized extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *J ChemEduc* 2014;91(3):440–2.
77. Lawvere S, Mahoney M. St. John's Wort. *Am Fam Physician* 2005;72(11):2249–54
78. Tattelman E. Health effects of garlic. *Am Fam Physician* 2005;72(01):103–6.
79. Tarrega A, Salvador A, Meyer M, et al. Active compounds and distinctive sensory Features provided by American ginseng (*Panaxqu inquefolius L.*) extract in a new Functional milk beverage. *J DairySci* 2012;95(8):4246–55.
80. Geng J, Dong J, Ni H, et al. No convincing evidence of a cognitive enhancing effect Of Panax ginseng. *Cochrane Database SystRev* 2010;(12):CD007769.
81. Lissiman E, Bhasale AL, Cohen M. Garlic for the common cold. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;(11):CD006206.
82. Jepson R, Kleijnen J, Leng GC. Garlic for peripheral arterial occlusive disease. *Cochrane Database SystRev* 2013;(4):CD000095.
83. Van Loo ve ark. 2012, Ana Cristina Journal of the Science of Food and Agriculture October 2009; 89 (13): DOI: 10.1002/jsfa.3708

84. Harman D. "Origin And Evolution Of The Free Radical Theory Of Aging" A Brief Personal History, 1954– 2009. *Biogerontology* 2009;10(6):773-81.
85. Tunalier Z, Öztürk N, Koşar M, et.al." Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi." *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*; 2002.
86. Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, et.al. "The Effect Of Polyphenols İn Olive Oil On Heart Disease Risk Factors: A Randomized Trial." *Ann Intern Med* 2006;145:333-41.
87. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84. 2006
88. Macdougall, Preston J. "Fruitful synthesis of science and fiction." *Nature*, 2002, 415.6867: 13
89. Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. "Dietary Polyphenols and The Prevention of Diseases." *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;45:287-306
90. Arouma OI "Free radicals, oxidative stres and antioxidants in human health and disease." *J Am Oil Chem Soc* 75:199212,1998.
91. Balasundram N, Sundram K, Samman S "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potentialuses." *Food Chem* 99:191–203,2006.
92. IOM Dietary, functional and total fiber Dietary Reference Intake for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids, National Academie sPress, Washington, DC (2005), pp. 339-371
93. J. Slavin Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits *Nutrients*, 5 (2013), pp. 1417-1435
94. J.W. Anderson, P. Baird, R.H. Davis Jr., S. Ferreri, M. Knudtson, A. Koraym, V. Waters, C.L. Williams Health benefits of dietary fiber *J. Agric. FoodChem.*, 59 (2011), pp. 152-162
95. USDA, Noncitrus fruits and nuts 2014 summary <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/NoncFruiNu/NoncFruiNu-07-17-2015.pdf>, 2015 (site visited October 19, 2015).
96. W.J. Florkowski, J.C. Purcell, E.E. Hubbard Importance for the U. S. Pecan industry of communicating about quality
97. A.C.P. Do Prado, A.M. Aragão, R. Fett, J.M. Block Antioxidant properties of Pecan nut [*Caryaillinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell infusion *Grasas y Aceites*, 60 (2009), pp. 330-335

98. Kornsteiner, Kris Etherton, AAFCO, 60.110 Ground Pecan Shells. Official names and definitions of feed ingredients. In 2015 Official Publication. Association of American Feed Control Officials Incorporated. 2015, p. 415.
99. Reckziegel P1, Boufleur N, Ecotoxicol Environ Saf. 2011 Sep;74(6):1770-8. doi: 10.1016/j.eco env.2011.04.022. E pub 2011 Apr 29.
100. Sabrina CAXAMBÚ, Elaine BIONDO 1 FoodSci.Technol(Campinas) vol.36 supl.1 Campinas July 2016 Epub Apr 29, 2016 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.0043>
101. Babu D1, Crandall PG, Johnson CL, O'Bryan CA, Ricke SC. J Food Sci. 2013 Dec;78(12):M1899-903. doi: 10.1111/1750-3841.12311. E pub 2013 Nov 26..
102. Tunalıer Z, Öztürk N, Koşar M, et.al.” Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi.” Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı; 2002.
- 103 Davis, P. H. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Edinburgh, c.VII, 1970.
104. Güner, A. ve J. Zielinski, “Salix rizeensis (Salicaceae): a new willow from NE Turkey.”
105. J. ve G. J. Richardson, Karaca Arboretum Magazine 1 (1993): 1–5. Isebrands, Poplars and willows: trees for society and the environment, FAO, 2014.
106. Kuzovkina Y. A. ve M. F. Quigley, “Willows beyond wetlands: uses of salix l. species for environmental projects.”, Water, Air.
107. Ana Cristina Pinheiro do Prado, Analu Monalise Aragão, Roseane Fettand Jane Mara Block Antioxidant properties of Pecannut [Carya illinoensis (Wangenh.) C. Koch] Shell infusion
108. Ana Cristina Pinheiro do Prado, Dutra RC1, Leite MN, Barbosa NR. Int J MolSci. 2008 Apr; 9 (4):606-14. E pub 2008 Apr 18.



T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

**Öğrencinin**

Numarası :175308001  
Adı, Soyadı :Zeynep HAYIRLI  
Anabilim Dalı (Bölümü) :Tıbbi Biyoloji  
Programı :  X Yüksek Lisans  Doktora  
Tezin Adı: Pıcan cevizi (*Carya illinoensis*) Yeşil Kabuğunun Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 45 sayfalık kısmına ilişkin, 22/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, benzerlik oranı %21'dir.  
Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orijinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 22/05/2019

**Tezi Hazırlayan Öğrencinin**

Adı-Soyadı: Zeynep HAYIRLI

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 22/05/2019

**Danışmanın**

Unvanı-Adı-Soyadı: Doç. Dr. Feridun AKKAFA

İmzası:

# Pıcan Cevizi (Carya illinoensis) Yeşil Kabuğunun Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi

ORIJINALLIK RAPORU

%**21**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**6**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**18**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

**1**

Submitted to Harran Üniversitesi  
Öğrenci Ödevi

%**13**

**2**

www.saglikstemiz.com  
İnternet Kaynağı

%**1**

**3**

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart  
University  
Öğrenci Ödevi

%**1**

**4**

Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam  
University  
Öğrenci Ödevi

%**1**

**5**

dergipark.gov.tr  
İnternet Kaynağı

%**1**

**6**

AYGÜN ÇEVİK, Burçin. "Beslenme ve Kanser",  
Fırat Üniversitesi, 2017.  
Yayın

%**1**

**7**

Submitted to Trakya University  
Öğrenci Ödevi

%**1**

T.C  
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
ULUSAL TEZ MERKEZİ

## TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10267509
Yazar Adı / Soyadı	ZEYNEP HAYIRLI
T.C.Kimlik No	12899988048
Telefon	5452502667
E-Posta	zeynephayirli63@gmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	PİCAN CEVİZİ (Carya illinoensis)YEŞİL KABUĞUNUN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ
Tezin Tercümesi	INVESTIGATION OF ANTICANCER PROPERTIES OF PECAN NUT(Carya illinoensis)SHELL
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	58
Tez Danışmanları	DOÇ. DR. FERİDUN AKKAFA
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Antikanser, pican cevizi, apoptozis

10.07.2019

İmza: 