

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ecballium elaterium (L.) A. Rich.'DEN İZOLE EDİLEN
KUKURBİTASINLARIN HÜCRE PROLİFERASYONU VE TELOMERAZ
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

EMİR TOSUN

DOKTORA TEZİ
KİMYAMÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2016

Tezin Başlığı: *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich'den İzole Edilen
Kukurbitasinlerin Hücre Proliferasyonu ve Telomeraz
Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Emir TOSUN

Sınav Tarihi: 13.07.2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Mühendisliği Anabilim
Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet BAYSAR

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Cevdet AKOSMAN

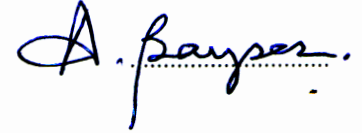
Fırat Üniversitesi

Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

Fırat Üniversitesi

Doç. Dr. Canan AKMİL BAŞAR

İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Alaaddin ESEN

Enstitü Müdürü



Aileme...

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.’den İzole Edilen Kukurbitasinlerin Hücre Proliferasyonu ve Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması’’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Emir TOSUN



ÖZET

Doktora Tezi

Ecballium elaterium (L.) A. Rich.'DEN İZOLE EDİLEN KUKURBITASİNLERİN HÜCRE PROLİFERASYONU VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Emir TOSUN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

179 + xiii sayfa

2016

Danışman: Prof. Dr. Ahmet BAYSAR
İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ergül EYOL

Bu çalışmada, *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. meyve suyundan kukurbitasinlerin (Kukurbitasin D ve I) izolasyonu, izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın LS174T ve SW620 kolon kanser hücrelerinin çoğalması ve telomeraz aktivitesi üzerine olan etkisinin in vitro olarak araştırılması ve bu etkinin matematiksel modellerle ifade edilmesi amaçlanmıştır.

Kukurbitasinler, olgun meyvelerin suyundan kloroformla ekstraksiyondan sonra çözücünün uzaklaştırılmasıyla oluşan kalıntının etil alkolde çözülerek HPLC cihazında analitik kolonda yürütülmesi ve bu maddeleri içeren fraksiyonların fraksiyon toplayıcıda toplanmasıyla elde edilmiştir. Liyofilizasyon sonucu izole edilen Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I konsantrasyonlarının sırasıyla 418 µM ve 296 µM, saflıklarının ise standartlarla aynı olduğu belirlenmiştir.

Kukurbitasin D ve I'nın hücre çoğalması üzerine etkileri, farklı konsantrasyonlarda (5-250 nM) ve farklı inkübasyon sürelerinde (6.-96. saatlerde) uygulanmasıyla hücre türü, uygulama süresi, uygulama maddesi türü ve konsantrasyonu yönünden in vitro olarak kesikli ortamda incelenmiştir. Tür, konsantrasyon ve süreye bağlı olarak kukurbitasinlerin LS174T ve SW620 hücre hatlarının proliferasyonunu (çoğalmasını) etkilediği görülmüştür ($p<0,05$). Kukurbitasin D ve I'nın hücre çoğalması üzerine etkilerinin zamanla değişimi (kinetik davranışı) için yeni modeller geliştirilmiştir. Uygulama maddesi konsantrasyonunun etkisi ise Monod ve Tessier modelleri ile ifade edilmiştir.

Kukurbitasin D ve I'nın 48 saat süre sonunda LS174T ve SW620 hücre hatlarında telomeraz aktivitesi üzerine olan etkisini araştırmak için RT-PCR yöntemi kullanılarak hTERT mRNA düzeylerindeki değişimler incelenmiş, hücre türü, uygulama maddesi türü ve konsantrasyonu (5-250 nM) yönünden değerlendirilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak kukurbitasinlerin telomeraz aktivitesini azalttığı görülmüş ($p<0,05$) ve bu etki Monod ve Tessier modelleri ile ifade edilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, Kukurbitasin D ve I'nın kolon kanserinde tedavi edici olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu yönde ileri araştırmaların yapılması, kukurbitasinlerin anti kanser etkisinin açığa çıkarılması bakımından önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich., Kukurbitasinler, Kolon kanseri, LS174T hücre hattı, SW620 hücre hattı, Antiproliferatif etki, MTT testi, Telomeraz aktivitesi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

AN INVESTIGATION ON THE EFFECT OF CUCURBITACINS ISOLATED FROM *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. ON CELL PROLIFERATION AND TELOMERASE ACTIVITY

Emir TOSUN

Inönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemical Engineering

179 + xiii pages

2016

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet BAYSAR
Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ergül EYOL

In this study, cucurbitacins (Cucurbitacin D and I) were isolated from *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. fruit juice. The isolated Cucurbitacin D and I were used in vitro to determine cell proliferation and telomerase activity in colon cancer cell lines LS174T and SW620. The effect of cell proliferation and telomerase activity on cell lines was expressed by mathematical models.

Cucurbitacins were extracted from the juice of ripe fruits with chloroform. The residue obtained by removing the organic solvent of phase was dissolved in ethyl alcohol and then was fractionated by an analytical column HPLC. The fractions containing Cucurbitacin D and I were collected in the fraction collector. The fractions were lyophilized and Cucurbitacin D and I crystals were obtained. The concentrations of the isolated Cucurbitacin D and I were determined as 418 μM and 296 μM , respectively. The isolated Cucurbitacin D and I were at the same purity as the standards.

Both cucurbitacins were applied at various concentrations (5-250 nM) and different incubation times (6-96 hours) on colon cancer cell lines LS174T and SW620. The effect of cell type, cucurbitacin type, cucurbitacin concentration and duration of application were studied in batch medium, in vitro. It was observed that depending on cell type, cucurbitacin type, cucurbitacin concentration and duration of application had significant effect on cell proliferation ($p < 0.05$). New kinetic models for the effect of Cucurbitacin D and I on cell proliferation with time were developed. The effect of cucurbitacin concentration was expressed by Monod and Tessier models.

In order to determine the effect of Cucurbitacin D and I on telomerase activity in LS174T and SW620 cell lines after 48 hours of application, RT-PCR was used to identify the changes on the hTERT mRNA levels. Telomerase activity was evaluated for cell type, cucurbitacin type and cucurbitacin concentration (5-250 nM). It was found that telomerase activity decreased with cucurbitacin concentration ($p < 0.05$). The effect of cucurbitacin concentration was also expressed by Monod and Tessier models.

The results obtained in this study show that Cucurbitacin D and I may be promising therapeutic agents for colon cancer. However, further research has to be carried out for the development of anti cancer cucurbitacin containing drugs.

Keywords: *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich., Cucurbitacins, Colon cancer, LS174T cell line, SW620 cell line, Antiproliferative effect, MTT test, Telomerase activity

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyduğum, kendisinden feyz aldığım, her zaman desteğini hissettiğim değerli danışman Hocam Prof. Dr. Ahmet BAYSAR'a sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince bilgilerini ve fikirlerini paylaşılarak sağladıkları katkıları ve ayrıca yapıcı eleştirileri ve yorumları için tez izleme komitesi üyesi değerli hocalarım Prof. Dr. Asım KÜNKÜL ve Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e çok teşekkür ederim.

Doktora tez konumun seçiminde, deneylerde kullandığım hücrelerin teminindeki katkıları, hücre kültürü laboratuvarını ve laboratuvar malzemelerini maddi karşılık beklemezsizin kullanmama izin veren her zaman desteğini esirgemeyen İkinci danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ergül EYOL'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışma materyalinin teşhisindeki katkılarından dolayı İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Turan ARABACI'ya teşekkür ederim.

HPLC cihazını kullanmama izin vererek tez çalışmamın birinci bölümünün yapılmasına olanak sağlayan, kapısını her çaldığımda beni güler yüzüyle karşılayarak desteğini hissettiren Gıda Mühendisliği öğretim üyesi Prof. Dr. Adnan HAYALOĞLU'na çok teşekkür ederim. Ayrıca tezimin izolasyon çalışmaları kısmında yardımlarını gördüğüm Gıda Mühendisliği bölümünden başta Arş. Grv. Tuğçe BİLENLER olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Yine tez çalışmalarım esnasında cihaz ve kimyasal ihtiyaçlarımın karşılanması konusunda destek ve yardımlarını gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Burhan ATEŞ ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Hücre kültürü laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan ve her zaman desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Arş. Grv. Fuat KARAKUŞ ve doktora öğrencisi Kadir YILMAZ'a teşekkür ederim.

Telomeraz Aktivitesi deneyleri aşamasında tezimi teknik olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimine, birimde çalışan arkadaşlarıma ve Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e teşekkür ederim.

Matematiksel modelleme yapabilmem için verdiği program desteği ve oluşturulan modellere yönelik yaptığı olumlu eleştiri ve katkıları için Doç. Dr. Mehmet YÜCEER'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	ÖZET	i
	ABSTRACT	ii
	TEŞEKKÜR	iii
	ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
	TABLolar DİZİNİ	xi
	SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.	GİRİŞ	1
2.	KURAMSAL TEMELLER	4
2.1.	<i>Ecballium elaterium</i> (L.) A. Rich.....	4
2.1.1.	<i>E.elaterium</i> 'un faydaları ve bileşimi	5
2.2.	Kukurbitasinler	7
2.2.1.	Türleri	8
2.2.2.	Genel özellikleri	8
2.2.3.	Farmakolojik ve biyolojik özellikleri	9
2.2.3.1.	Kukurbitasinlerin antikanser etkileri	9
2.2.4.	Kukurbitasin D	10
2.2.5.	Kukurbitasin I.....	11
2.3.	Kukurbitasinlerin Ekstraksiyonu, İzolasyonu, Saflaştırılması ve Tayini	12
2.4.	Kanser.....	18
2.4.1.	Kolon kanseri	20
2.4.1.1.	LS174T kolon kanseri hücre hattı	22
2.4.1.2.	SW620 kolon kanseri hücre hattı	23
2.5.	Telomeraz ve Kolon Kanseri.....	24
2.6.	Hücre Çoğalmasının Modellenmesi ve Parametre Belirleme	26
2.6.1.	Parametre tahmininde kullanılan optimizasyon yöntemleri.....	30
2.6.2.	Model performansı	33
3.	MATERYAL VE METOD	35
3.1.	Materyal	35
3.1.1.	Bitki materyali.....	35
3.1.2.	LS174T ve SW620 hücre hatları	35
3.1.4.	Kullanılan sarf malzemeler	37
3.1.5.	Kullanılan kimyasallar	37
3.1.6.	Kullanılan kitler.....	38
3.2.	Metod	39
3.2.1.	Ön işlemler ve ekstraktların hazırlanması.....	39
3.2.1.1.	Ön işlemler	39
3.2.1.2.	Hekzan ile ekstraksiyon ve ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi	43
3.2.1.3.	Kloroform ile ekstraksiyon ve ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi.....	45
3.2.2.	Kukurbitasin D ve I'nın izolasyonu ve saflaştırılması	46
3.2.3.	Standart çözeltilerinin hazırlanması	50
3.2.4.	HPLC yöntemi.....	51
3.2.4.1.	Analitik HPLC fraksiyonlama sistemi ve saflık tayini.....	56
3.2.4.2.	Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I fraksiyonlarının liyofilizasyonu.....	57
3.2.5.	Hücre kültürü.....	57
3.2.5.1.	Besiyerin hazırlanması	57
3.2.5.2.	Hücre pasajı.....	57
3.2.5.3.	Kanser hücrelerinin dondurulması	58
3.2.5.4.	Hücrelerin ekimi.....	58

3.2.6.	MTT proliferasyon testi ve çoğalma kinetiğinin belirlenmesi	58
3.2.6.2.	MTT proliferasyon testi	60
3.2.6.3.	Hücre çoğalma kinetiği ve model parametre değerlerinin belirlenmesi .	63
3.2.7.	Hücre kültürlerinde kantitatif Real-Time PCR ile hTERT gen ekspresyonunun analizi	65
3.2.7.1.	Hücre kültüründen total RNA 'nın elde edilmesi	65
3.2.7.2.	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	66
3.2.7.3.	hTERT geninin ifade düzeyinin RT-PCR ile belirlenmesi	67
3.2.8.	İstatistiksel değerlendirme.....	68
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	69
4.1.	Hekzan ve Kloroform ile Ekstraksiyon Çalışmaları	69
4.2.	TLC ile Kolon ve Flaş Kromatografisi için Çözücü Sisteminin Belirlenmesi ve Kloroform Ekstraktının Fraksiyonlanması.....	70
4.3.	<i>E.elaterium</i> Meyve Suyu Kloroform Ekstraktının HPLC ile Analizi	71
4.4.	Kukurbitasin D ve I'nın HPLC'de Fraksiyonlanması ve Saflık Kontrolü ...	79
4.5.	Kukurbitasin D ve I Fraksiyonlarının Liyofilizasyonu ve Saflık Kontrolü .	83
4.6.	MTT Proliferasyon Test Sonuçları.....	94
4.6.1.	Hücre çoğalma kinetiği model parametre değerlerinin belirlenmesi	97
4.6.2.	Kukurbitasin D ve I 'nın antiproliferatif etkisinin araştırılması	97
4.6.3.	Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerine etkileri	116
4.6.3.1.	IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	116
4.6.3.2.	Hücre proliferasyonu üzerine konsantrasyon etkisinin modellenmesi..	127
4.7.	Telomeraz Aktivitesinde hTERT Gen Ekspresyonu Bulgularının Değerlendirilmesi	134
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	145
6.	ÖNERİLER.....	157
7.	KAYNAKLAR.....	158
	EKLER.....	172
	ÖZGEÇMİŞ.....	179

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	<i>E.elaterium</i> 'un çiçek ve meyve görüntüsü	4
Şekil 2. 2.	Kukurbitanın genel yapısı	7
Şekil 2. 3.	Kukurbitasin B, D, E ve I'nın yapısı	8
Şekil 2. 4.	Kukurbitasin D'nin kimyasal yapısı	11
Şekil 2. 5.	Kukurbitasin I'nın kimyasal yapısı	12
Şekil 2. 6.	Kalın bağırsağın bölümleri	21
Şekil 2. 7.	Kalın bağırsakta polipten kanser gelişimi	22
Şekil 2. 8.	LS174T kolon kanseri hücrelerin morfolojik görüntüsü	23
Şekil 2. 9.	SW620 kolon kanseri hücrelerin morfolojik görüntüsü	24
Şekil 2. 10.	Telomer uzunluğu ve çoğalma kapasitesi üzerine telomeraz inhibisyonunun etkisi	25
Şekil 2. 11.	Telomeraz enziminin yapısı	25
Şekil 2. 12.	Parametre belirleme için algoritma	31
Şekil 3. 1.	<i>E.elaterium</i> bitkisi ve meyveleri	35
Şekil 3. 2.	LS174T (a) ve (b) SW620 hücreleri	36
Şekil 3. 3.	Çalışmanın deneysel prosedürü	40
Şekil 3. 4.	<i>E.elaterium</i> meyvelerinin suyunu sıkmada kullanılan pres	41
Şekil 3. 5.	Meyve suyunun vakum düzeneği ile süzülmesi	41
Şekil 3. 6.	(a) <i>E.elaterium</i> meyve suyunun kurutulduğu vakumlu fırın (b) kurutulan meyve suyu ve kalıntısı	42
Şekil 3. 7.	<i>E.elaterium</i> meyve suyunun hekzanla ekstraksiyonu	43
Şekil 3. 8.	<i>E.elaterium</i> meyve suyunun 40 °C sıcaklıkta dikey soğutucu kullanılarak hekzanla ekstraksiyonu	44
Şekil 3. 9.	Farklı sıcaklıklardaki ekstraksiyon işlemlerinde meyve suyu/hekzan oranları	45
Şekil 3. 10.	<i>E.elaterium</i> meyve suyuna uygulanan ön işlemler ve ekstraksiyon işlemleri	47
Şekil 3. 11.	<i>E.elaterium</i> meyve suyunun kloroform ekstraktındaki Kukurbitasin D ve I'nın TLC ile tayini	49
Şekil 3. 12.	<i>E.elaterium</i> meyve suyunun kloroform ekstraktının kolon kromatografisinde fraksiyonlanması	49
Şekil 3. 13.	<i>E.elaterium</i> kloroform ekstraktının flaş kromatografisinde fraksiyonlanması	50
Şekil 3. 14.	Çalışmada kullanılan HPLC sisteminin görüntüsü	51
Şekil 3. 15.	Kullanılan HPLC sisteminin şematik görünümü	52
Şekil 3. 16.	25 mg/l konsantrasyonundaki standart Kukurbitasin D kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi	54
Şekil 3. 17.	110 mg/l konsantrasyonundaki standart Kukurbitasin I kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi	55
Şekil 3. 18.	MTT'nin formazan kristallerine dönüşümü	59
Şekil 3. 19.	MTT test metodu ile canlı hücre sayısının belirlenmesi	61
Şekil 3. 20.	Hücre proliferasyonu (MTT testi) deneyinin şematik görünümü	62
Şekil 3. 21.	Hücre çoğalma kinetiği için matematiksel model oluşturma ve parametre belirleme prosedürü	64
Şekil 4. 1.	Ekstraksiyon işleminde meyve suyu/hekzan oranları ve sıcaklığın etkisi	70

Şekil 4. 2.	<i>E.elaterium</i> meyve suyu kloroform ekstraktının analitik C18 kolonda yürütülmesinde kullanılan gradient akış programı	71
Şekil 4. 3.	Kolon kromatografisi 9. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	72
Şekil 4. 4.	Kolon kromatografisi 10. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	72
Şekil 4. 5.	Kolon kromatografisi 11. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	73
Şekil 4. 6.	Flaş kromatografisi 21. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	73
Şekil 4. 7.	Flaş kromatografisi 22. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	74
Şekil 4. 8.	Flaş kromatografisi 23. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	74
Şekil 4. 9.	Flaş kromatografisi 24. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	75
Şekil 4. 10.	Flaş kromatografisi 25. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	75
Şekil 4. 11.	Flaş kromatografisi 26. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	76
Şekil 4. 12.	Flaş kromatografisi 27. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	76
Şekil 4. 13.	Flaş kromatografisi 28. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	77
Şekil 4. 14.	Flaş kromatografisi 29. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	77
Şekil 4. 15.	Flaş kromatografisi 30. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	78
Şekil 4. 16.	Flaş kromatografisi 31. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram.....	78
Şekil 4. 17.	Flaş kromatografisi 23. fraksiyonun 229 nm dalga boyunda manuel integrasyonu.....	80
Şekil 4. 18.	Kukurbitasin D (flaş kromatografi 23. fraksiyon) pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları	80
Şekil 4. 19.	Kukurbitasin I (flaş kromatografi 23. fraksiyon) pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları	81
Şekil 4. 20.	Kukurbitasin D (flaş kromatografi 23. fraksiyon) saflık spektrumu	81
Şekil 4. 21.	Kukurbitasin I (flaş kromatografi 23. fraksiyon) saflık spektrumu	82
Şekil 4. 22.	Kukurbitasin D (flaş kromatografi 23. fraksiyon) UV spektrumu	82
Şekil 4. 23.	Kukurbitasin I (flaş kromatografi 23. fraksiyon) UV spektrumu	83
Şekil 4. 24.	İzole edilen liyofilize Kukurbitasin D ve I kristalleri	84
Şekil 4. 25.	Standard Kukurbitasin D'nin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları.....	85

Şekil 4. 26.	İzole edilen Kukurbitasin D'nin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları.....	85
Şekil 4. 27.	Standart Kukurbitasin D'nin saflık spektrumu	86
Şekil 4. 28.	İzole edilen Kukurbitasin D'nin saflık spektrumu	86
Şekil 4. 29.	Standart Kukurbitasin D pikinin UV spektrumu.....	87
Şekil 4. 30.	İzole edilen Kukurbitasin D pikinin UV spektrumu	87
Şekil 4. 31.	Standart ve izole edilen Kukurbitasin D piklerinin karşılaştırıldığı kromatogram.....	88
Şekil 4. 32.	Standart kukurbitasin I pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramlarının görüntüsü	89
Şekil 4. 33.	İzole edilen Kukurbitasin I pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramlarının görüntüsü	89
Şekil 4. 34.	Standart Kukurbitasin I pikinin saflık spektrumu	90
Şekil 4. 35.	İzole edilen Kukurbitasin I pikinin saflık spektrumu.....	90
Şekil 4. 36.	Standart Kukurbitasin I pikinin UV spektrumu	91
Şekil 4. 37.	İzole edilen Kukurbitasin I pikinin UV spektrumu.....	91
Şekil 4. 38.	Standart ve izole edilen Kukurbitasin I piklerinin karşılaştırıldığı kromatogram.....	92
Şekil 4. 39.	Standart ve izole edilen Kukurbitasin D ve I piklerinin birlikte karşılaştırıldığı kromatogram	93
Şekil 4. 40.	Kukurbitasin D konsantrasyonuna bağlı olarak (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin proliferasyonunun uygulama süresi ile değişimi	95
Şekil 4. 41.	Kukurbitasin I konsantrasyonuna bağlı olarak (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin proliferasyonunun uygulama süresi ile değişimi.....	96
Şekil 4. 42.	LS174T hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği.....	98
Şekil 4. 43.	SW620 hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği.....	99
Şekil 4. 44.	5 ve 25 nM Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği.....	101
Şekil 4. 45.	5, 25 ve 50 nM Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	102
Şekil 4. 46.	5 nM Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği.....	103
Şekil 4. 47.	5, 25 ve 50 nM Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	104
Şekil 4. 48.	50, 100 ve 250 nM Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	107
Şekil 4. 49.	100 ve 250 nM Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	108
Şekil 4. 50.	25, 50, 100 ve 250 nM Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	109
Şekil 4. 51.	100 ve 250 nM Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalm kinetiği grafiği	110
Şekil 4. 52.	Kukurbitasin D uygulaması sonrası (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin canlılık oranları.....	113

Şekil 4. 53.	Kukurbitasin I uygulaması sonrası (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin canlılık oranları.....	115
Şekil 4. 54.	LS174T hücrelerine 60 saat süreyle Kukurbitasin D uygulaması sonrası % inhibisyon grafiği.....	117
Şekil 4. 55.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)	118
Şekil 4. 56.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)	120
Şekil 4. 57.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)	120
Şekil 4. 58.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 48 saat)	121
Şekil 4. 59.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)	121
Şekil 4. 60.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)	122
Şekil 4. 61.	Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)	122
Şekil 4. 62.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)	123
Şekil 4. 63.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)	123
Şekil 4. 64.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)	124
Şekil 4. 65.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 48 saat)	124
Şekil 4. 66.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)	125
Şekil 4. 67.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)	125
Şekil 4. 68.	Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)	126
Şekil 4. 69.	Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli	129
Şekil 4. 70.	Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli	130
Şekil 4. 71.	Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli	131
Şekil 4. 72.	Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli	132
Şekil 4. 73.	LS174T ve SW620 hücre hatlarından saflaştırılan RNA'ların jel görüntüsü (Cu-D; Kukurbitasin D, Cu I; Kukurbitasin I) ..	134
Şekil 4. 74.	Hidroliz prob kullanılarak β –aktin ve hTERT mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğalm egrileri	135

Şekil 4. 75.	β –aktin ve hTERT cDNA’larının PCR’daki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü.....	136
Şekil 4. 76.	LS174T hücrelerinin 48 saat süreyle 5, 25, 50, 100 ve 250 nm (a) Kukurbitasin D ve (b) I uygulaması sonrasında hTERT/ β –aktin mRNA oranları	137
Şekil 4. 77.	SW620 hücrelerinin 48 saat süreyle 5, 25, 50, 100 ve 250 nm (a) Kukurbitasin D ve (b) I uygulaması sonrasında hTERT/ β –aktin mRNA oranları	138
Şekil 4. 78.	Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli ..	140
Şekil 4. 79.	Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli ..	141
Şekil 4. 80.	Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli ..	142
Şekil 4. 81.	Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier modeli	143

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1.	<i>E.elaterium</i> bitkisinde kukurbitasin türleri ve türevlerinin dağılımı	6
Tablo 2. 2.	Kukurbitasinlerin organlara göre miktarları	6
Tablo 2. 3.	Kukurbitasinlerin HPLC ile analizine yönelik yapılan çalışmalar	19
Tablo 2. 4.	<i>fmincon</i> komutunun parametrelerinin anlamı	32
Tablo 3. 1.	Kukurbitasinlerin tayin ve saflaştırılmasında kullanılan HPLC parametreleri.....	53
Tablo 3. 2.	Kukurbitasin D 'ye ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri ile eğri denklemi, R, R ² değerleri ve kalibrasyon aralığı.....	54
Tablo 3. 3.	Kukurbitasin I 'ya ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri ile eğri denklemi, R, R ² değerleri ve kalibrasyon aralığı	55
Tablo 3. 4.	hTERT geninin ifade düzeyinin RT-PCR ile belirlenmesinde kullanılan primer dizileri	67
Tablo 4. 1.	LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri.....	98
Tablo 4. 2.	SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri	99
Tablo 4. 3.	Kukurbitasin D ve I uygulanan LS174T ve SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri (Eşitlik 4.2).....	105
Tablo 4. 4.	Kukurbitasin D ve I uygulanan LS174T ve SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri (Eşitlik 4.3).....	111
Tablo 4. 5.	%50 inhibisyonun gerçekleştiği uygulama süreleri.....	116
Tablo 4. 6.	Doğrusal olmayan regresyon analizi ile IC ₅₀ model parametre ve performans değerleri	119
Tablo 4. 7.	Doğrusal olmayan regresyonla hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	126
Tablo 4. 8.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin D ve I uygulaması sonrası LS174T ve SW 620 hücrelerinin özgül çoğalım hızları	128
Tablo 4. 9.	% Canlı hücre değişimini ifade eden Monod ve Tessier modellerinin parametre ve performans değerleri.....	133
Tablo 4. 10.	hTERT mRNA gen ifade düzeyinin değişimini ifade eden Monod ve Tessier modellerinin parametre ve performans değerleri	144

SİMGELER ve KISALTMALAR

α-Elaterin	Kukurbitasin E
ATCC	Amerikan tip kültür koleksiyonu
ACN	Asetonitril
cDNA	Komplementer DNA
Cu-D	Kukurbitasin D
Cu-I	Kukurbitasin I
DAD	Diode Array Dedector
dk.	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
cDNA	Complementary DNA – Komplementer DNA
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram
h	Saat
HCT-116	Human colon carcinoma cell
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPLC-MS	HPLC-Mass Spectroscopy
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HT-29	Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Line
hTERT	İnsan telomeraz ters transkriptaz
hTR	İnsan telomeraz RNA
IC₅₀	% 50 inhibitör konsantrasyonu
L	Litre
JAK	Janus Kinase
LS174T	Human Caucasian colon adenocarcinoma
MAE	Ortalama Mutlak Hata
MAPE	Ortalama Mutlak Yüzde Hata
mL	Mililitre
mRNA	Messenger RNA - Haberci RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
nm	Nanometre

nM	Nanomolar
p	İstatiksel anlam düzeyi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Korelasyon Katsayısı
R²	Belirlilik Katsayısı
Rf	TLC 'de yürüme hızı
RMSE	Ortalama Kare Hata Karekökleri
RNA	Ribonükleik asit
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-PCR	Real time-PCR
β Elaterin	Kukurbitasin B
s	Saniye
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SW620	Human colon adenocarcinoma cell line
TLC	Thin Layer Chromatography - İnce tabaka kromatografisi
TFA	Trifluoro asetik asit
UV	Ultraviyole
VEGF-2	Vascular Endothelial Growth Factor-2

1. GİRİŞ

İnsan hayatı ile birlikte var olan tıbbi tedavinin temeli, tabiatta bulunan bitkiler ve maddelerdir. Şifalı bitkilerle tedavi uygulaması, insanlık tarihinde 5000 yıllık bir geçmişe sahiptir. İnsanoğlu gelişiminde önce yakın çevresinde yabani bitkileri tanımış, sonra deneme–yanılma yöntemi ile bazı bitki ve ürünlerinin çeşitli hastalıklarda faydalı olduğunu fark etmiş ve bunlar yıllar boyunca halk arasında çeşitli şekillerde uygulamış ve halen de uygulamaktadır. Hastalıkları iyileştirmede yakın çevredeki bitkilerden yararlanarak, değişik bitkilerin yapraklarını, çiçeklerini, toprak üstü kısımlarını, meyvelerini, tohumlarını, köklerini ve kabuklarını su ile kaynatarak çay şeklinde veya ezerek macun ya da lapa halinde ilaç olarak kullanmıştır. Daha yakın tarihte bitkilerin ilaç olarak kullanımı, aktif bileşenlerin izolasyonunu içermektedir. Bitkilerden farmakolojik aktif bileşenlerin izolasyonu ve karakterizasyonu gün geçtikçe artan bir hızda devam etmektedir (Balunas, 2005).

Günümüzde bitkisel doğal ürünlere olan ilgi her zamankinden daha fazladır. Bitkiler antikarsinojenik, anti-inflamatuvar, antiallerjik, antifungal, antibakteriyel etkiler gibi pek çok biyolojik aktif özellikleri nedeniyle bilim adamlarının ilgisini çekmektedirler.

Bu çalışmanın konusu olan *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich (*E.elaterium*) halk arasındaki adı ile acı kavunun tedavi amaçlı kullanıldığı yazılı ve sözlü kaynaklardan görülmektedir. *E.elaterium*'un meyve ve kökleri, eski Mısırlılar döneminden beri tanınan ve yaygın kullanımı olan bir drog olarak bilinir. Bitkinin idrar arttırıcı ve müshil etkisi bulunmaktadır. Dahilen yüksek miktarlarda alındığında özellikle kalın bağırsağı tahriş ederek kanlı ishallere neden olur. Halen tedavide, meyve usaresinden elde edilen *E.elaterium* müshil olarak kullanılmaktadır. Köklerden hazırlanan lapa ve merhemler, haricen tümörlere ve ekzama gibi kronik cilt yaralarına, romatizma ağrılarına karşı kullanılmıştır. Meyvelerinin sıkılması ile elde edilen taze usarenin, buruna çekilmek suretiyle sinüzite karşı kullanımı Anadolu'da yaygındır (Baytop, 1984).

E.elaterium'da cucurbitaceae (kabakgiller) familyasına özgü kukurbitasinler adıyla bilinen bir grup triterpenik doğal bileşikten birçoğu bulunmaktadır. Kukurbitasinler ekstraksiyon ile farklı çözümler kullanılarak bu bitkilerden elde edilirler. Kukurbitasin türlerinin yüksek verimlilik ve saflıkta elde edilmeleri

kullanılacak çözgen türüne, çözgen kombinasyonuna ve kombinasyonda kullanılacak miktarlarına bağlıdır.

Yapılan araştırmalarda kükurbitasinlerin hem sitotoksik hem de antikanserojen etkiye sahip olduğu, bir çok kanser türünün gelişimini inhibe ettiği, kanser hücreleri için antiproliferatif olduğu belirtilmiştir (Rios vd., 2005). Birçok türü olan kanser, vücuttaki bir hücre veya hücre grubunun iç ve dış etkilerle farklılaşarak aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasından oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan bir hastalıklar grubudur. Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser türleri arasında özellikle kolon kanseri, dünyada gözlenen en yaygın kanser tipi olup, kansere bağlı ölümlerde erkeklerde ikinci, kadınlarda üçüncü sıradadır. Epidemiyolojik veriler kolorektal kanserlerin önlenmesi veya sıklığının azaltılmasına yönelik çalışmaların artırılması gerektiğini göstermektedir (Şen, 2008).

Kolon kanserinde kanser ile telomeraz ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 1994). Telomeraz, kromozom uçlarında yer alan telomer dizilerine hekzamer tekrarları (TTAGGG)_n ekleyerek genom kararlılığını sağlayan ribonükleoprotein yapıda bir enzimdir. Telomeraz, somatik hücrelerde inaktif iken, kök hücreleri ve germ hücrelerinde aktiftir. Ayrıca kanser hücrelerinde %90'ın üzerinde telomeraz aktivitesinin pozitif olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, telomerazı hem kanser tanısında hem de tedavisinde ilgi çekici bir hedef haline getirmiştir. Telomeraz aktivitesiyle hTERT ekspresyonu arasında belirgin bir ilişki olduğu ve hTERT ekspresyonunun telomeraz aktivitesinin hız sınırlayıcısı olduğunu ileri sürülmüştür (Ito vd., 1998).

In vitro çalışmalarda beklenen, sitotoksik ve antiproliferatif uygulamaya maruz bırakılan kanser hücrelerinin çoğalma hızının zamanla yavaşlaması veya sabit kalmasıdır. Bunun sonucunda ise hücre sayısında azalma meydana gelecektir. Düşüş görünen hücre çoğalma hızı, hücre tipi ve uygulanan tedavi dozuna bağlıdır ve bu hız daha önceden belirlenmemiştir. Düşük doz tedavi uygulandığında ise hücreler, farklı hızda tekrar çoğalarak benzer şekilde büyüme eğrisi oluşturacaktır (Zhang vd., 2006).

Bu tez çalışmasının ilk amacı; cucurbitaceae familyasına ait *E.elaterium* bitkisinde bol miktarda bulunan kükurbitasin türlerinden Kükurbitasin D ve

Kukurbitasin I 'nın olgun meyvelerin sularından tayini, izolasyonu ve saflaştırılmasıdır.

Çalışmanın ikinci amacı; meyve suyundan izole edilen Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I'nın MTT testi ile *in vitro* olarak kolon kanser hücrelerine (LS174T ve SW620) sitotoksik ve antiproliferatif etkilerinin araştırılmasıdır.

Üçüncü amacı; yine izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın bu hücrelerdeki telomeraz aktivitesine inhibitör etkilerini araştırmaktır.

Dördüncü ve son olarak ise; *in vitro* MTT test deneyleri ile hücre çoğalma inhibisyon kinetiğinin araştırılması ve elde edilen kinetik veriler kullanılarak lineer olmayan parametre belirleme tekniği kullanılarak, hücrelerin çoğalması sürecinde meydana gelen değişimleri tahmini olarak ifade eden matematiksel model eşitliklerinin oluşturulması, hücre çoğalması üzerine uygulama maddelerinin (Kukurbitasin D ve I) konsantrasyonlarının etkisinin matematiksel modellerle ifade edilmesi, yine benzer şekilde telomeraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin matematiksel modellerle ifade edilmesi hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich

E.elaterium, ülkemizde Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen, Mayıs-Eylül arası çiçek açan, taşlık yerlerde, yol kenarlarında bulunan Cucurbitaceae familyasına ait otsu bir bitkidir. Yöresel olarak; acı dülek, eşek hıyarı, cırtatan, şeytan keleş, yabani hıyar gibi isimlerle de bilinir. Meyve ve kökleri, eski Mısırlılar döneminden beri yaygın olarak tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Halk arasında usaresi yaygın olarak sinüzit ve sarılığa karşı kullanılmaktadır (Ekici vd., 1998; Baytop, 1984).

E.elaterium; Şekil 2.1’de görüldüğü gibi yatık gövdeli, çok yıllık otsu bir bitki olup, gövde ve yaprakları sert tüylerle örtülüdür ve çiçekleri açık sarı renklidir. Kökleri 30-40 cm, gövdesi ise 1-2 m’ye kadar uzanır. Meyveler; oval, saplı ve olgunlukta aşağı sarkık duruşludur. İçinde sümüksü bir sıvı, siyaha çalan koyu kahve renkli tohumları vardır. Meyve olgunlaştıkça içinde büyük bir basınç toplanır ve rengi hafifçe sararır. Sonra patlayarak tohumlarını 4-6 m uzağa fırlatır. Meyveler olgunlaşınca renk sarımsı-yeşil olur ve dalından kolayca kopar. Koparıldığı yerdeki delikten tohumları ve öz suyu kolayca çıkar. Bu su gözler için çok yakıcı ve tehlikelidir.



Şekil 2.1. *E.elaterium*'un çiçek ve meyve görüntüsü

Gövde ve dallarının üzeri fırça gibi sert tüylerle kaplıdır. Yaprakları üçgen-kalp şeklinde ve kenarları dişlidir. Üstü yumuşak, altı sert tüylerle kaplıdır. Virâneliklerde yetişir. Mavi yeşil yapraklı, sert kaba tüylü, sürüngen otsu bir bitkidir. Akdeniz bölgesinde çok rastlanır (Anonim, 2012; Ishii vd., 2013; Peters vd., 1997)

2.1.1. *E.elaterium*'un faydaları ve bileşimi

E.elaterium meyve ve kökleri, eski Mısırlılar döneminden beri tanınan ve yaygın kullanımı olan bir drog olarak bilinir. Bitkinin idrar artırıcı ve müshil etkisi bulunmaktadır. Dahilen yüksek miktarlarda alındığında özellikle kalın bağırsağı tahriş ederek kanlı ishallere neden olur. Halen tedavide, meyve usaresinden elde edilen Ecballium müshil olarak kullanılmaktadır. Köklerden hazırlanan lapa ve merhemler, haricen tümörlere ve ekzama gibi kronik cilt yaralarına, romatizma ağrılarına karşı kullanılmıştır. Meyvelerinin sıkılması ile elde edilen taze usarenin, buruna çekilmek suretiyle sinüzite karşı kullanımı Anadolu'da yaygındır (Ekici vd., 1998; Baytop, 1984).

Bitkinin anti tümör aktivite yönünden incelenmesi, bitkiye önem kazandırmış ve bitkinin güçlü bir anti tümör ajan olduğu saptanmıştır. Bu etki bitkinin içerdiği kukurbitasinlerden ileri gelmektedir. Ayrıca bitkinin sinüzit tedavisinde etkili olduğu bilimsel olarak aydınlatılmıştır, ancak ekstrelerin iritan karakteri bir sakıncadır. Diüretik, katartik olarak ve habis tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkiden elde edilen sulu ekstreler, halk tıbbında kansere karşı kullanılmaktadır (Atasü, 1985).

Karaciğer sirozu ve hemoroid üzerinde iyileştirici etkisinin olduğu belirtilmektedir. Kabızlığı geçirdiği, kusturucu etkisinin olduğu, kulak iltihabı ve sıtmayı geçirmek için kullanıldığı, yılan ve akrep sokmalarına karşı panzehir olduğu bildirilmektedir. Halk arasında buruna suyunun damlatılması suretiyle sarılığı geçirdiğine inanılır. Bitkiden elde edilen ekstreler, kansere karşı kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Atasü vd., 1985; Yeşilada vd., 1989; Attard vd., 2008; Razavi vd., 2009).

E.elaterium'un temel maddesi, cucurbitaceae familyasına özgü kukurbitasinler adıyla bilinen bir grup triterpenik bileşiklerdir. Bunların yanı sıra steroller, fenolik bileşikler, aminoasitler ve yağ asitleri bitkide bulunan diğer bileşiklerdir.

Kukurbitasin, acı tadı ve toksik etkisi iyi bilinen ve yüksek oranda oksijenlenmiş bir maddedir (Atasü vd., 1985). *E.elaterium*'dan ilk izole edilen

kukurbitasin 1831’de Morris ve Hennel’in izole ettiği α -Elaterin (Kukurbitasin E) dir. 1909’da Power ve Moor, bitkiden yeni bir kukurbitasin izole etmişler ve buna β -Elaterin (Kukurbitasin B) adını vermişlerdir. Günümüze kadar bitkiden Kukurbitasin D, I, R, L, H, G harfleriyle adlandırılan bir dizi kukurbitasin ve bunların türevleri elde edilmiştir. *E.elaterium*’dan izole edilmiş kukurbitasin ve türevlerinin bitkinin organlarına göre dağılımı Tablo 2.1.’de görölmektedir.

Tablo 2.1. *E.elaterium* bitkisinde kukurbitasin türleri ve türevlerinin dağılımı (Atasü vd., 1985)

ORGANLAR	Kukurbitasinler								Kukurbitasin Türevleri				
	E	D	I	G	H	B	L	R	1	2	3	3	5
Kök	+	+	+	+	+	+							
Gövde	+	+	+			+							
Yaprak	+	+	+	+	+	+							
Çiçek	+	+	+			+							
Meyve	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tohum	+	+	+			+							

1: Anhidro-22-deokso-3-epi-izokukurbitasin O

2: Hegzanor-kukurbitasin I

3: 16-deoksi- Δ^{16} hegzanorkukurbitasin O

4: 2-O- β -D-glikopiranozil kukurbitasin B

5: 2-O- β -D-glikopiranozil kukurbitasin D

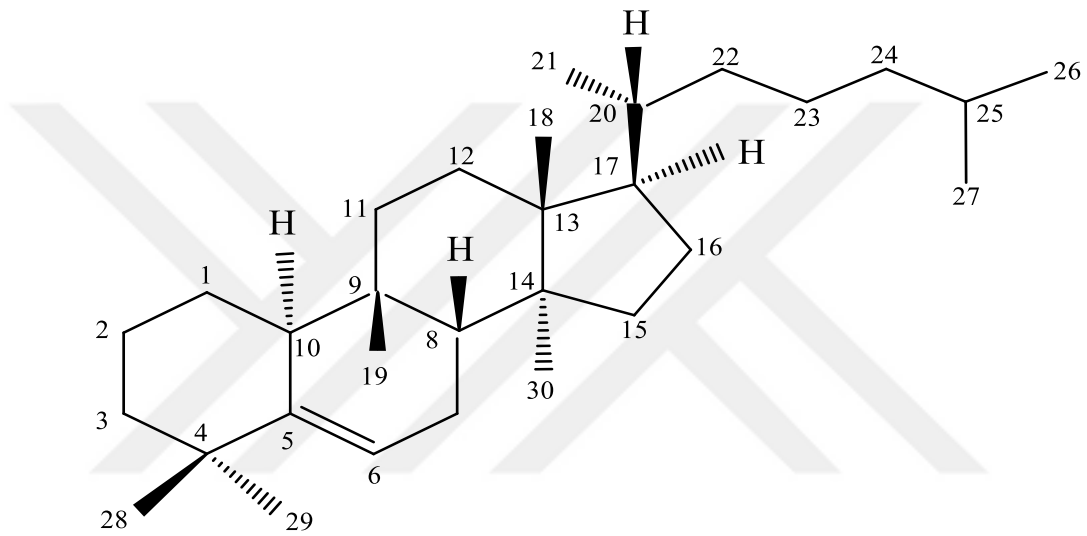
E.elaterium bitkisinin çeşitli kısımlarında bulunan kukurbitasin miktarları, Tablo 2.2’de verilmiştir (Lavie vd., 1958; Gonzalez vd., 1967; Rao vd., 1974; Balbaa, 1979; Atasü vd., 1985; Miro vd., 1995).

Tablo 2.2. Kukurbitasinlerin organlara göre miktarları

Organ	Miktar (%)
Taze Meyveler	0,409-2,204
Kuru Meyve	0,06
Taze Yaprak ve Çiçekler (En düşük)	0,026
Kuru Yaprak	0,3-0,5
Taze Kökler	1,4-1,7

2.2. Kukurbitasinler

Kukurbitasinler, çok oksijenli biyokimyasal bileşiklerdir. Yapısal olarak, tetrasiklik kukurbitan çekirdek iskeletinin 19-(10→9β)-abeo-10-lanost-5-ene ile karakterize olan kukurbitasin (Şekil 2.2), kimyasal olarak çok çeşitli bir bileşik olup, yan zincir modifikasyonları ve stereokimya değerlerine göre alt grublara ayrılır. Serbest veya glikozillenmiş formda bulunabilen bu bileşik ailesi Çin ve Hindistan gibi Asya ülkelerinde yüzyıllardır geleneksel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Atasü vd., 1985; Lee vd., 2010).



Şekil 2.2. Kukurbitanın genel yapısı

Tüm kukurbitasin cinsleri, C-5-C-6 arasında bir çift bağa sahiptir. Tam olarak, steroidal değildirler. Çünkü bir metil grubu, C-10'dan ziyade C-9'da yerleşiktir. C-4'de dimetil grubu, C-24'de izopropil grubu taşımaktadır. Tetrasiklik triterpenlerdir. Kukurbitasinler yapılarında birçok hidroksi ve asetoksi grupları içermesi ve doymamış olması nedeniyle diğer tetrasiklik triterpenlerden farklıdırlar. Oda sıcaklığında genellikle kristal yapıdadırlar. Kısmi polar bileşiklerdir. Sudaki çözünürlükleri düşüktür. Çoğu kukurbitasinler petrol eteri, kloroform, benzen, etil asetat, metanol ve etanolde çözünürler fakat eterde çözünmezler. Bu bileşikler genellikle 228-234 nm ultraviyole ışık aralığında maksimum absorbans verirler. Kukurbitasin moleküllerinin kimyasal reaktif grupları, yapısındaki birçok keton ve alkol gruplarıdır (Rios vd., 2005).

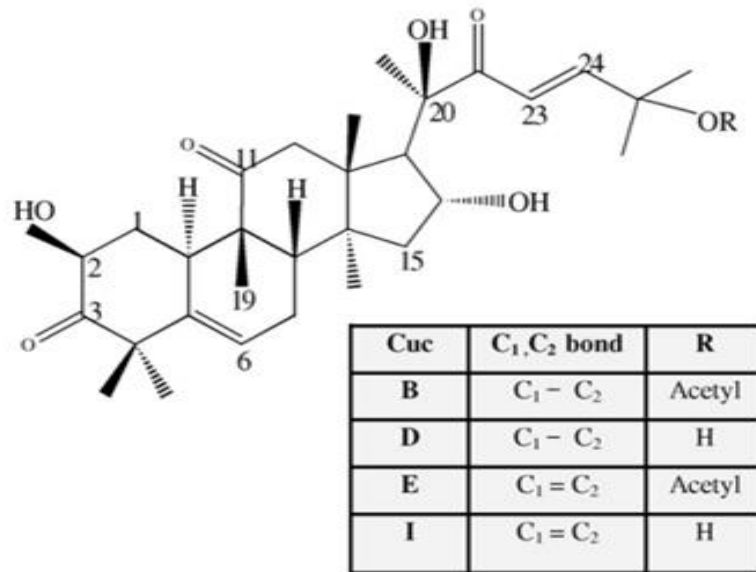
2.2.1. Türleri

Kukurbitasinlerin, içerdikleri hidroksil, asetil ve keto substituentlerinin farklı konumlarda bulunduğu yapılardaki A-T harfleriyle isimlendirilen 17 temel molekül bulunmaktadır. Kukurbitasinler birbirlerinden aşağıda maddeler halinde belirtilen durumlara göre birbirlerinden farklılaşırlar.

- C -2, -3, -19, -24'de hidroksil grubunun bulunup bulunmaması
- C-3 de keton fonksiyonunun bulunup bulunmaması,
- C-1 ve C-2; C-23 ve C-24 arasında çift bağın var olup olmaması,
- C-26 hidroksi grubunun asetillenmenin olup olmaması.

Şekil 2.3'de yukarıda sözü edilen farklılaşma durumlarına göre, Kukurbitasin B, D, E ve I türünün nasıl oluştuğu açıkça görülmektedir (Gerges vd., 2007).

Günümüze dek Cucurbitales takımında bulunan Cucurbitaceae ve diğer familyalara ait bitkilerden A, B, C, D, E, F, H, I, J, L, O, P, Q ve S kukurbitasinleri ve bunların türevleri elde edilmiştir. Bu türler içerisinde doğada en yaygın olarak bulunan kukurbitasin B ve D türleridir.



Şekil 2.3. Kukurbitasin B, D, E ve I'nın yapısı

2.2.2. Genel özellikleri

Kukurbitasinler, birçok tıbbi tedavi edici ve iyileştirici etkilere sahiptirler. Serbest kukurbitasinler, tohumların içinde doğal olarak oluşurlar. Bilinen en acı tada sahip bileşiklerdir. Sahip oldukları kendilerine has bu özellik, yapısında bulunduğu

bitkiyi otçullara karşı korur. Birçok böcek türü için besi ortamında bulunması öldürücü etki yapar. Kukurbitasinlerin üretimi bitki tarafından kontrol edildiğinden ancak gerek duyulduklarında yapılırlar (Rios vd., 2005; Shaw, 2005).

2.2.3. Farmakolojik ve biyolojik özellikleri

Tatları aşırı derecede acıdır ve pürgatif (müshil) özellikleri için yüzyıllardır kullanılmışlardır. Kukurbitasinler, güçlü sitotoksik aktiviteye ve antitümör özelliğine sahiptirler. Kukurbitasinler, anti-enflamatuvar, anti-kanser, anti-mikrobal, anti-hepatotoksik, anti-yanıcı, anti-giberellin (bir çeşit bitki hormonu) ve anti-helmintik aktivitelere de sahiptirler. Karaciğer hastalığı, karaciğer yetmezliği, siroz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. İmmuno sistem üzerinde etkilidir. Tirosinaz melanin sentez inhibitörüdürler. Kusturucu etkileri vardır. Müshil olarak kullanılırlar. Bitki parazitleri ve böceklere karşı etkilidir (Jayaprakasa vd., 2003; Rios vd., 2005; Attard vd., 2005; Halaweish vd., 2007; Helene vd., 2007).

2.2.3.1. Kukurbitasinlerin antikanser etkileri

Kukurbitasin araştırmalarındaki en önemli önceliklerden biri bu bileşiklerin sitotoksik ve antikanser etkilerinin bulunması olmuştur. Bu etkilerin, kukurbitasinlerin yüksek bir toksisite düzeyi olması ve bu toksisitenin de muhtemelen kanser hücrelerine karşı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Frei vd., 1998).

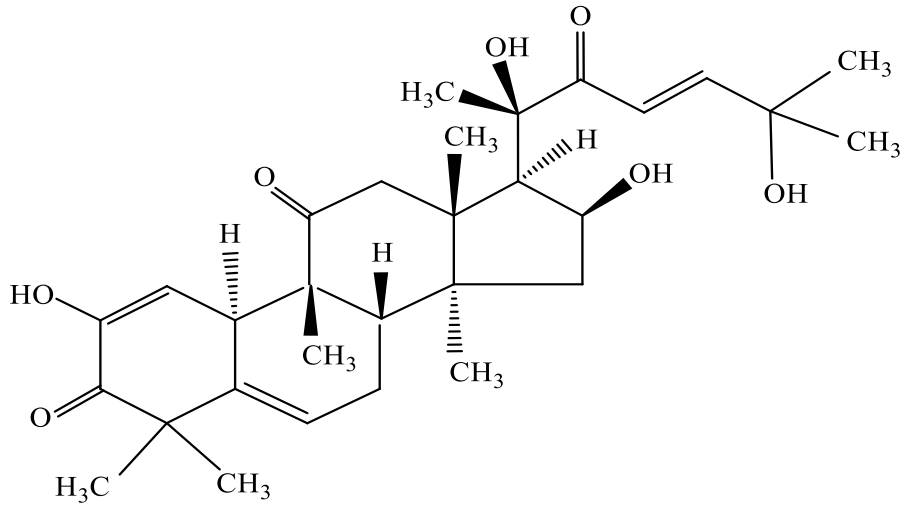
Kukurbitasinlerden en bol olanı ve *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar için en yaygın olarak kullanılanı Kukurbitasin B'dir. Önemli bir anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-diyabetik ve düşük ilacı olarak geleneksel tedavi yönteminde uzun yıllardır kullanılmakta olan Kukurbitasin B, gelecek vaat eden bir anti-kanser ilaç adaydır, buna rağmen etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca sitotoksik etkisi ile gırtlak kanser hücreleri üzerinde inhibitör etkisi vardır (Rios vd., 2005; Chen vd., 2005; Liu vd., 2008a). Günümüzde pek çok araştırma Kukurbitasin B'nin kanser üzerindeki inhibe edici etkisine odaklanmaktadır. Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda Kukurbitasin B'nin hepatoma, lösemi, lenfoma, multiple myeloma, melanoma, glioblastoma, nazofarinks, meme, prostat, kolon, akciğer, pankreas ve serviks dahil olmak üzere *in vitro* insan kanser hücre hatlarında ve *in vivo* tümör ksenograft modellerinde kanserli hücre büyümesini inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Kukurbitasin B'nin tümör önleyici mekanizması çeşitli sinyal iletim

yolaklarını durdurmasının yanı sıra, hücre iskeletinin bozulması, hücre döngüsünün durması veya bozulması, apoptoz uyarımı ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli etkileri içerir (Gitter vd., 1961; Liu vd., 2008a; Lee vd., 2011; Duangmano vd., 2011).

Kukurbitasinler arasında, başlıca Kukurbitasin D, E ve I'nın antitümör aktiviteleri ve sitotoksik etkileri test edilmiştir. Kukurbitasin B, D, E ve I'nın insan karsinoması hücre hatlarına (HeLa) ve insan nasofarinks kanseri hücre hatlarına karşı kuvvetli sitotoksik aktivitesi bulunmaktadır. *Cucurbita andreana* meyvelerinden izole edilen Kukurbitasin B, D, E ve I'nın HTC-116 (kolon), MCF-7 (meme), NCI-H460 (akciğer) ve SF-268 (merkezi sinir sistemi(CNS)) kanser hücreleri üzerindeki çoğalmayı engelleyici etkileri için test edilmiştir. Kukurbitasin B 0,4 µM konsantrasyonda kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını %82 ve meme kanser hücrelerinin çoğalmasını %87 oranında azaltarak dört kanser hücre hattına karşı en aktiftir. Kukurbitasin B ayrıca 0,1 µM konsantrasyonda akciğer kanser hücrelerini %96 ve 0,05 µM'de CNS kanser hücrelerinin çoğalmasını %92 oranında azaltmıştır. (Jayaprakasam vd., 2003). Kukurbitasin B, D ve R olarak adlandırılan benzer bileşikler *Begonia heracleifolia*'dan izole edilmiştir ve insan nazofarenks kanseri (KB), hayvan embriyo fibroblastları (3T3) ve insan prostat kanseri (PC3) büyümesindeki engelleyici aktivitesi ispatlanmıştır (Frei vd., 1998).

2.2.4. Kukurbitasin D

Elatericin A, Elatericine A, Cucurbitacine (D), NSC308606, NSC 308606, NSC 521776, 3877-86-9 adlarıyla da bilinen Kukurbitasin D'nin molekül fomülü $C_{30}H_{44}O_7$ ve molekül ağırlığı 516,67'dir. Şekil 2.4'de kimyasal yapısı verilen Kukurbitasin D, yakın zamanda izole edilen bir triterpenoid kukurbitasindir. En çok bulunan kukurbitasinlerden biri olan Kukurbitasin D'nin ilk olarak farelerde göğüs ve karın boşluklarında sıvı birikmesi ve kan basıncında sürekli bir düşüş ile ilişkili kılcal geçirgenliği artırdığı rapor edilmiştir. Akciğer, kolon, göğüs, ağız içi ve prostat kanserleri gibi bir çok kanser hücre hattına karşı anti-proliferatif ve anti kanser etkilere sahip oldukları ve böylelikle tümörlerin çoğalmasını engellediği bir çok literatür çalışmalarında belirtilmiştir.

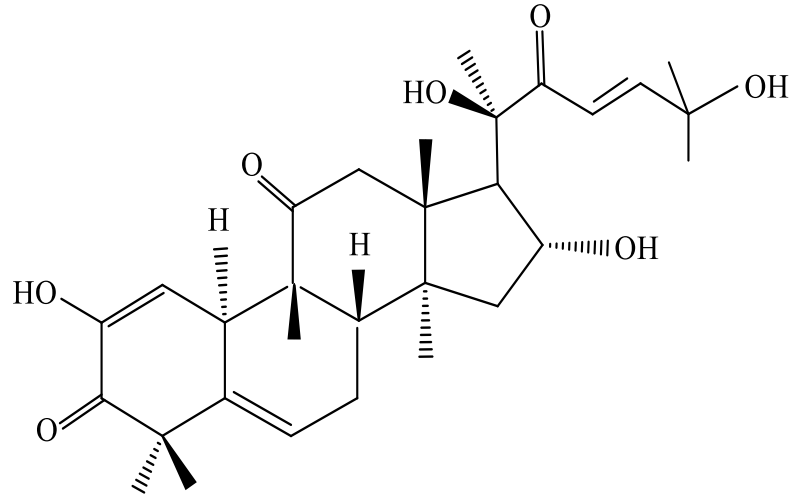


Şekil 2.4. Kukurbitasin D'nin kimyasal yapısı

Takahashi ve arkadaşları (Takahashi vd., 2009) *Trichosanthes kirillowii*'den izole ettikleri Kukurbitasin D'nin insan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde apoptozu indüklediğini *in vitro* olarak, Ding ve arkadaşları hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak proteasome aktivitesinin süpresyonuyla apoptozisi insan T-cell leukemia hücrelerine Kukurbitasin D uygulayarak göstermişlerdir. Ishii ve arkadaşları çalışmalarında Kukurbitasin D'nin endometriyal ve ovaryum kanser hücre hatlarına büyüme-inhibitör etkisi gösterdiği sonucuna varmışlar, bu bağlamda Kukurbitasin D'nin bu kanserler için yeni bir terapötik seçenek olabileceğini önermişlerdir. *Diabrotica undecimpunctata howardi* türü mısır kök kurdu üzerine öldürücü etkisi tespit edilmiştir (Barbercheck vd., 1996; Chen vd., 2005; Razavi vd., 2009; Takahashi vd., 2009; Liu vd., 2010; Ding vd., 2011; Ishii vd., 2013; Kim vd., 2013).

2.2.5. Kukurbitasin I

Elatericin B, Cucurbitacine (I), 1,2-Dehydroelatericin A, JSI 124 adlarıyla da bilinen Kukurbitasin I'nın molekül formülü $C_{30}H_{42}O_7$ ve molekül ağırlığı 514,65'dir. Şekil 2.5'de iki ve üç boyutlu kimyasal yapısı verilen Kukurbitasin I, birkaç bitki türünden izole edilmiş, toksik, doğal olarak oluşan bir tetrasiklik triterpenoid bileşiktir (Chen vd., 2005). Kukurbitasin I, DMSO ve etanol gibi organik çözücülerde yaklaşık olarak sırasıyla 5 ve 10 mg/ml çözünürlüğe sahiptirler. Sulu çözeltilerde eser miktarda çözünürler.



Şekil 2.5. Kukurbitasin I'nın kimyasal yapısı

Gliyoblastom ve adenokarsinom akciğer ve göğüs kanser hücreleri dahil olmak üzere bir çok insar kanserine karşı antitümör etkiye sahip doğal bileşikler ailesinin bir üyesidir (van Kester vd., 2008). Kukurbitasin I, insan göğüs kanseri, akciğer kanseri, nöroblastom ve fare melanoma hücre hatlarında fosfo-JAK2 ve fosfo-STAT-3'ün seçici iki yönlü inhibitörüdür. Bu inhibitör, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda anti-proliferatif ve anti-tümör aktivite göstermektedir (Ishtorj vd., 2011). Memeli hücrelerinde bir kaç farklı STAT eksprese olmasına rağmen Kukurbitasin I özellikle STAT-3'ü etkiler. JAK/STAT-3 yolağının hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkilediği gösterilmiştir. Bu etki, Kukurbitacin I'nın bir anti-kanser ilaç olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır (Blaskovich vd., 2003).

2.3. Kukurbitasinlerin Ekstraksiyonu, İzolasyonu, Saflaştırılması ve Tayini

Ekstraksiyon, katı veya sıvı karışımlardan bir maddeyi ayırmak ve istenmeyen safsızlıklardan kurtarmak için yapılan bir işlemdir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bir maddenin, çözeltisinden veya süspansiyonundan organik bir çözücü ile uzaklaştırılmasıdır. Karışmayan iki sıvıda çözünen bir maddenin bu iki fazdaki konsantrasyonları oranının belli bir sıcaklıkta sabit olması şeklinde tanımlanan dağılım kanunu temeline dayanmaktadır. Ekstraksiyon işleminde öncelikle ekstrakte edilecek etken maddenin kimyasal yapısına ve fiziksel özelliklerine uygun şartların sağlanması ve uygun çözücünün seçilmesi önemlidir. Ekstraksiyon işleminin en uygun şartlarda ve istenilen en yüksek verimle gerçekleştirilebilmesi parametrelerin doğru

şekilde seçilmesine bağlıdır. Bu parametrelerin en önemli olanları kısaca; sıcaklık, basınç, çözücü türü, süre ve karıştırma hızı olarak sayılabilir (Handa vd.,2008).

Ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesinden sonra, ekstraktın fraksiyonlanması, kromatografik metotlarla ayrılması ve saflaştırılması gibi işlemler gerekir (Erdik vd., 2007). Kromatografik ayırma sistemlerinde; ayrılması istenen maddeler ile reaksiyon vermeyen sabit faz ve hareketli faz seçilir. Ayrılacak maddenin özelliğine göre, öncelikle kullanılacak kromatografik yöntem (gaz, sıvı kromatografi gibi) belirlenir. Bu yönteme uygun sabit faz (normal faz, ters faz, silika jel, alümina vb.) ve hareketli faz seçilerek ayırım başlanabilir. İyi bir ayırım için, bu üç parametrenin -kromatografi türü, sabit faz ve hareketli faz- iyi seçilmiş olması gerekmektedir (Genç, 2009).

Kukurbitasinlerin ekstraksiyonu genellikle bitki materyalinden metanol veya etanol ile yapılmaktadır. Kukurbitasinlerin çözünürlüğü substitüsyon şekline bağlı olarak değişkendir. Serbest aglikonlar, diklorometanda kolaylıkla çözündüklerinden ekstraksiyonlarında çoğunlukla bu çözücü tercih edilmekte ayrıca bu çözücünün aseton, metanol veya etanolla karışımları da kullanılmaktadır. Daha yüksek polariteye sahip glikozitlerin ekstraksiyonu ise kloroform ve diklorometanda çözünmelerine rağmen metanol veya etil asetatla yapılmaktadır. Çözünürlüklerinin düşük olduğu su ve yüksek olduğu kloroform arasındaki kütle aktarımından dolayı alkolik ekstraktlardan kukurbitasinlerin kısmen saflaştırmada bu iki çözücü sıklıkla kullanılmaktadır. Chen ve arkadaşları, *Hemsleya endecaphylla* bitkisinin metanolik ekstraktının su ve kloroform fraksiyonlarını hazırlamış ve kloroform fraksiyonunu, çözücüyu uzaklaştırdıktan sonra silika jel kolon kromatografisinde kloroform-metanol (0:1, 30:1, 20:1) karışımları ile elüe etmişlerdir. Sonrasında kukurbitasinler, genellikle silika, alümina ve florosilin kullanıldığı açık-kolon kromatografisi veya ince tabaka kromatografisi (TLC) ile saflaştırılmıştır (Chen vd.,2001; Rios vd., 2005; Dinan,2008; El Sayed, 2012).

Kukurbitasinlerin izolasyonu ile ilgili US patentinde (Subbiah, 1999) aşağıda verilen işlemler sırasıyla uygulanarak ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi önerilmiştir. Kukurbitasin içeren bitki meyve suyuna sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve izolasyon işleminden önce bir dizi ön işlem uygulanır. Bu işlem, vidalı pres, döner pres tambur ve/veya çeşitli sıkma aparatları ile kompreslenerek kendi sıvısı çıkarılır. Bu işlemden önce bitki materyalleri kesilerek boyutları küçültülür.

Preslenen/kompreslenen materyal kükurbitasin ve diğér bileşikleri içermektedir. Sıvı kısım yanında gelen küçük katı partiküller süzölerek çözeltiden (sıvı; kükurbitasin içeren) uzaklaştırılır. Bu kükurbitasin içeren sıvı berraktır, temiz bir görünümü vardır. Dolayısıyla bu aşamada herhangi bir filtrasyona gerek duyulmaz. Fakat bazı istisnai durumlarda bu safhada filtrasyon işlemi gerekebilir.

Kükurbitasin içeren sıvı öncelikle polarite indeks değeri 2.0'dan büyük olmayan organik çözücüler (hegzan, petrol eteri, CCl₄ vb. veya bunların karışımları) ile ekstrakte edilir. Burada tercih edilen polarite indeks değeri 1.6 ve çözücü hegzandır. Bu işlem bir kere veya ortamda bulunan waks, pigment, yüksek kaynama noktalı terpenler, apolar yağ asitleri ve saflaştırma esnasında girişim yapabilecek sıvı türler uzaklaştırılınca kadar yapılır. Organik faz uzaklaştırılır, geriye kalan sıvı faz az çok polar çözücülerle ekstrakte edilir. 'Az çok polar çözücü' tabiri; polarite indeksi 2.0-5.0 (tercihen 4.5) olan organik çözücüler (kloroform, metilen klorür, etil asetat veya karışımları) ifade eder. Bu çözücüler biraz polar fakat su ile karışmayan türlerdir ve kükurbitasinler için yüksek affiniteye sahiptirler. Bu basamak da bir kez veya gerektiği kadar yapılır. Ekstraksiyondan sonra organik faz alınır. Devamında, süzme, solventle ardışık elüsyon veya ters akım ekstraksiyon işlemleri yapılabilir. Bundan sonra kükurbitasinler, evaporasyon, fraksiyonel distilasyon, kolon kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) metotlarının birisi veya birlikte kullanımıyla saflaştırılır. Silika jel kolon kromatografisi burada tercih edilir (Subbiah, 1999).

İnce tabaka kromatografisi (TLC), bitki ekstraktlarında kükurbitasin varlığını tayin etmede oldukça iyi bir yöntemdir (Halaweish, 1993; Dinan, 2001). Analitik HPLC, benzer yapıdaki kükurbitasinler arasında oldukça iyi bir ayırım sağlar (Halaweish, 1993). Kükurbitasinler polar veya orta polarlıkta bileşikler olduklarından HPLC ile tayin çalışmalarında; C₁₈ kolonlu sabit faz, mobil faz olarak asetonitril-su karışımının kullanıldığı ters faz sistemler ve 230 nm dalga boyunda UV dedeksiyon en uygundur. Kükurbitasinler arasında UV spektrumlarında belirgin farklılıklar olmasından dolayı maksimum absorpsiyon verdikleri dalga boyu değışiklik gösterir. Kükurbitasinlerin saflaştırılması çoğunlukla açık-kolon kromatografisinin kullanıldığı farklı kromatografik protokollerle yapılır (Rios vd., 2005).

Kükurbitasin içeren bitkilerin meyve sularından direk olarak kükurbitasinlerin izole edildiği çalışmalar az sayıdadır. Genellikle meyve suyunun buharlaştırılması suretiyle elde edilen kalıntı (kuru madde) elaterium olarak adlandırılır. Filtrelenen

meyve suyu düşük sıcaklıkta kurutulur. *Elaterium*'un adsorban olarak kiesegel G'nin çözücü sistemi olarak da kloroform:etanol (9:1) oranında kullanıldığı TLC'de yürütülmesi sonucunda sekiz leke tespit edilmiş ve bunlardan ikisinin Kukurbitasin D ve I olduğu saptanmıştır (Memişoğlu, 2005). Agıl ve arkadaşları, *elaterium*dan kolon kromatografisi kullanarak Kukurbitasin B'yi izole etmişlerdir (Agıl vd., 1999). Yeşilada ve arkadaşları liyofilize *E.elaterium* meyve suyundan HPLC ile Kukurbitasin B tayini yapmıştır (Yeşilada vd., 1995). El-Hacı ve arkadaşları *E.elaterium*'un metanol-su (70:30) karışımı ekstraktını çözücüyü uzaklaştırdıktan sonra etil asetatla ekstrakte edip organik fazı uzaklaştırdıktan sonra sulu fazı, bütül alkol ile ekstrakte etmişlerdir (El-Hacı vd., 2011).

Cucurbita pepo (kabak)'dan elde edilen kukurbitasin içeren sıvı öncelikle non-polar çözücü ile ekstrakte edilmiştir. Kukurbitasinleri izole etmek için silika jel kolon kromatografisi ve flaş kromatografisi kullanılmıştır. Elüsyon, kloroform ve aseton çözücüleri veya hacimce 95:5 oranında toluen-aseton, etil asetat-aseton veya kloroform-aseton çözücü sistemleri kullanılarak yapılmıştır. Böylelikle, Kukurbitasin B elde edilmiştir. Ayrıca, hacimce 95:5:5 oranında kloroform-aseton-metanol veya etil asetat-aseton-metanol çözücü sistemleri ile elüe edilerek Kukurbitasin D de elde edilmiştir. Son olarak da hacimce 80:5:15 oranında kloroform-aseton-metanol veya etil asetat-aseton-metanol çözücü sistemleri ile elüe edilerek Kukurbitasin E elde edilmiştir (Sabbiah, 1999; Çitoğlu vd., 2012) .

Kummalue ve arkadaşları, *Trichosanthes cucumerina* L. bitkisinin suyunu eterle karıştırarak kristal halinde çökelti elde etmişler ve bu çökeltiyi ters faz kolonda su-asetonitril (55:45) çözücü sistemi ile saflaştırdıktan sonra yaptıkları analizlerle bu kristalin karışımın temel bileşeninin Kukurbitasin B olduğunu belirlemişlerdir. Bu karışımın, akciğer kanser hücreleri (LK87 ve QG95), kolon kanser hücreleri (HCT-15 ve HT-29), böbrek kanser hücreleri (A498 ve NOR-P) pankreas kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkilerini araştırmışlardır. Bu karışımın doza bağımlı olarak bu hücrelerin çoğalmasına inhibe etkiğini belirtmişlerdir (Kummalue vd., 2009).

Kanchanapoom ve arkadaşları çalışmalarında, kurutulmuş meyvelere sıcak metanolla ekstraksiyon işlemi uygulandıktan sonra eterle yağları uzaklaştırmak için sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapmışlar ve sekiz farklı kukurbitasin türünü izole etmişlerdir. Elde ettikleri yağsız kalıntıyı yüksek poroziteye sahip divinil benzen ve stirenin kopolimerinin bulunduğu kolona yüklemişler ve sırasıyla su, metanol ve asetonla elüe

etmişlerdir. En son olarak da fraksiyonları RP-18 ve silika jel dolu kolon kromatografisine tabi tutmuşlardır (Kanchanapoom vd., 2002).

Rugero ve Mata, hava ile kurutarak toz haline getirdikleri *Hintonia latiflora*'nın kök kabuklarını hekzan ve sonrasında kloroformla ekstrakte ettikten sonra kloroformu uzaklaştırıp kalıntıyı silika jelle dolu kolona beslemişlerdir. Hekzan (%100 v/v), hekzan-artan miktarlarda etil asetat ve saf etil asetatla (%100 v/v) elüe ederek fraksiyonları toplayarak iki farklı kukurbitasin türünü izole etmişlerdir (Rugero vd., 1987).

Cayaponia angustiloba ve *Cayaponia racemosa*'nın meyveleri, *Gurania subumbellata*'nın kökleri kurutulmuş ve %95'lik etanolla ekstrakte edilmiş, çözücü tamamen uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı metanol-su (9:1) karışımı içerisinde çözülmüş ve hekzanla ekstrakte edilmiştir. Etil asetat fraksiyonunun silika dolu kolonda hekzan/etil asetat ve sonrasında artan polaritede etil asetat/metanol karışımları ile gradient elüsyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen fraksiyonlarda Kukurbitasin B, D, F ve iki kukurbitasin türevi tayin edilmiştir (Jacobs vd., 1990).

Halaweish ve Tallamy, dondurulmuş bitki örneklerini kloroformla homojenize ettikten sonra ekstraktaki kloroformu tamamen uzaklaştırıp metanol ve sonrasında metanol-su (8:2) karışımı ile katı-sıvı faz ekstraksiyonu yapmışlardır. Kloroformda çözdükleri örnekleri TLC ile metanolda çözdüklerini ise HPLC ile analiz etmişlerdir. Normal faz yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) ile sabit silika jel plaka ve mobil faz olarak toluen-etil asetat (25:75) çözücü sistemi, ters faz HPTLC ile ise C₁₈ plakalar ve metanol-su (7:3) çözücü sistemi kukurbitasinlerin analizinde uygulanmıştır. HPLC analizinde ise, mobil faz olarak iki çözücü sistemini (I-asetonitril-su 2:8; II-asetonitril-su 45:55) 2 ml/dk akış hızında kullanarak 229 nm dalga boyunda yapmışlardır. Bu şekilde aynı anda Kukurbitasin B, D, E, I, 3-epi-izo-kukurbitasin D ve iki glikoziti tayin etmişlerdir (Halaweish vd., 1993).

Fuller ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, hava ile kurutulup toz haline getirilen *Iberis amara*, *Gonystylus keithii* ve *Begonia plebeja* bitkileri diklorometan-metanol (1:1) ve metanolla ekstrakte edilmiştir. Sefadeks LH-20 kullanılarak kloroformda çözünen kısma jel geçirgen kromatografisi yapılmıştır. Bu bitkilerden elde edilen fraksiyonlarda Kukurbitasin B, D, E ve I varlığı tespit edilmiştir (Fuller vd., 1994).

İki farklı *Cucumis prophetarum* türünün kukurbitasinlerinin ayrıştırılması çalışmasında, örnekler öncelikle %95'lik etanol ile Soxhlet cihazında ekstrakte edilmiştir. Etanol ekstraktının daha sonra eterle karıştırılmasıyla elde edilen beyaz çökelek eter-metanol (99:1) karışımında kristallendirilmiştir. Eter ekstraktı silika jel (100-200 mesh) kolonuna yüklenmiş ve petrol eteri, kloroform ve metanolun çeşitli karışımları ile fraksiyonlandırılmıştır. Bu fraksiyonlarda kukurbitasin tayini toluen-etil asetatın (3:1) mobil faz olarak kullanıldığı TLC ile yapılmıştır. Daha sonra HPLC ile saflaştırılmıştır (Afifi vd., 1999).

Sturm ve arkadaşları, HPLC-kütle spektroskopisi (HPLC-MS)'ni, tıbbi bitkilerde kukurbitasin analizi için kullanmıştır. Soxhletde elde edilen metanolik ham ekstrakt Sefadeks LH-20 dolu kolonda metanolle elüe edilerek kukurbitasin içeren fraksiyonların HPLC-MS ile analizi yapılmıştır. Mobil faz % 0,01 trifluoroasetik asit (mobil faz A) ve asetonitril (mobil faz B) dir (Sturm vd., 2000).

Caponia tayuya'nın iki temel bileşenini ayırmak için Recio ve arkadaşları mobil faz olarak diklorometan ve sabit faz olarak Sefadeks LH-20 ile jel filtrasyon kromatografisi yapmışlardır (Recio vd., 2004).

Cucurbita adrena'dan kukurbitasinlerin ayrıştırılmasını Jayaprakasam ve arkadaşları, silika jel ve kloroform-aseton karışımını kullanarak orta basınçlı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirmişlerdir (Jayaprakasam vd., 2003).

Cucurbita texana'nın meyvelerinin metanol ile homojenize edilen kalıntısı flaş kromatografisinde gradient olarak elüe edilmiştir. Fraksiyonlar normal faz-TLC ile analiz edilmiştir. Ayrıca, bazı kukurbitasin glikozitleri de preperatif HPLC ile izole edilmiştir (Bartalis vd., 2005).

Trichosanthes kirilowii kökünün sulu ham ekstraktından Sefadeks G-25 kolun kromatografisi, Sep-Pak Plus C18 kartuş ve HPLC ardışık kullanılmasıyla aktif bileşen izole edilmiştir. Hızlı atom bombardımanı kütle spektrometrisi (FAB-MS) ile aktif bileşenlerin Kukurbitasin D ve dihidrokukurbitasin D olduğu tespit edilmiştir (Takahashi vd., 2009).

Sindhu ve arkadaşları, *Picrorhiza Kurroa* bitkisinin kurutulmuş toz örneklerin metanol ekstraktındaki kukurbitasinleri, kloroform-metanol (82:18) karışımı ile HPTLC'de, ayrıca gradient elüsyonla %1'lik asetik asit ve asetonitrilin mobil faz olarak kullanıldığı HPLC ile tayin etmişlerdir. Metanol uzaklaştırıldıktan sonraki kalıntıyı kloroformda çözerek silika jel (60-120 mesh) dolu kolona yükleyerek

kloroform-etil asetatla (70:30) elüe ederek kukurbitasini izole etmişlerdir (Sindhu vd., 2011).

Literatürde yer alan kukurbitasinlerin HPLC ile tayinine yönelik yapılan çalışmalardaki kromatografik koşullar (kolon türü, hareketli faz, akış hızı, dalga boyu ve uygulanan elüsyon türü) Tablo 2.3’de özet olarak sunulmuştur.

2.4. Kanser

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Normal bir hücrenin kaser hücresine dönüşebilmesi için çok sayıda genetik değişikliğin olması gereklidir. Bu değişimler sonucunda, kanser hücreleri kontrolsüz olarak çoğalma ve bölünmeyi sürdürerek çevre doku ve organları istila ederek (metastaz) tüm vücuda yayılırlar (Topal Sarıkaya, 2014).

Kontrolsüz çoğalma, esas özellik olmakla birlikte kanser hücresinin normal hücrelerden farklı diğer önemli biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir (Sırma, 2013). Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen baskılayıcı genler ve onkogenleri kodlayan bölgelerdeki mutasyonlar kanser gelişiminde kaçınılmazdır. Kanser hücreleri, hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duyduklarından bu hücrelerin çoğunda apoptoz görülmez, bu nedenle sağlıklı hücrelerden daha uzun yaşarlar (Duursma vd., 2003; Scholzova vd., 2007).

Kanser gelişimi, büyük bir çoğunlukla çevresel faktörlere, daha az olmak üzere de kalıtsal eğilime bağlıdır. Bunlardan hangisi olursa olsun, bir kanserin ortaya çıkmasında temel olay, hücrenin genetik unsurlarında oluşur. Bu nedenle kanser, genetik bir olaydır. Kanser oluşmasında birden fazla etken rol oynar. Kansere yol açan maddelere karsinogen denir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir süreç olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkmasını tetikleyebilir. Kansere neden olan başlıca etkenler; virüsler, toksik kimyasal maddeler, radyasyon, hormonlar, genetik ve ailesel özellikler, diyet faktörü, fiziksel yaralanma ve genel enfeksiyonlardır (Aksu, 2012; Topal Sarıkaya, 2014).

Tablo 2. 3. Kukurbitasinlerin HPLC ile analizine yönelik yapılan çalışmalar

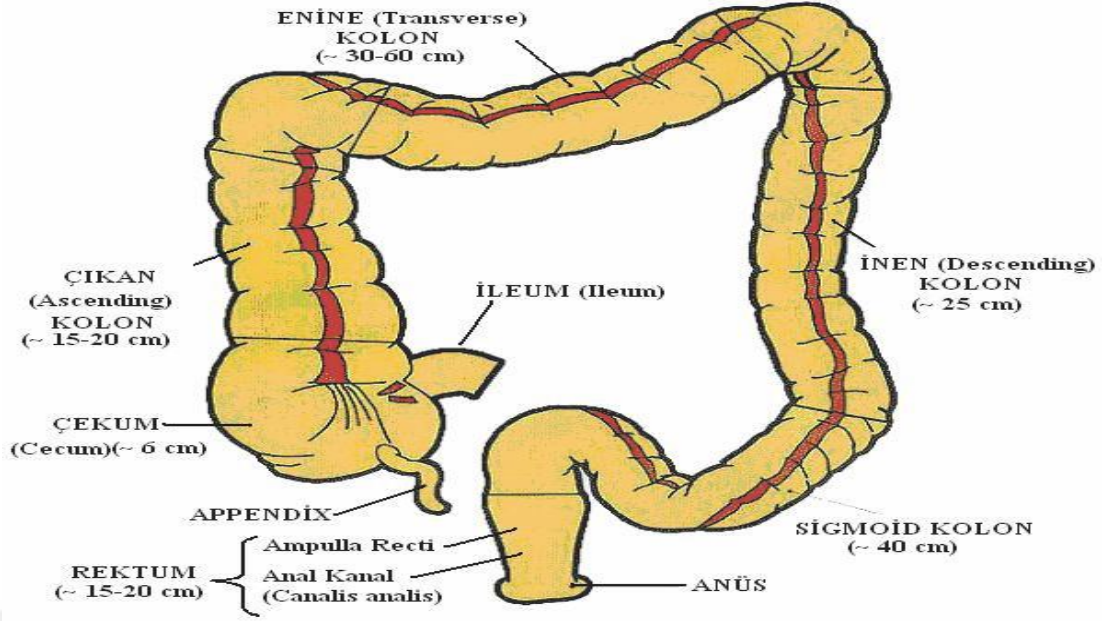
Kolon (Sabit Faz)	Hareketli Faz	Akış Hızı (ml/dk)	Elüsyon Türü ve Programı	Tayin Edilen Kukurbitasin Türü	Dalga Boyu (nm)	Kaynak
Hewlett Packard 20 cm x 4.6 mm i.d., 10 µm	A: Asetonitril-su (2:8) B: Asetonitril-su (45:55)	2	Gradient, başlangıçta % 100 A, 35. dk sonunda % 0 A	Kukurbitasin B, D, E, I, 3-epi-iso-kukurbitasin D ve iki glikozit	229	Halaweish vd., 1993
TSK Gel ODs 120A 150 x 4.6 mm	Asetonitril-su (2:3)	1	İzokratik	Kukurbitasin B	230	Sezik, 1997
Bio-Sil C18 HL 90-5S; 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm	A: Asetonitril, B: Su	2	Gradient; başlangıçta % 20 A, 35. dk sonunda % 45 A	Kukurbitasin E	229	Attard, 2002
(A) Preperatif; Econosil C18 250 X 22 mm, 10 µm (B) Analitik; Alltima C18 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm	(A) A: Asetonitril, B: Su veya A: Metanol, B: Su (B) A: Asetonitril, B: Su veya A: Metanol, B: Su	(A) 13 (B) 1	(A) Gradient; 50 dk da % 20-55 asetonitril veya 50 dk da % 60-75 metanol (B) 57 dk da % 30-70 asetonitril veya 50 dk da % 60-75 metanol	Kukurbitasinler		Bartalis vd., 2005
Kromasil C8 (150 mm x 4.6 mm ID, 5 microm)	Asetonitril - % 2 Asetik asit	1	Lineer	23, 24 -dihidrokokurbitasin F; 23, 24- dihidrokokurbitasin D; Kukurbitasin B; Kukurbitasin E		Feng vd., 2007
Eurospher C ₁₈ (250 mm x 4 mm i.d; 5 µm)	A: Asetonitril, B: Su	1	Gradient; 0-35. dk lineer olarak % A 20 dan % 60 B ye, 35-40 dk lineer olarak % 60 B den % 20 B ye	Kukurbitasin E; Kukurbitasin I; Kukurbitasin E glikozit; Kukurbitasin I glikozit	230	Kaya vd., 2008
(A) Analitik; Supelco®, 150 X 4.6 mm, 5 µm (B) Preperatif; Shimadzu®, ODS, PREP-ODS, 20 X 250 mm	(A) Asetonitril-Su (40:60) (B) Asetonitril-Su (42:58)	(A) 1.2 (B) 6	(A) İzokratik	Dihidrokokurbitasin B; Kukurbitasin B	230	Krepsky vd., 2009
LiChrospher 100 RP-18e (4 mm i.d.×250 mm, 5 µm) Kolon sıcaklığı 40 °C	% 0.05 Trifluoroasetik asit-metanol (42:58)	1	İzokratik	Kukurbitasin E; Kukurbitasin I; Kukurbitasin E glikozit; Kukurbitasin I glikozit	236	Wang vd., 2011
Analitik C18	A: Su, B: Asetonitril	1	Gradient; Başlangıçta % 100 A, sonra % 80 A, 10 dk. sonra % 60 A, 5 dk sonra % 40 A	Kukurbitasin E; Kukurbitasin I	229, 254	Saker vd., 2012

Tümörlerin türedikleri hücreye göre; karsinoma, sarkoma, lenfoma ve lösemi gibi birkaç temel çeşidi vardır. Karsinoma, epitel hücrelerden türevlenen malign tümörlerdir ve insan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. En yaygın görülen karsinoma türleri, meme, kolon, prostat ve akciğer kanseridir (Jemal vd., 2008; Topal Sarıkaya, 2014).

2.4.1. Kolon kanseri

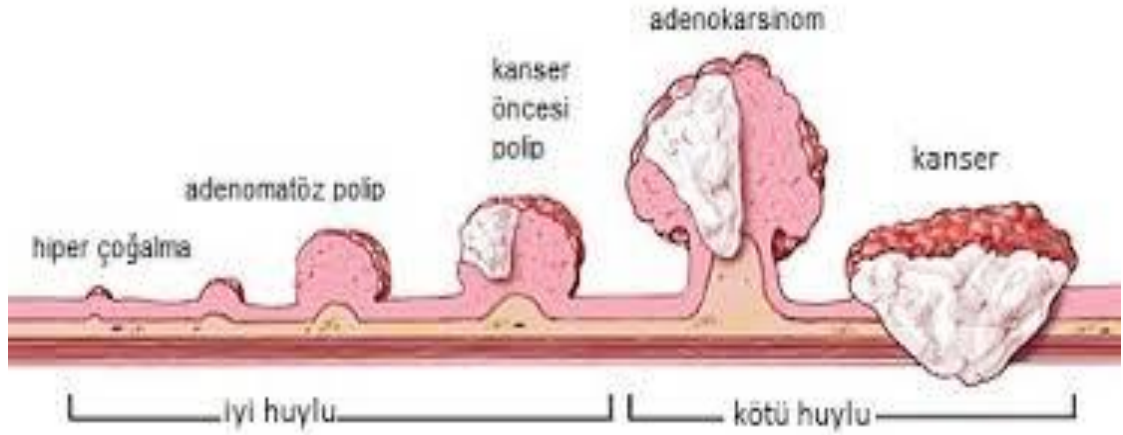
Kolon kanseri, bağırsak iç yüzeyini kaplayan epitel tabakayı oluşturan hücrelerin anormal büyümesi ile gelişen bir kanser türüdür (Yılmazlar vd., 2004). Uluslararası Kanser Ajansı 2012 yılı için yeni kanser tahminlerine göre; Dünya'da en çok tanı konulan kanserlerden akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) ile kolon kanseri üçüncü sırada yer almaktadır (Anonim, 2014a). Kolorektal kanser dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci, en fazla ölüme neden olan üçüncü kanser türüdür. Erkeklerde ise en sık görülen üçüncü, en fazla ölüme neden olan dördüncü kanserdir. Ülkemizde ise kolorektal kanser kadınlarda en sık görülen ikinci kanser, en fazla ölüme neden olan üçüncü kanser türüdür. Erkeklerde ise en sık görülen beşinci, en fazla ölüme neden olan dördüncü kanser türüdür (Anonim, 2014b; Kokkun, 2014). Dünyada, kolorektal karsinomlar için her yıl tahmin edilen yeni vaka sayısı 150.000'dir. Hayat boyunca kolorektal karsinom gelişme riski yaklaşık % 6'dır. Bu oran erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. Ortalama görülme yaşı ise 62 olup kanser gelişme riski 40 yaşından sonra erkek ve kadınlar için artmaktadır (Christine vd., 2005). Kolorektal kanserlerden ölüm bütün kanserlerdeki ölümlerin %10'unu oluşturmaktadır (Grenle vd., 2001).

Kalın bağırsağın en uzun bölümü Şekil 2.6'da görüldüğü gibi kolondur. Kolon yaklaşık 5 cm kalınlığında kaslı tüp yapısındadır (Durhan, 2006). Kolonun ilk parçası çekumdur, boy ve genişliği 6–8 cm olan keseleşmiş bir organdır. Çıkan kolon 15-20 cm'dir. Enine kolon (transverse) kalın bağırsağın en uzun parçasıdır (30-60 cm) bunu takip eden kısım inen kolondur ve 25 cm uzunluğundadır. Sigmoid kolon, kalın bağırsağın en dar kısmıdır ve rektuma açılır (Akpınar, 2006). Sigmoid kolondan sonraki 8-15 cm lik ekstrapéritoneal kolon kısmı ise rektum olarak isimlendirilir (Erden, 1991; Buğra, 2004).



Şekil 2.6. Kalın bağırsağın bölümleri

Kolon kanserlerin çoğu, polip denilen ve mukoz membranda anormal büyüme sonucu oluşan doku çıkıntısı ile oluşur. Normalde her gün milyonlarca kalın bağırsak hücresi görevini tamamlayıp ölür ve dışkı ile dışarı atılır. Bu hücrelerin yerine yeni hücreler yerleşir. Genetik veya çevresel faktörlerden dolayı bu hücrelerin yapılarında değişiklik olması sonucu hücrelerin normal yaşam sirkülasyonunda bozulma olur. Böylece yeni oluşan, büyüyüp gelişen ve çoğalan hücreler zamanı gelince ölmeleri gerekirken ölmezler ve anormal şekilli hücreler şeklinde çoğalmaya devam ederler. Bulundukları kalın bağırsak bölümünde küçük bir polip (hiperplastik ve adenomatöz polipler) olarak belirip büyürler. Daha sonra genetik değişiklikten dolayı oluşan kanser yapıcı genler sayesinde adenomatöz polipler bulundukları organı istila ederek kanser oluştururlar ve diğer başka organları da çeşitli yollarla istila ederler (Yılmazlar vd., 2004; Kokkun, 2014; Topal, 2014). Şekil 2.7’de iyi ve kötü huylu poliplerden kanserin gelişimi gösterilmektedir.



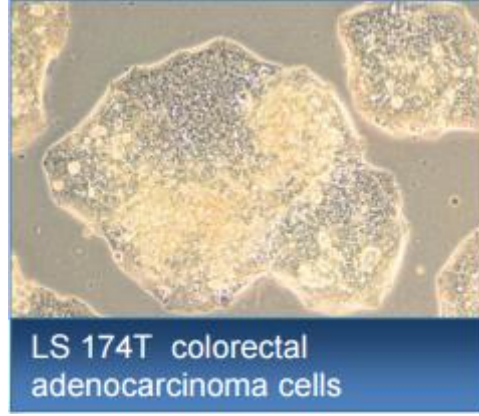
Şekil 2.7. Kalın bağırsakta polipten kanser gelişimi

Kolorektal kanserin semptomları, tümörün bağırsak içindeki lokasyonuna ve metastaz yaptığı organa bağlıdır. Klasik belirtileri arasında (50 yaşın üzerinde) ağırlaşan kabızlık, gaitada kan, gaita çapında azalma, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı ve kusma yer alır (Anonim, 2014c).

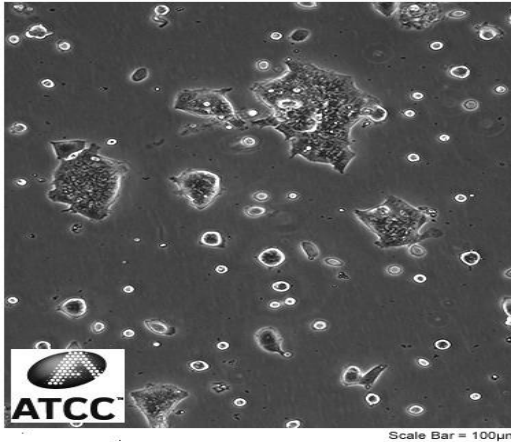
Diğer risk faktörleri içinde ilerleyen yaş, erkek cinsiyet, yüksek oranda yağ, alkol, kırmızı et tüketimi, obezite, sigara ve hareketsizlik yer alır. Ayrıca bu kanserin etyolojisinde genetik faktörler ve çeşitli inflamatuvar bağırsak hastalıkları (ülseratif kolit ve Crohn's hastalığı) gibi hastalıklar da rol oynamaktadır (Anonim, 2014c).

2.4.1.1. LS174T kolon kanseri hücre hattı

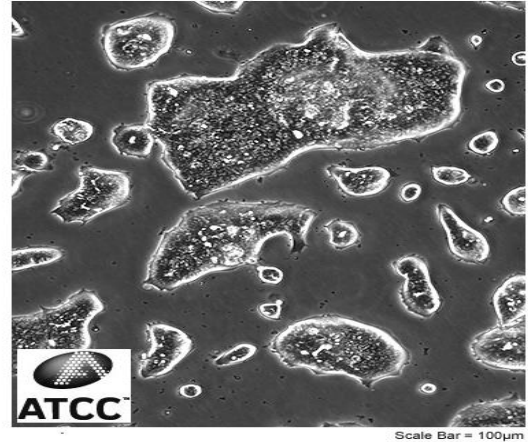
LS174T hücre hattı 58 yıl önce bulunmuş dişi insan kolon kanser hücreleridir. Epitel morfolojiye sahiptirler ve yapışık olarak çoğalırlar. Bu hücre hattı, kolonun bir Duke's tip adenokarsinom oluşulmuştur. Dokudan kıyıldıktan sonra herhangi bir şekilde transfer edilmeden 10 ay boyunca kültüre edilmiştir. Tümörijenik olan LS174T hücreleri, myc +, myb +, ras +, fos +, p53 +, sis -, abl -, ros - ve src - gibi çeşitli onkogenlerini içerirler. Bunlar p53 için negatif ama mRNA ifadesi için pozitifdir. Bu hat, c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, myb ve fos gibi çeşitli onkogenleri ifade eder. K-ras ve sis onkogen ekspresyonu tespit edilememiştir. LS174T hücrelerinin iki katına çıkma zamanları yaklaşık 22 saat olup Şekil 2.8'de çoğalma yoğunluğuna göre morfolojik görüntüleri görülmektedir (Anonim, 2014d-f).



ATCC Number: **CL-188**™
Designation: **LS 174T**



Düşük Yoğunluk

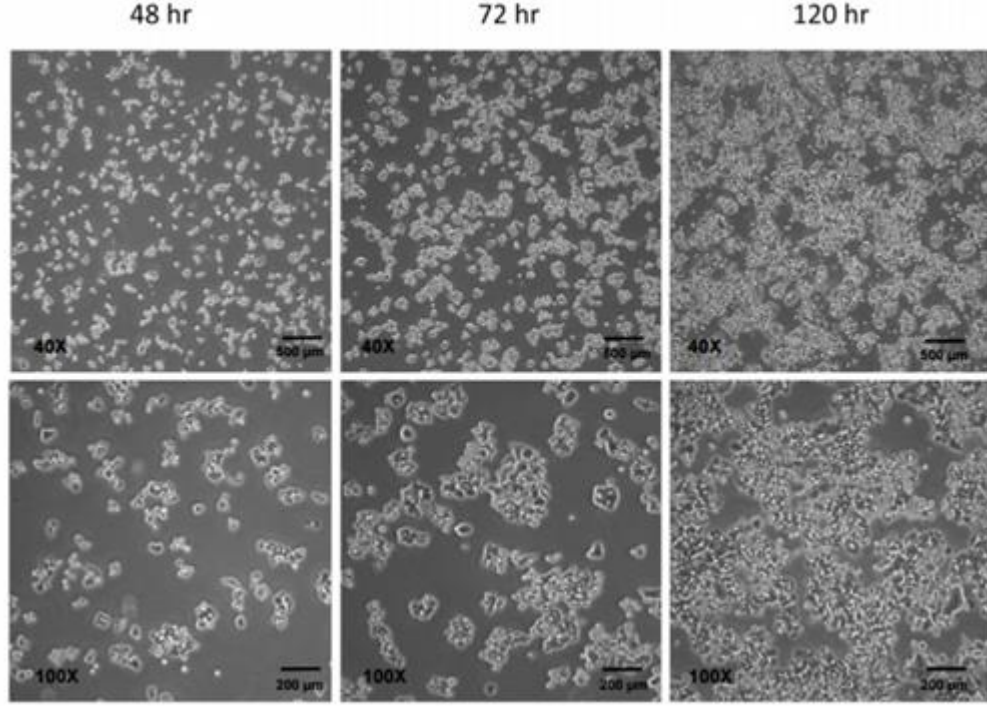


Yüksek Yoğunluk

Şekil 2.8. LS174T kolon kanseri hücrelerin morfolojik görüntüsü (Anonim, 2014f)

2.4.1.2. SW620 Kolon kanseri hücre hattı

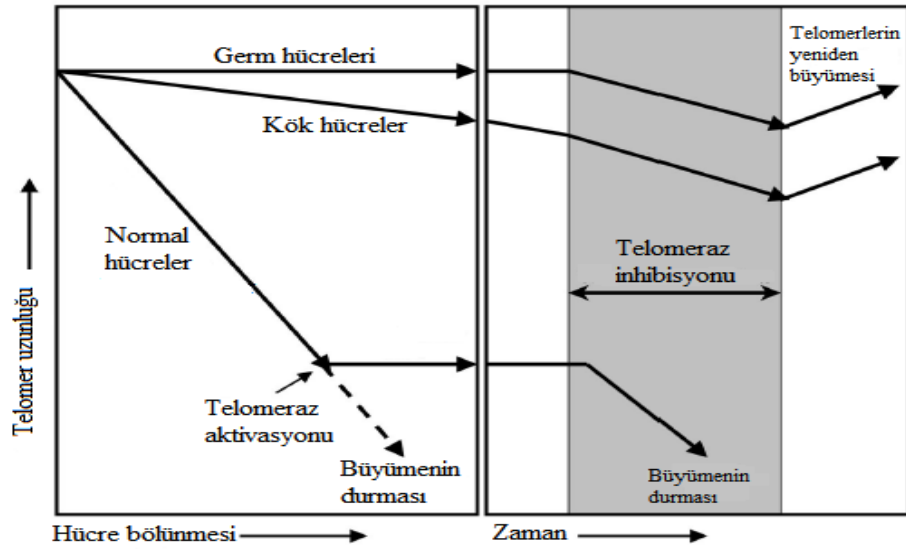
SW620 hücre hattı 51 yıl önce bulunmuş metastatik erkek insan kolon kanser hücreleridir. Epitel morfolojiye sahiptirler ve yapışık olarak çoğalırlar. Tümörijenik olan SW620 hücreleri, myc +, myb +, ras +, fos +, p53 +, sis -, abl -, ros - ve src - gibi çeşitli onkogenleri içerirler. Bu hücreler, immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitifler. Bu hücre hattı, SW480'in elde edildiği aynı tümörün metastazından türetilmiştir. Bu hat, c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis ve fos gibi çeşitli onkogenleri ifade eder. SW620 hücrelerinin iki katına çıkma zamanları yaklaşık 26 saat olup Şekil 2.9'da çoğalma yoğunluğuna göre morfolojik görüntüleri görülmektedir (Anonim, 2014g-h).



Şekil 2.9. SW620 kolon kanseri hücrelerin morfolojik görüntüsü (Anonim, 2014h)

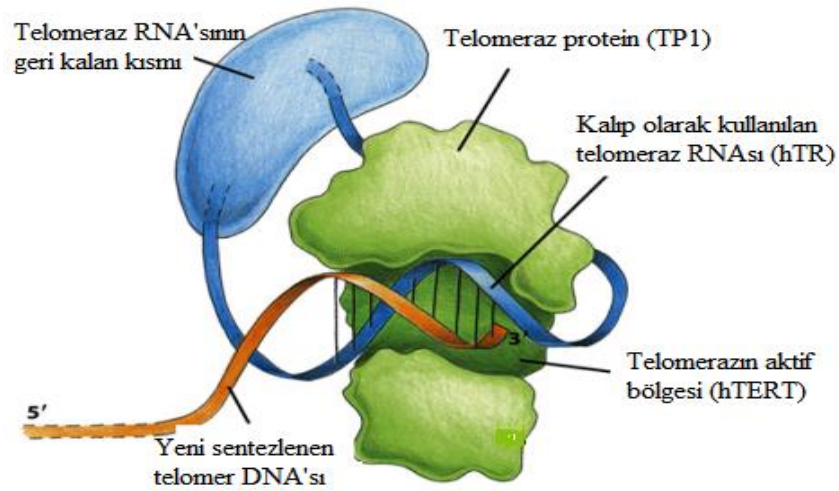
2.5. Telomeraz ve Kolon Kanseri

Telomeraz enzimi; kromozomal uçlardaki “TTAGGG”_n tekrarlarının sentezinden sorumlu olan ribonükleoprotein yapısında bir ters transkriptazdır. RNA içeren bir enzim olan telomeraz, kromozom ucundaki tek zincirli DNA’yı uzatır. İlk defa Tetrahymena’da Greider ve Blackburn tarafından keşfedildiği rapor edilmiştir. Daha sonra Morin tarafından insan HeLa hücrelerinde gösterilmiştir (Burger vd., 1997; Shay vd., 2001; Dikmen vd., 2003; Roig vd., 2009). Telomeraz enzimi sayesinde, her hücre bölünmesinde meydana gelen kısa ardışık DNA tekrar dizileri olan telomerlerin kaybı telafi edilerek hücrenin yaşam süresi uzatıldığı Şekil 2.10’da gösterilmiştir (Hahn, 2005; Bayramoğlu, 2006). Telomeraz aktivitesi, normal insan somatik hücrelerinde bastırılmışken germ hücreleri, hematopoietik, epidermal, intestinal hücreler ile bazı kök hücrelerde bu aktivitenin olduğu saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemlerinin geliştirilmesiyle telomeraz aktivitesinin kanserlerin %80-90’ında pozitif olduğu tespit edilmiştir. Kolon kanserinde de %90 gibi yüksek bir oranda telomeraz aktivitesi bulunmuştur (Kim vd., 1994; Engelhardt vd., 1997; Cong vd., 2002; Masutumi vd., 2003).



Şekil 2.10. Telomer uzunluğu ve çoğalma kapasitesi üzerine telomeraz inhibisyonunun etkisi

Telomeraz aktivitesi gösteren hücrelerin telomer uzunluklarını korundur ve böylece sınırsız büyüme özelliği kazanıp ölümsüz hale geçerler. Yani; telomerazın reaktivasyonu, hücrelerin sınırsız çoğalmasını sağlayan en önemli mekanizmalardan biridir (Blackburn, 2005). Telomeraz enziminin; RNA komponenti (hTR), ters transkriptaz aktivitesine sahip katalitik alt birim (hTERT) ve protein komponenti (TP1) olmak üzere üç komponenti vardır. Telomerazın diğer ters transkriptazlardan farkı kendi RNA alt birimini (hTR) telomerik DNA sentezinde kalıp olarak kullanması Şekil 2.11’de gösterilmiştir (Feng vd., 1995; Dikmen vd., 2003; Dikmen vd., 2006; Güzelgöl vd., 2010). Telomeraz temel proteini olan hTERT bir ters transkriptaz olup RNA’dan DNA sentezlenmesinde katalitik görev yapar.



Şekil 2.11. Telomeraz enziminin yapısı

Kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin bulunması ve telomeraz aktivitesinin kanserin ilerlemesine uygun bir şekilde artış göstermesi; bu enzimin kanser tanısı için diagnostik bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle hTERT'in normal hücrelerde baskılanmış iken ölümsüzlük kazanma sırasında yeniden aktive olması; telomeraz aktivitesiyle hTERT mRNA ekspresyonu arasında belirgin bir ilişki olduğu ve hTERT ekspresyonunun telomeraz aktivitesinin kontrolünde hız sınırlayıcı olduğu literatürde belirtilmektedir (Shay vd., 2001; Bayramoğlu, 2006; Yıldız vd., 2009). Daha önceki çalışmalarda araştırmacılar, tüm kolorektal tümör örneklerinde hTERT mRNA'nın ekspresse olduğunu göstermişlerdir (Saleh vd., 2008).

Telomeraz inhibisyonu, kanser tedavisinde yeni bir umut kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Gerçekten telomeraz inhibisyonunun insan kanser hücrelerinin çoğalmasını sınırladığını göstermesi kanser tedavisi için telomeraz inhibisyonunun potansiyel kullanımını desteklemektedir. hTERT ile ters transkriptazlar arasında yapısal ve mekanistik benzerlikler olması neticesinde, bilinen ters transkriptaz inhibitörlerinin insan telomerazını güçlü bir şekilde inhibe edebileceği hipotezi kurulmuştur (Hahn vd., 1999; Pascolo vd., 2002; Sidorov vd., 2003; Huang vd., 2005).

Boldrini ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, kolon kanseri gibi çeşitli epitel kanserlerde hTERT mRNA ekspresyonu ile telomeraz aktivitesi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir (Boldrini vd., 2002).

Resveratrolün kolon kanser hücrelerindeki telomeraz aktivitesi üzerine etkisini *in vitro* olarak araştıran Fuggetta ve arkadaşları, bu bileşiğin yüksek konsantrasyonlarda telomeraz aktivitesin down-regüle ettiğini bulmuşlardır (Fuggetta vd., 2006).

Kukurbitasin B'nin göğüs kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisinin araştırıldığı çalışmada, bu hücrelerde hem hTERT hem de c-Myc ekspresyonunu down-regüle ederek telomerazı inhibe ederek anti kanser etki gösterdiğini bulmuşlardır (Duanginano vd., 2010).

2.6. Hücre Çoğalmasının Modellenmesi ve Parametre Belirleme

Biyolojik ve kimyasal proseslerin performansı amprik yöntemlerle incelenmektedir. Fakat amprik yaklaşım prosesin tümünü açıklamada yetersiz kalır. Bu yetersizliği gidermek için modelleme yapılır. Modellemenin amacı, prosesin

tümünü kapsayarak gerçek performansını teorik bilgiler ışığında öngörmeye çalışmaktır. Model kurulurken prosesi etkileyen parametrelerin neler olacağı ve bu parametrelerin sayısal değerlerinin nasıl bulunacağını belirlemek gerekir. Böylelikle modelleme bize prosenin daha iyi anlaşılması konusunda yardımcı olur. Model kurulduktan sonra elde edilen eşitlik deneysel veriler kullanılarak test edilir. Deneysel veriler ile modelden elde edilen değerler arasında uyum sağlanıncaya kadar model iyileştirilir. Böylece model, deneysel verilerle karşılaştırılarak prosenin tasarım, optimizasyon ve kontrolü için kullanılır (Türker, 2005).

Hücre çoğalma kinetiği, kimyasal ve fiziksel koşulların hücre büyüme (çoğalma) hızına etkisini inceler. Bu etkileri tanımlamada ise matematiksel modeller kullanılır. Matematiksel modeller sistemleri kullanılarak kanser hücrelerinin gelişim seyri hesaplanabilir. Eldeki verilerle en doğru tahminler yapılabilir. Bir biyolojik sistemde, büyüme hızı; sabit, sürekli artan yada azalan veya değişken hızlarda ifade edilebilir. Modellerin çoğu doğrusal olmayan bir diferansiyel-cebirsal denklem takımından oluşur. Bu denklem takımlarının içerdiği parametreler ortamın şartlarına göre sabit olabilir. Ancak gerçek proses sistemlerinde parametreler değişken olarak kabul edilir ve çeşitli optimizasyon yöntemleriyle belirlenmeye çalışılır (Yüceer, 2005; Ratledge vd., 2006).

Hücreler *lag* fazından sonra büyüme fazına (*log fazı, logaritmik üreme safhası*) girerler. Hücreler iyice ortama adapte olduktan sonra logaritmik çoğalma safhasında hızla çoğalırlar. Hücre sayısı ve kütlesi zamanla üstel olarak artar. Besiyerindeki bileşiklerin derişimleri yüksek olduğundan üreme hızı derişimden bağımsızdır ve hücre derişimine göre birinci mertebededir. Çoğalma hızı, özgül çoğalma hızı (specific growth rate) ile karakterize edilir.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

t=0 da X=X₀

Burada X hücre derişimi (kg/m³), t zaman, μ özgül üreme hızı (h⁻¹) dır.

Denklem (2.1)'nin integrali alınırsa,

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad \text{veya} \quad X = X_0 * \exp(\mu t) \quad (2.2)$$

elde edilir. $\ln X$ e karşı t 'nin grafiğe geçirilmesiyle μ bulunur. Hücre konsantrasyonunun iki katına çıkması için gereken süre, bölünme süresi (doubling time) t_d kolaylıkla hesaplanabilir.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2.3)$$

Yavaşlama fazı, logaritmik çoğalma fazını izleyen safhadır. Bu fazdan sonra gelen durağan faz, hücre konsantrasyonunda bir değişiklik olmaması ve genellikle besiyerindeki besinlerin azalmasını, metabolik artık ürünlerin birikerek büyümeyi inhibe etmesini ve hücrelerin büyüme yüzeyini tamamen kaplamasını (%100 konfluentlik) ifade etmektedir. Bu fazda hücre ölüm oranı, büyüme oranına eşittir. Net üretim hızı sıfırdır. Son faz olan azalma fazı ise, hücre ölümünün bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Bu faz hücre canlılığının en düşük düzeyde olduğu kültür fazıdır. Ölçülen canlı hücre konsantrasyonu azalmaktadır. Ölme hızı matematiksel olarak birinci derecedendir (Bailey vd., 1986; Doyle vd., 1998; Schuler vd., 2002; Topal, 2004; Öztürk, 2006).

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X \quad \text{veya} \quad X = X_s e^{-k_d t} \quad (2.4)$$

Burada X_s ; durağan fazın sonundaki hücre derişimi, k_d ; birinci dereceden ölme sabiti. $\ln X$ 'e karşı t 'nin grafiğe geçirilmesiyle eğimden k_d bulunur.

Birim zaman içindeki hücre çoğalması büyüme eğrileri ile ifade edilir. Büyüme eğrileri çeşitli modeller kullanılarak yapılır. Büyüme eğrilerinin şekli hücrenin türüne ve incelenen özelliğe göre değişiklik gösterir. Sigmoidal şeklinde olan büyüme eğrileri (lojistik, Verhulst, Gompertz gibi) biyolojik anlamları olan (μ_m gibi) parametreler yerine matematiksel parametreler içerirler. Eğer bu parametrelerin biyolojik karşılıkları yoksa başlangıç değerlerini tahmin etmek güçtür. Bulunan matematiksel

parametreler kullanılarak biyolojik parametreler hesaplanabilir (Zwietering vd., 1990, Magni vd., 2006). Norton (1998), insan göğüs kanser hücrelerinin büyümesinin Gompertzian bir modele uyduğu gösterilmiştir (Norton vd., 1998).

$$N(t) = N(0) * \exp(k * [1 - \exp(-b * t)]) \quad (2.5)$$

$$k = \log_e \left[\frac{N(\infty)}{N(0)} \right]$$

Burada, $N(t)$; t zamanındaki hücre sayısı, $N(0)$; başlangıçtaki hücre sayısı, $N(\infty)$; maksimum hücre sayısı, k, b ; sabitler ve t zamandır.

Büyüme hızı hücrelerin yaşam süresi boyunca sabit değildir. Dolayısıyla, doğrusal modeller, hücrelerin çoğalmasını modellemek için yetersiz kalabilmektedir. Farklı büyüme hızlarının gerçekleştiği durumlarda doğrusal-olmayan modellerin kullanılması daha uygundur (Bilgin vd., 2003). Non-lineer denklemler Marquardt algoritmali doğrusal olmayan regresyonla büyüme verilerine uydurulabilir. Çoğu zaman eğri uydurma, eğri boyunca herhangi bir noktayı bulmada kullanılabilecek bir denklem elde etmek için yapılır. Bazı durumlarda ise elde edilen verilere daha uygun modeli bulmak için eğri uydurma yapılır ve model denklemi elde edilir.

Yapılan bir çalışmada, belli bir dozda uygulanan tedavi ile belli oranda kanserli hücre öldüğünü ortaya çıkarmışlardır. Fare kanser hücreleri katlanarak çoğalırken insan kanser hücreleri daha çok Gompertz modeli denen büyüme kinetiğine uygun büyürler. Sigmoidal olan Gompertz modelinde özgül büyüme hızı (μ) sıfırdan başlar maksimum bir değere (μ_m) ulaşır. Büyüme hızının yavaşlayarak tamamen durduğu noktada bir asimptot elde edilir (Norton, 1988; Anonim, 2015a).

Sistemi tanımlayan kinetik ifadeler için parametre belirleme yapılması kimyasal ve biyolojik sistemlerin kontrolü, optimizasyonu ve tasarımı için gereklidir. Parametre belirlemede amaç modelden elde edilen değerler ile deneysel veriler arasındaki farkın minimize edilmesidir. İlk olarak parametreler için uygun başlangıç değerleri verilir. Bu başlangıç değerlerinden yararlanılarak model verilen zaman aralığında integre edilir ve ölçülen niceliklerin değeri bu aralıklar için hesaplanır (Yüceer, 2005).

Parametre sayısının belirlenmesinde uygulanan genel strateji, model sonuçları ile deneysel sonuçlar arasındaki farka göre elde edilen eşitliğin (amaç fonksiyonunun)

minimumuna indirilmesidir. Amaç fonksiyonu (J) olarak Eşitlik 2.6'da verilen tüm hal değişkenleri için tahmin ve deneysel veriler arasındaki hata farkının kareleri toplamı seçilmiştir.

$$J = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{ij} - x_{d,ij})^2 \quad (2.6)$$

Burada x: hesaplanan veriler, x_d ; deneysel veriler, n; toplam hal değişkeni sayısı ve m; toplam deney sayısıdır.

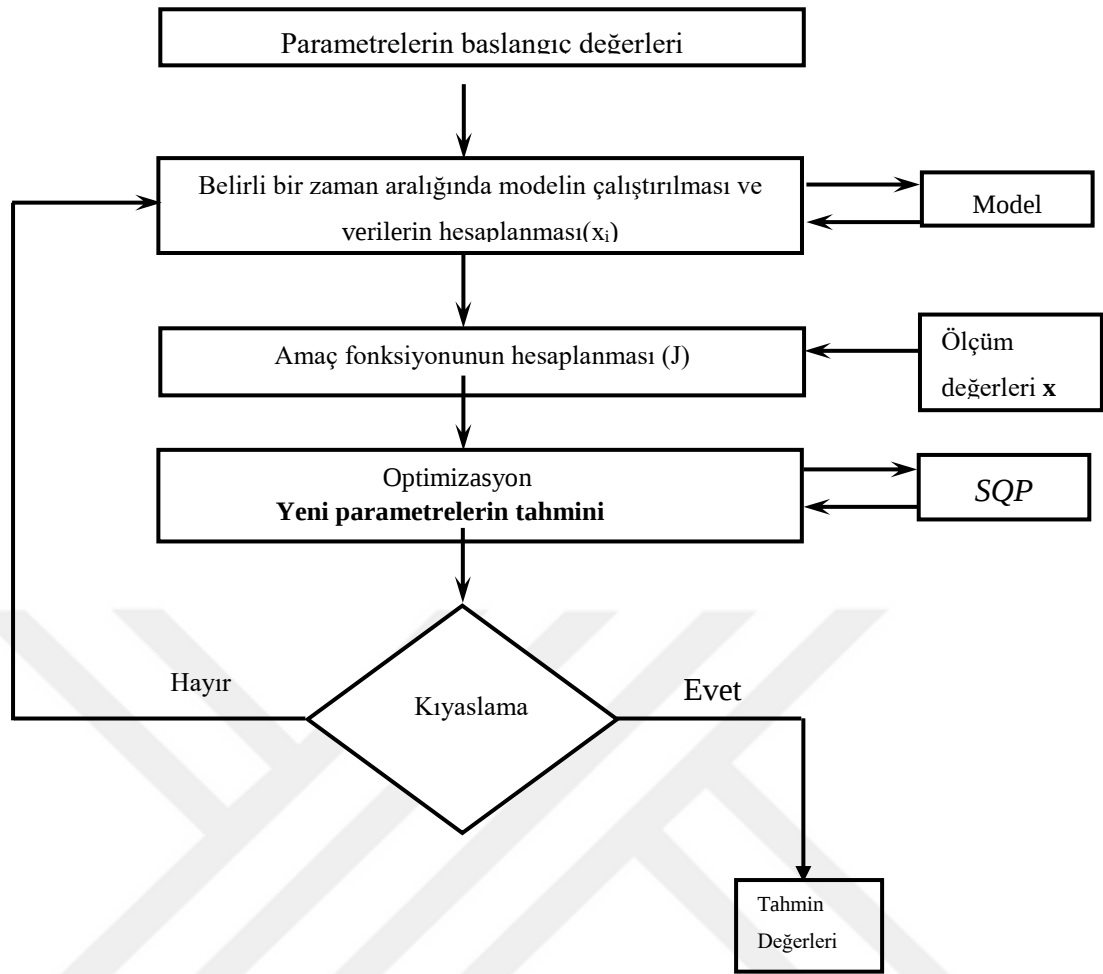
Seçilen optimizasyon algoritmasına göre amaç fonksiyonu minimize edilerek yeni parametreler hesaplanır.

2.6.1. Parametre tahmininde kullanılan optimizasyon yöntemleri

Oluşturulan modelde sınırlamaların mevcut olduğu durumlarda sınırlamalı optimizasyon yöntemi olan '*Sequential Quadratic Programming*' (SQP) kullanılmalıdır. Sınırlamasız problemler için Gauss-Newton veya Levenberg-Marquardt yöntemleri kullanılabilir. Amaç fonksiyonu, hata farklarının karelerinin toplamı, mutlak hata veya standardize edilmiş verilerden hesaplanan hata farklarının karelerinin toplamı olarak seçilebilir (Yüceer, 2005).

Parametre belirlemek için genel algoritma Şekil 2.12'de verilmiştir. Parametrelerin başlangıç değerleri kullanılarak her bir ölçüm aralığında modelin hal değişkenlerinin değerleri hesaplanır. Modelden elde edilen değerlerin deneysel değerlerle karşılaştırılmasında seçilen amaç fonksiyonu kullanılır. Optimizasyon algoritmasına göre amaç fonksiyonu minimize edilerek yeni parametreler hesaplanır. Amaç fonksiyonunun değişimine göre işlemler tekrar edilir. İstenen toleranslara ulaşıldığında optimizasyon işlemi sonlanır.

SQP yöntemi; her bir iterasyondaki yaklaşıma göre, Quasi-Newton güncelleme prosedürü kullanılarak Lagrangian fonksiyonunun Hessian' ı hesaplanır, bu değer QP alt problemin çözümünde kullanılır. Bulunan çözüm, '*Line search*' (doğrusal arama) prosedürüne göre tarama yönünün belirlenmesinde kullanılır. '*Line search*'; bir çok sınırlamalı ve sınırlamasız optimizasyon yöntemlerinde alt problemlerin çözümü için tarama yönünü belirlemede kullanılır. Minimum değer boyunca tarama yönü, interpolasyon ya da ekstrapolasyon içeren polinom yöntemleri (kuadratik, kubik gibi) prosedürü kullanılarak belirlenir (Yüceer, 2005).



Şekil 2.12. Parametre belirleme için algoritma (Yüceer, 2005)

MATLAB® programının optimizasyon paketinde, kısıtlı (sınırlandırılmış) çok değişkenli fonksiyonun optimumunu, doğrusal olmayan program mantığıyla bulan hazır bir *fmincon* fonksiyonu mevcuttur. *fmincon* algoritmasında doğrusal olmayan programlama yöntemlerinden en gelişmişisi olarak bilinen SQP yöntemi kullanılmaktadır (The Mathworks, 2009).

MATLAB® programındaki *fmincon*; lineer olmayan çok değişkenli bir fonksiyonda, bilinmeyen parametrelere belirli sınır şartları tanımlayarak, fonksiyonun minimum ya da maksimum değerinin çözümü için kullanılır. Bu yöntem ile parametre değerlerinin sınır şartlarına göre fonksiyonu maksimum/minimum yapan parametre değerleri bulunabilir. Aşağıda belirtildiği şekilde kullanılan *fmincon* komutunun parametrelerinin anlamları Tablo 2.4 'de verilmiştir (Anonim, 2015b).

$x = \text{fmincon}(\text{fun}, x_0, A, b)$
 $x = \text{fmincon}(\text{fun}, x_0, A, b, A_{eq}, b_{eq})$
 $x = \text{fmincon}(\text{fun}, x_0, A, b, A_{eq}, b_{eq}, lb, ub)$
 $x = \text{fmincon}(\text{fun}, x_0, A, b, A_{eq}, b_{eq}, lb, ub, \text{nonlcon})$
 $x = \text{fmincon}(\text{fun}, x_0, A, b, A_{eq}, b_{eq}, lb, ub, \text{nonlcon}, \text{options})$
 $x = \text{fmincon}(\text{problem})$
 $[x, fval] = \text{fmincon}(___)$
 $[x, fval, \text{exitflag}, \text{output}] = \text{fmincon}(___)$
 $[x, fval, \text{exitflag}, \text{output}, \text{lambda}, \text{grad}, \text{hessian}] = \text{fmincon}(___)$

fmincon fonksiyonu Tablo 2.4’de verilen komutlarla kullanılabilir.

Tablo 2.4. *fmincon* komutunun parametrelerinin anlamı

Parametre	Anlamı
Girdi Parametreleri	
Fun	Hedef fonksiyonu içeren m-dosyasının ismi
X0	Tasarım değişkenlerinin başlangıç değerleri
A,b	Lineer eşitsizlik kısıtlayıcı fonksiyonun katsayıları ($A \cdot x \leq b$)
Aeq, beq	Lineer eşitlik kısıtlayıcı fonksiyonun katsayıları ($A_{eq} \cdot x = b_{eq}$)
Ib	Değişkenlerin alt sınırı
Ub	Değişkenlerin üst sınırı
Nonlcon	Kısıtlayıcı fonksiyonları içeren fonksiyon
Options	Optimizasyon algoritmasını kontrol eden seçenekler
Çıktı Parametreleri	
X	Optimum tasarım değişkenlerinin atandığı vektör
Fval	Optimum noktada hedef fonksiyonun değeri
Output	Optimizasyon çözümü hakkında daha detaylı bilgi verir
Lambda	Lagrange çarpanlarının değerleri
Grad	Optimum noktada hedef fonksiyonun gradyanı
Hessian	Optimum noktada hessian matrisinin değerini verir

2.6.2. Model Performansı

Bir modelleme işleminin performansı, oluşturulan modelin temsil ettiği gerçek sistemle elde edilen değer ile modelden elde edilen değer arasındaki farkın (hata) esas alındığı farklı istatistiksel ölçütler kullanılarak belirlenmektedir. Yaygın olarak kullanılan ölçütler; Ortalama Kare Hata Karekökleri (Root Mean Square Error-RMSE), Ortalama Mutlak Hata (Mean Absolute Error - MAE), Ortalama Mutlak Yüzde Hata (Mean Absolute Percentage Error - MAPE) ve Korelasyon Katsayısı (R)'dir.

Ortalama Mutlak Hata (MAE)

MAE, ölçüm değerleri ile model tahminleri arasındaki mutlak hatayı ölçer. Modelin tahmin değeri, MAE değeri ne kadar sıfıra yaklaşırsa o kadar iyi olur. Formülü;

$$MAE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n |f_i - y_i| \quad (2.7)$$

(f_i ; tahmini değer, y_i ; gerçek değer, N; örnek sayısı)

Ortalama Mutlak Yüzde Hata (MAPE)

MAPE, tahmin hatalarını yüzde olarak ifade eder ve bu nedenle de tek başına bir anlamı vardır. MAPE değerleri; %10'un altında olan modeller "çok iyi", %10-%20 arasında olan modeller "iyi", %20 - %50 arasında olan modeller "kabul edilebilir" ve %50'nin üzerinde olan modeller ise "yanlış ve hatalı" olarak sınıflandırılmıştır. Formülü;

$$MAPE = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^n \left| \frac{f_i - y_i}{y_i} \right| \quad (2.8)$$

(f_i ; tahmini değer, y_i ; gerçek değer, N; örnek sayısı)

Ortalama Kare Hata Karekökleri (RMSE)

RMSE, ölçüm değerleri ile model tahminleri arasındaki hata oranını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. RMSE değerinin sıfıra yaklaşması modelin tahmin kabiliyetinin artması anlamına gelmektedir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f_i - y_i)^2}{N}} \quad (2.9)$$

(f_i ; tahmini değer, y_i ; gerçek değer, N ; örnek sayısı)

Korelasyon Katsayısı (R)

Değişkenler arasındaki ilişkinin düzeyi olan R 'nin, 0,90-1,00 olması durumunda çok yüksek, 0,70-0,89 olması durumunda yüksek, 0,50-0,69 olması durumunda orta, 0,26-0,49 olması durumunda zayıf, 0-0,25 arasında olması durumunda ilişki düzeyi çok zayıf şeklinde yorumlanabilmektedir (Lewis, 1982; Toprak, 2011; Erdal, 2015).

$$R = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x - \bar{x})^2)(\sum (y - \bar{y})^2)}} \quad (2.10)$$

(x , y ; değişkenler)

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

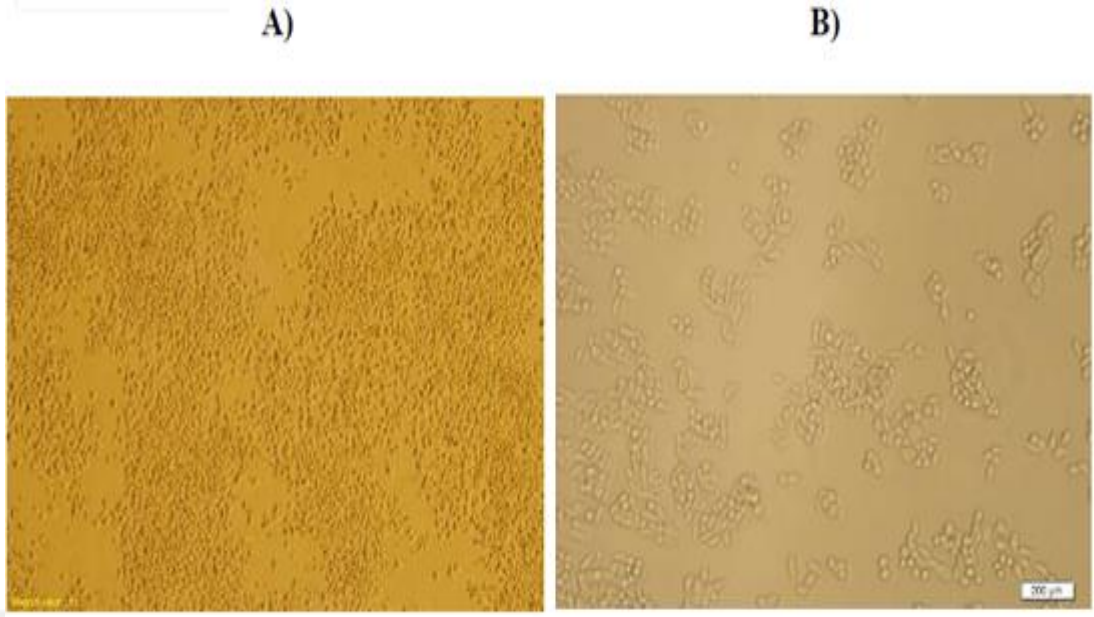
E.elaterium (acı kavun) bitkisinin Şekil 3.1’de görülen olgun meyveleri Adana’da Seyhan Nehri kenarında 2012 yılı Eylül ayı içerisinde yaş olarak toplandı. Deneysel çalışmalarda kullanılabilecek kadar güneş görmeyen ve klimayla soğutulan odada bekletildi.



Şekil 3.1. *E.elaterium* bitkisi ve meyveleri

3.1.2. LS174T ve SW620 hücre hatları

Çalışmada, Alman Kanseri Araştırma Merkezinden (DKFZ; German Cancer Research Center) ücretsiz olarak temin edilen LS174T ve SW620 insan kolon adenokarsinom hücreleri kullanıldı.



Şekil 3.2. LS174T (A) ve (B) SW620 hücreleri

3.1.3. Kullanılan cihaz ve yardımcı aletler

- HPLC (Schimadzu, Japonya)
- Nucleosil 100-5 C18; 250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm analitik kolon (Macherey-Nagel, Almanya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin Dondurucu -80 °C (Nüve, Türkiye)
- Elektroforez tankı
- Hassas terazi (Denver, APX-200, ABD)
- İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i, ABD)
- Işık mikroskobu (Olympus DP72, Japonya)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Mtops, Kore)
- Jel görüntüleme sistemi (UVP, *ChemIDoc-It²*, ABD)
- Laminer (Thermo Fischer Scientific, Herasafe KS, ABD)
- LightCycler 96 Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Mikropipetler, 0.1-2.5 µL, 0.5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1,000 µL (Eppendorf)
- Mikroplaka okuyucu (Biotek, ABD)
- MyCycler otomatik ısı döngü cihazı (Bio-Rad, ABD)
- Rotary Evaporatör (Buchi, R210, İsviçre)

- Saf su cihazı
- Santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop)
- Spin vorteks (Heidolph, Almanya)
- Su Banyosu (Beckmark MyBath, ABD)
- UV Kabin (Camag, Muttenez, İsviçre)
- Vakumlu fırın (Model EV 018, Nüve, Türkiye)
- Vakumlu pompa (Edwards, UK)

3.1.4. Kullanılan sarf malzemeler

- Cam kromatografi kolonu (400x20 ve 600x30 mm)
- Hücre dondurma ampülü (Greiner, Almanya)
- Hücre kültür flakları, 25 cm² ve 75 cm² (Sarstedt, ABD)
- Neubauer Hücre Sayım Lamı (Superior, Almanya)
- Pipet uçları (Eppendorf)
- Silica gel 60 F₂₅₄ 20x20 cm alüminyum TLC plakaları (Merck, Almanya)
- Steril falcon tüpler (15 ml ve 50 ml) (İsolab, Almanya)
- Süzgeç kağıdı (MN 640 W (Fast Filtration))

3.1.5. Kullanılan kimyasallar

- Agaroz (Sigma-Aldrich, Poole, UK)
- Aseton (Carlo Erba, İtalya)
- Asetonitril (HPLC Saflıkta, Carlo Erba, İtalya)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Etanol (HPLC Saflıkta, Merck, Almanya)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)
- Hekzan (Merck, Almanya)
- Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
- İnaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS Gold) (PAA, Almanya)
- İso-propanol (Merck, Almanya)
- Kloroform (Carlo Erba, İtalya)

- L-Glutamin (Lonza, İsviçre)
- Metanol (HPLC Saflıkta, Carlo Erba, İtalya)
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Penisilin/Streptomisin (PAN Biotech, Almanya)
- RPMI 1640 besiyer (Lonza, İsviçre)
- Silika jel (230-400 mesh) (Merck, Almanya)
- Silika jel (70 - 230 mesh) (Merck, Almanya)
- Standart Kukurbitasin D (CAS No: 3877-86-9, Purity (HPLC)≥%95, Extrasynthese, Fransa)
- Standart Kukurbitasin I (CAS No: 2222-07-3, Purity (HPLC)≥%95, Extrasynthese, Fransa)
- Tripsin-EDTA (Merck, Almanya)
- LST174T ve SW620 Hücre Hatları

3.1.6. Kullanılan kitler

- Fast Start Essential DNA Probes Master kiti (Lot No:10641900, Ref No: 06 402 682 001) (Roche, Almanya)
- High Pure RNA izolasyon kiti (Lot No:10327500 Ref No: 11 828 665 001) (Roche, Almanya)
- Hücre canlılığı kiti; MTT (3-(4,5-Dimethyl -2 thiazolyl)- 2,5 -diphenyl- 2H-tetrazolium) (Serva, Almanya)
- Real Time Ready Assay (Roche, Almanya)
- Transcriptor First strand cDNA Sentez kiti (Lot No:1076901, Ref No: 04 379 012 001) (Roche, Almanya)

3.2. Metod

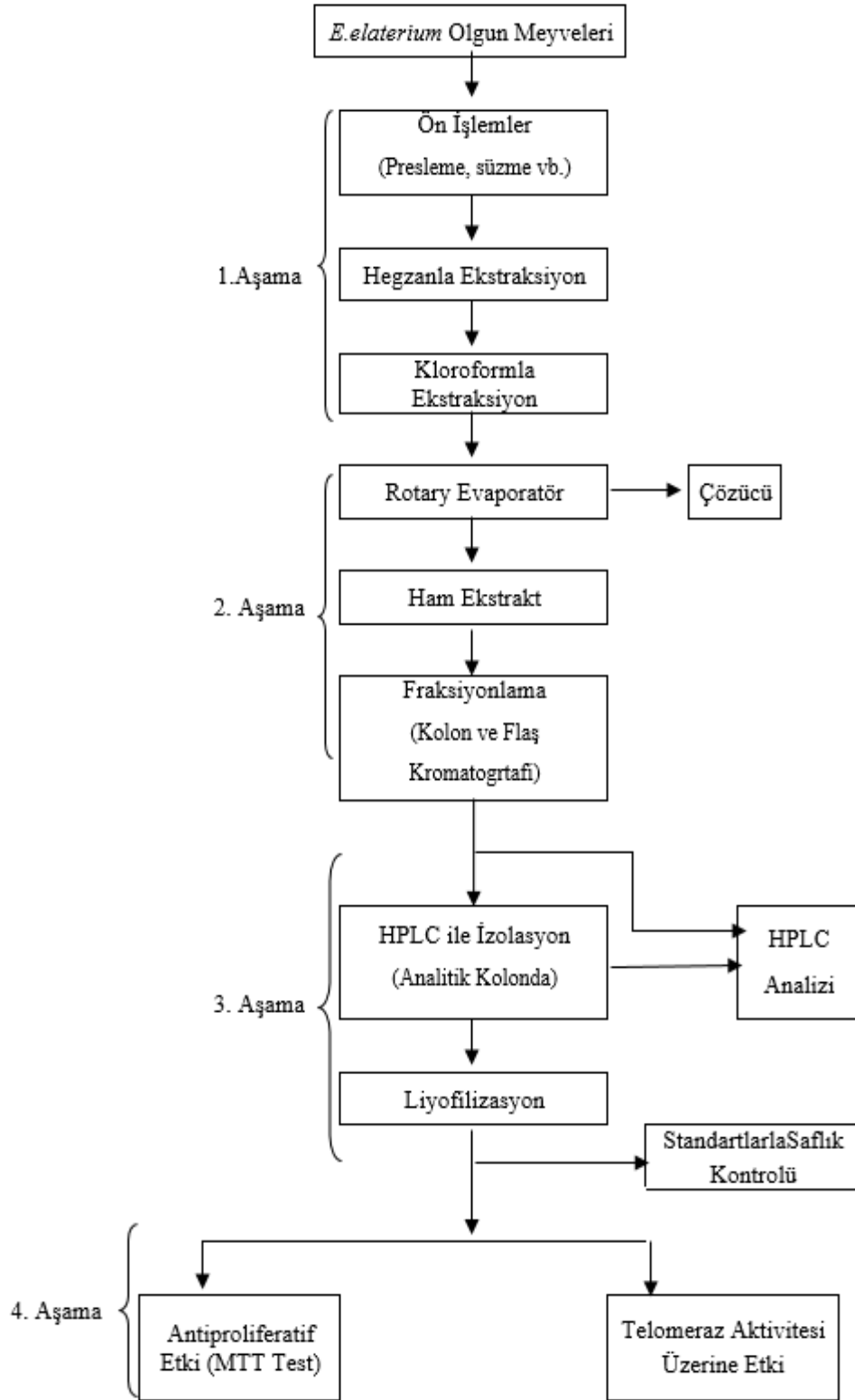
Deneysel alışmalar, 4 aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada, olgun *E.elaterium* meyvelerinin sıkılması, preslenmesi gibi ön işlemler uygulanarak meyve suyu elde edildi. Daha sonra meyve suyunun sırasıyla hekzan ve kloroform ile ekstraksiyonu gerçekleştirildi. İkinci aşamada, kloroform ekstraktları rotary evaporatörde n uzaklaştırılmasıyla konsantre hale getirildi. Ham ekstrakt daha sonra kolon ve flaş kromatografisi ile fraksiyonlara ayrıldı. Ü aşamada, öncelikle bu farksiyonlarda HPLC ile Kukurbitasin D ve I tayini yapıldı. Kukurbitasin D ve I'nın varlığı tespit edilen fraksiyonlardan bu maddelerin fraksiyon toplayıcısı bulunan HPLC ile ayrıştırılması ve saflaştırılması işlemleri yapıldı. Sonrasında HPLC fraksiyonları liyofilize edildi ve liyofilize edilen örnekleri yine HPLC cihazı ile saflık kontrolü yapıldı. Drd aşamada, saf bir şekilde elde edilen Kukurbitasin D ve I'nın hem LS174T ve SW620 kolon kanser hücrelerine MTT testi ile antiproliferatif etkisi hem de bu hücrelerdeki telomerez aktivitesine etkisi incelendi. Bu çalışmada uygulanan deney prosedürü şematik olarak şekil 3.3'de gösterilmiştir.

3.2.1. n işlemler ve ekstraktların hazırlanması

3.2.1.1. n işlemler

Klimalı odaya bırakılan olgun meyvelerin konuldukları kap içerisinde kendiliğinden suyunu bıraktığı görüldü. Bir hafta sonunda yaklaşık 2 L meyve suyu alındı. Meyve suyu kaptan alındıktan sonra meyveler aynı kap içerisinde tekrar beklemeye bırakıldı. İkinci haftanın sonunda 2 L meyve suyu daha kaptan alındı. Meyvelerden kalan suyu almak için bir pres tasarımı yapılarak yerel imkanlarla imalatı şekil 3.4'te görüldüğü gibi yapıldı. Bu pres ile meyvelerin kalan suyu çıkarıldı. Pres suyu ile beraber toplam 6 L meyve suyu elde edildi. Elde edilen meyve suları birleştirilerek daha sonra süzme ve ekstraksiyon işlemine tabi tutulmak üzere +2 ile +8 C sıcaklıkta tutulan buzdolabına yerleştirildi.

Meyve suları önce tek kat tlbent ile daha sonra iki kat tlbent ile süzme işlemine tabi tutuldu. Bunun akabinde şekil 3.5'de gösterilen vakum düzeneği yardımı ile önce kaba süzgeç kağıdı daha sonra daha sonra çift kat MN 640 W (Fast Filtration) süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemi yapıldı.



Şekil 3.3. Çalışmanın deneysel prosedürü



Şekil 3.4. *E.elaterium* meyvelerinin suyunu sıkma da kullanılan pres



Şekil 3.5. *E.elaterium* meyve suyunun vakum düzeneği ile süzülmesi

E.elaterium meyve suyundaki kukurbitasin türlerinin ekstraksiyon işleminde uygun çözücü ve/veya çözücü sisteminin seçilmesi zaman alacağından ve bu zaman zarfında sadece küçük bir hacimde numunelerle denemeler yapılacağından, meyve suyunun bozulma ihtimaline karşı mevcut imkânlar dahilinde meyve suyunun kurutularak saklanmasına karar verildi. Süzülen meyve suyu; her birinde 9 mL olacak şekilde petri kaplarına yerleştirildi. Meyve suyu doldurulan petri kapları Şekil 3.6(a)'da gösterilen vakumlu fırına yerleştirilerek 23 °C sıcaklık ve yaklaşık 0,1 bar basınç altında kurutuldu. Kurutma sonunda petri kaplarının dibinde oluşan kahverengi kalıntılar birleştirilerek ekstraksiyon işleminde kullanılmak üzere -18 ile -22 °C sıcaklıktaki derin dondurucuya bırakıldı. Şekil 3.6(b)'de 1 nolu şişede *E.elaterium* meyve suyu, 2 nolu şişede vakum fırında uzaklaştırılan sıvı gösterilmektedir. Petri kabında ise *E.elaterium* meyve suyu kalıntısı (kuru madde) görülmektedir.



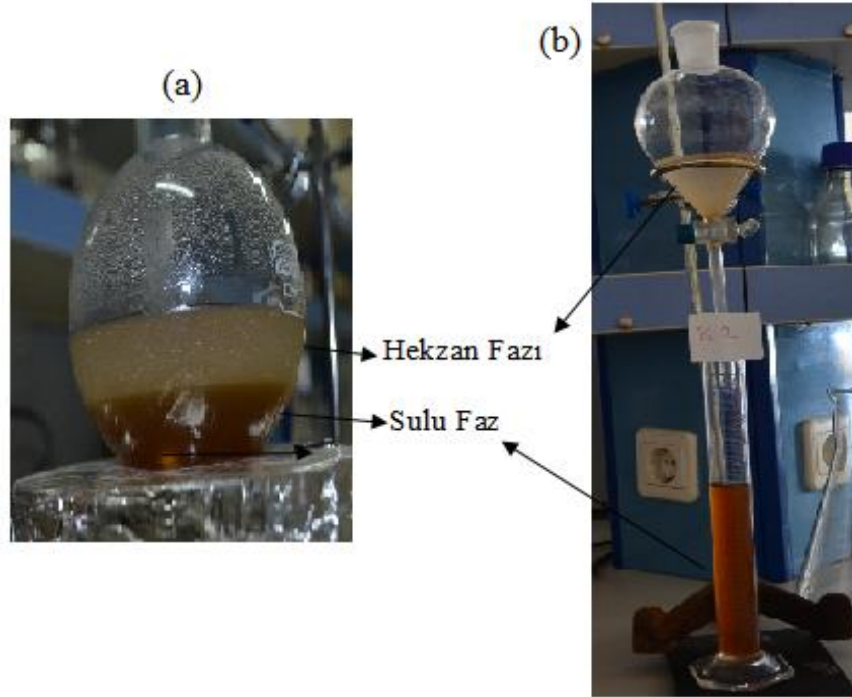
Şekil 3.6. (a) *E.elaterium* meyve suyunun kurutulduğu vakumlu fırın (b) kurutulan meyve suyu ve kalıntısı

Meyve suyu kalıntısından 5 g alınarak 100 mL saf suda çözüldü. Elde edilen sulu çözeltiden kukurbitasinlerin verimli bir şekilde izolasyon ve saflaştırılması için ekstraksiyon şartlarını belirlemek amacıyla çeşitli deney ve yöntemler uygulandı.

3.2.1.2. Hekzan ile ekstraksiyon ve ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi

E.elaterium meyve suyunun vakumlu fırında kurutulması ile oluşan kalıntının (kuru madde) saf suda çözülmesi sonucu elde edilen çözelti kukurbitasinlerin yanı sıra suda çözünebilen yağ asitleri, vaks, pigment ve yüksek kaynama noktalı terpenler gibi izolasyon ve saflaştırma işlemleri esnasında girişim yapabilecek türleri içermektedir. Bu maddeleri uzaklaştırmak için hekzan ile ekstraksiyon gerekir (Subbiah, 1999).

Hekzanla ekstraksiyon çalışmalarında ekstraksiyon süresi ve ardışık ekstraksiyon sayısı; Şekil 3.7.(a)'da cam balon içerisinde meyve suyu ile birlikte ve Şekil 3.7.(b)'de ise ayırma hunisi ile ayrılmış olarak görülen kirli beyaz kalıntı varlığına göre yapıldı. Kirli beyaz kalıntı; hekzan fazı olup hekzanda çözünen maddeler bu faza geçtiklerinde kirli beyaz bir görüntü oluşmaktadır. Bu faza geçecek madde bulunmadığında ise hekzan kendi renginde olmaktadır. Hekzanla ekstraksiyonun işleminin sonlandırılmasına, meyve suyu hekzan ara yüzeyinde çok çok az miktarda bu kirli beyaz kalıntının oluşması durumuna bakılarak karar verildi.



Şekil 3.7. *E.elaterium* meyve suyunun hekzanla ekstraksiyonu

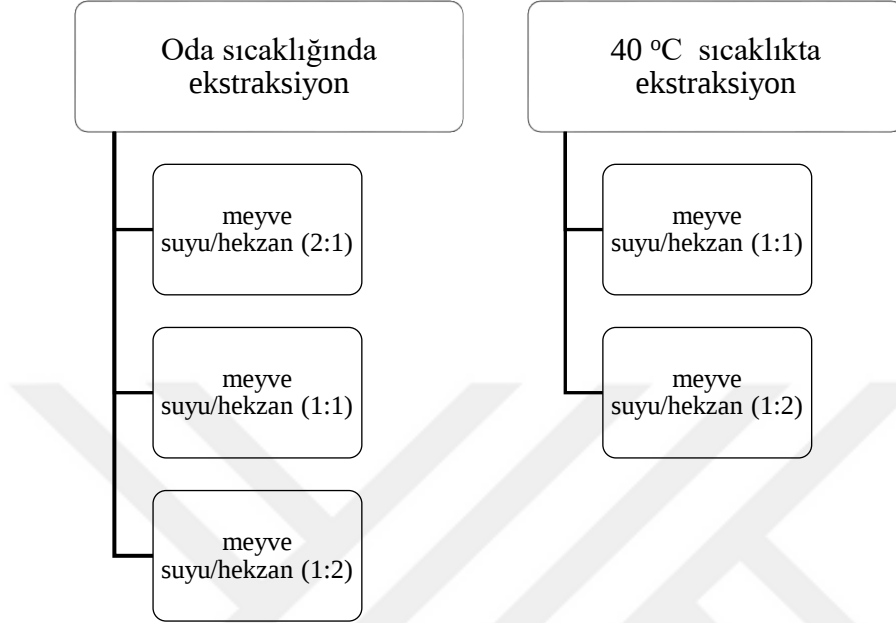
Ekstraksiyon şartlarını belirlemek için farklı sıcaklık (oda sıcaklığında ve 40 °C’de) ve meyve suyu/hekzan oranlarında ekstraksiyonlar yapıldı. Sıcaklık denemelerinde, ekstraksiyon süresince balonda hekzanın ısınmasıyla oluşan buharları, Şekil 3.8’de görüldüğü gibi cam balona bağlanan dikey geri soğutucuda yoğunlaştırılarak ekstraksiyon ortamına tekrar gönderildi.



Şekil 3.8. *E.elaterium* meyve suyunun 40 °C sıcaklıkta dikey geri soğutucu kullanılarak hekzanla ekstraksiyonu

Şekil 3.9’da özet olarak verilen bu deneysel çalışmalara göre; oda sıcaklığında meyve suyu/hekzan 1:1 oranında ekstraksiyonu, meyve suyu/hekzan 2:1 oranında ekstraksiyonuna nazaran daha az sayıda ekstraksiyon yapıldı. Yani ekstraksiyon sayısında azalma oldu. Daha sonra çözücü miktarının artırılmasıyla ekstraksiyon sayısının daha da azaltılabileceği düşünülerek meyve suyu/hekzan 1:2 oranında hem oda sıcaklığında hem de 40 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi yapıldı. Her iki ekstraksiyon çalışmasında da ekstraksiyon süresince bir zamandan sonra hekzan fazı içerisinde beyaz kalıntı miktarının artmadığı görüldüğünden ekstraksiyon işlemi sonlandırıldı. 1:2 oranında yapılan işlemlerde ekstraksiyonun zayıf yani fazlar arasında kütle transferinin çok az olduğu gözlemlendi. Ekstraksiyonun hangi sıcaklıkta ve kaç defa yapılacağı, ardışık ekstraksiyonlar sonunda hekzan fazındaki kirli beyaz kalıntı yoğunluğu göz önüne alınarak bu faza geçen madde miktarının çok az olduğu

yani fazlar arası kütle aktarımının düşük olduğu durum/an değerlendirilerek karar verildi. Buna göre; ekstraksiyon koşulları, 1:1 oranında meyve suyu/hekzan ile 40 °C’da ise üç defa ekstraksiyon yapılması şeklinde belirlendi.



Şekil 3.9. Farklı sıcaklıklardaki ekstraksiyon işlemlerinde meyve suyu/hekzan oranları

Ekstraksiyon süresi de deneysel çalışmalar esnasında her saatte hekzan fazındaki (organik faz) kirli beyaz kalıntı yoğunluğu gözlemlenerek belirlendi. Yapılan saatlik gözlemler sonucunda hem oda sıcaklığında hem de 40 °C’daki denemelerde yaklaşık altıncı saatin sonunda transfer olan/organik faza geçen madde miktarının sabit kaldığı gözlemlendi. Buna dayanarak her bir ekstraksiyon süresi altı saat olarak belirlendi.

Optimum koşulların belirlenmesinden sonra elde edilen tüm meyve suyu örnekleri bu koşullarda hekzan ile ekstrakte edildi. Her bir ekstraksiyon sonrası karışım, ayırma hunisine konularak organik ve sulu faz ayrı ayrı alındı. Organik faz uzaklaştırıldı, sulu faz bir sonraki ekstraksiyon işleminde kullanılabildiği kadar +2 ile +8 °C sıcaklıkta tutulan buzdolabında saklandı.

3.2.1.3. Kloroform ile ekstraksiyon ve ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi

E.elaterium meyve suyu örnekleri hekzan ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulduktan sonraki sulu faz kukurbitasinler için yüksek affiniteye sahip kloroform ile ekstrakte edildi. Optimum ekstraksiyon şartlarını belirlemek için bu aşamada da farklı

sıcaklık (oda sıcaklığında ve 40 °C'de) ve meyve suyu/kloroform oranlarında ekstraksiyonlar yapıldı. Sıcaklık denemelerinde ısınan kloroform dikey soğutucu kullanılmasına rağmen ekstraksiyon ortamından uzaklaştığı için bu işlemde vazgeçildi. Kloroformla ekstraksiyon için uygun koşulların belirlenmesine oda sıcaklığında farklı meyve suyu/kloroform oranları denenerek devam edildi. Bu denemelerde, ekstraksiyon süresi, ekstraksiyonun ardışık kaç defa yapılacağı ve meyve suyu/kloroform oranının belirlenmesinde kloroform fazında meydana gelen renk farklılaşmasına bakılarak karar verildi.

Kloroformla optimum ekstraksiyon koşulları aşağıdaki gibi belirlendi.

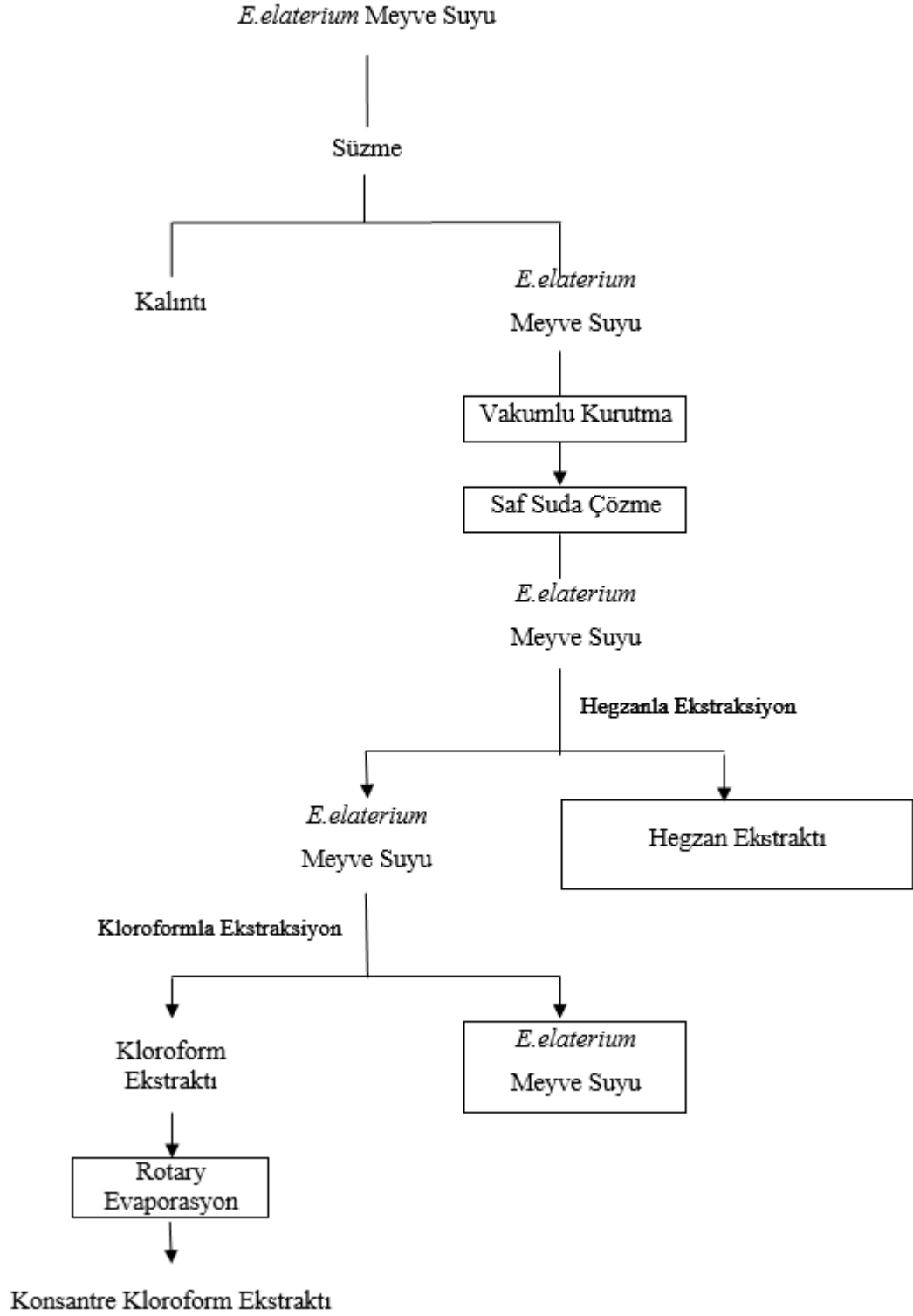
Ekstraksiyon sıcaklığı:	Oda sıcaklığı
Ekstraksiyon süresi:	6 Saat
Ekstraksiyon tekrarı	3 defa
Meyve Suyu/kloroform oranı	1:1

Bu koşullarda ardışık üç defa gerçekleştirilen kloroformla ekstraksiyon işlemi sonunda 300 mL kloroform ekstraktı elde edildi.

Daha sonra elde edilen kloroform ekstraktı 40 °C 'da vakum altında rotary evaportörde 10 mL hacme kadar konsantre hale getirildi. Çalışmamızın bu kısmına kadar yapılan işlemler Şekil 3.10'da verilmiştir.

3.2.2. Kukurbitasin D ve I'nın izolasyonu ve saflaştırılması

Kloroform ekstraktlarındaki kukurbitasinlerin izolasyonu ve saflaştırılması için aşağıda belirtilen deneysel çalışmalar yapıldı. Bunun için kolon kromatografisi işlemlerine geçmeden önce ekstrakttaki Kukurbitasin D ve I'nın en iyi şekilde ayrılması için uygun yürütücü fazın belirlenmesi için TLC kullanıldı. Bu ayırmada, Silica jel 60 F₂₅₄ 20x20 cm alüminyum plakları kullanıldı. Dokuz farklı çözücü sistemleri aşağıda belirtilen oranlarda hazırlandı.

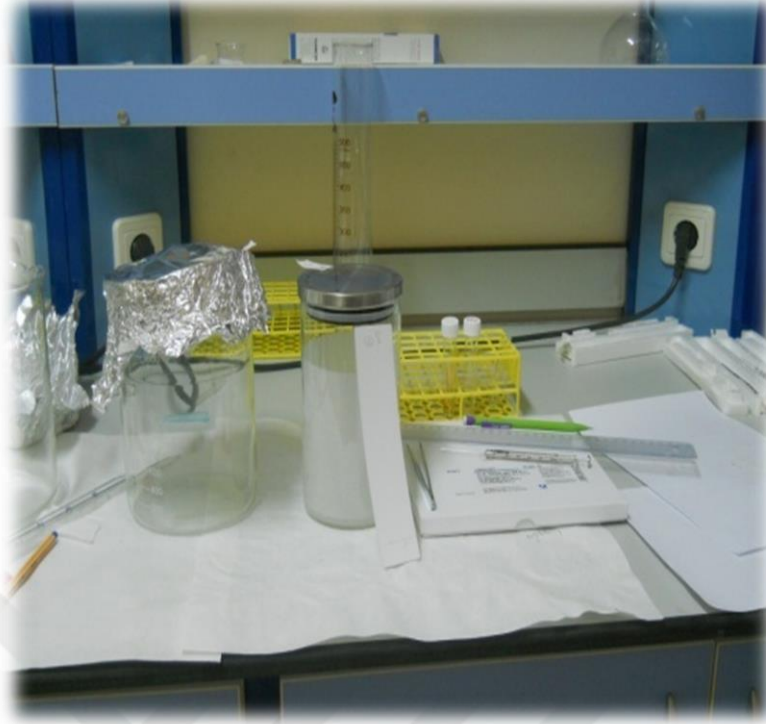


Şekil 3.10. *E. elaterium* meyve suyuna uygulanan ön işlemler ve ekstraksiyon işlemleri

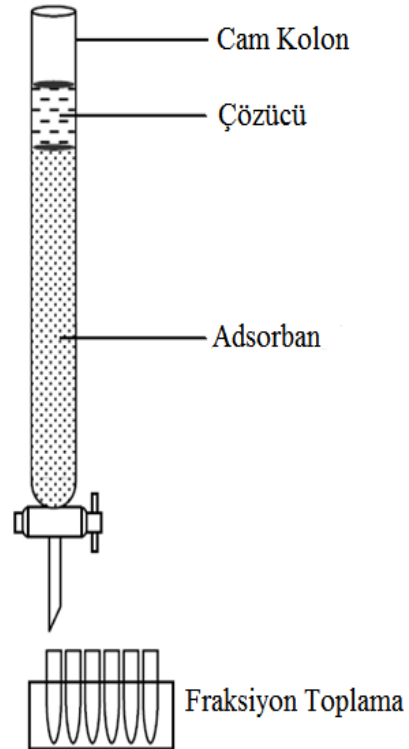
1. Kloroform : aseton: metanol	70 : 5 : 25 (v/v)
2. Etil asetat : aseton: metanol	75 : 5 : 20 (v/v)
3. Etil asetat : aseton: metanol	70 : 5 : 25 (v/v)
4. Kloroform : aseton: metanol	85 : 5 : 10 (v/v)
5. Kloroform : aseton: metanol	75 : 5 : 20 (v/v)
6. Kloroform : aseton: metanol	70 : 10 : 20 (v/v)
7. Kloroform : aseton: metanol	75 : 10 : 15 (v/v)
8. Kloroform : aseton: metanol	65 : 5 : 30 (v/v)
9. Kloroform : aseton: metanol	77 : 10 : 13 (v/v)

Hazırlanan çözücü sistemlerinden hangisinin daha iyi ayırma sağladığını belirlemek için, kükurbitasin standart çözeltileri hazırlandı. Daha sonra TLC plakalarına hem numune (kloroform ekstraktı) hem standart Kükurbitasin D ve I tatbik edildi ve Şekil 3.11’de görüldüğü gibi içinde çözücü sistemleri bulunan yürütme tanklarına konuldu ve ağızları alüminyum folyo ile kapatıldı. Her bir çözücü sistemi için aynı işlemler yapıldı. Kromatografik ayırım, çözücü sistemi belirli bir sınıra gelene kadar gerçekleştirildi. Çözücü belirli yürüme mesafesine ulaştıktan sonra plakalar beherlerden çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra tüm plakalara UV- ışık altında 254 nm de bakıldı ve plaka üzerindeki benekler belirlendi. Standart beneği ile aynı seviyede bulunan beneklerde herhangi bir kuyruklanma vb. olup olmadığı belirlendi. Bu beneklerin durumuna göre uygun çözücü sistemi seçimi yapıldı. Buna göre, ayırmanın en iyi olduğu çözücü sisteminin kloroform:aseton:metanol (77:10:13 (v/v)) karışımı olduğu belirlendi.

Ayırma işlemleri için 600x30 mm boyutlarında cam kolon seçildi. Silika jel (70-230 mesh) 55 g alınarak kloroformla ıslak yükleme metodu ile kolona dolduruldu. Rotary evaporatörde konsantre hale getirilen 10 mL kloroform ekstraktının 5 mL'si kolona tatbik edildi ve belirlenen çözücü sistemi (Kloroform:aseton:metanol; 77:10:13 (v/v)) 1 mL/dk hızla kolona verilerek fraksiyonlar toplandı. Çalışmalarda kullanılan kolon kromatografisi düzeneği ve bu işlemin şematik görünümü Şekil 3.12’de görülmektedir. Her bir fraksiyon 20 mL olmak üzere toplamda 17 fraksiyon toplandı. Toplanan bu fraksiyonların çözücü sistemi ile (kloroform:aseton:metanol; 77:10:13 (v/v)) TLC uygulamaları yapıldı. 9, 10 ve 11. fraksiyonlarda Kükurbitasin D ve I varlığı belirlendi.



Şekil 3.11. *E.elaterium* meyve suyunun kloroform ekstraktındaki Kukurbitasin D ve I'nın TLC ile tayini



Şekil 3.12. *E.elaterium* meyve suyunun kloroform ekstraktının kolon kromatografisinde fraksiyonlanması

Flaş kromatografi kolonu silika jel (230 - 400 mesh) dolduruldu. Kolona 5 ml numune enjekte edildi ve kloroform:aseton:metanol; 77:10:13 (v/v) çözücü sistemi 5 mL/dk hızla sisteme verildi. Şekil 3.13’de görülen cihaza ait UV spektrometre (254 nm dalga boyu) çalıştırılarak 42 fraksiyon toplandı (Şekil 3.13). Kolon ve flaş kromatografilerinde toplanan bu fraksiyonlar için kloroform:aseton:metanol; 77:10:13 (v/v) çözücü sistemi ile TLC uygulamaları yapıldı. 21-31 aralığındaki fraksiyonlarda Kukurbitasin D ve I varlığı belirlendi.

Kolon ve flaş kromatografilerinde TLC ile Kukurbitasin D ve I varlığı tespit edilen her bir fraksiyondaki çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kalıntı 2 mL etanol içerisinde çözülerek HPLC cihazına verilmek üzere +2/+8 °C’de saklandı.



Şekil 3.13. *E.elaterium* kloroform ekstraktının flaş kromatografisinde fraksiyonlanması

3.2.3. Standart çözeltilerinin hazırlanması

Kukurbitasin D standart çözeltileri;

Deneyssel çalışmada tayini yapılacak olan Kukurbitasin D 'nin ana stok çözeltisi 1267 mg/L olacak şekilde etil alkol içerisinde hazırlandı. Ana stok standart çözelti etil alkol ile seyreltilerek derişimleri 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L ve 25 mg/L olan

standart çözeltileri hazırlandı. Böylece ana stokdan farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin D kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.

Kukurbitasin I standart çözeltileri;

Deneysel çalışmada tayini yapılacak olan Kukurbitasin I 'nın ana stok çözeltisi 280 mg/L olacak şekilde etil alkol içerisinde hazırlandı. Ana stok standart çözelti etil alkol ile seyreltilerek derişimleri 110 mg/L, 55 mg/L, 11 mg/L ve 5,5 mg/L olan standart çözeltileri hazırlandı. Böylece ana stokdan farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I kalibrasyon çözeltileri hazırlandı.

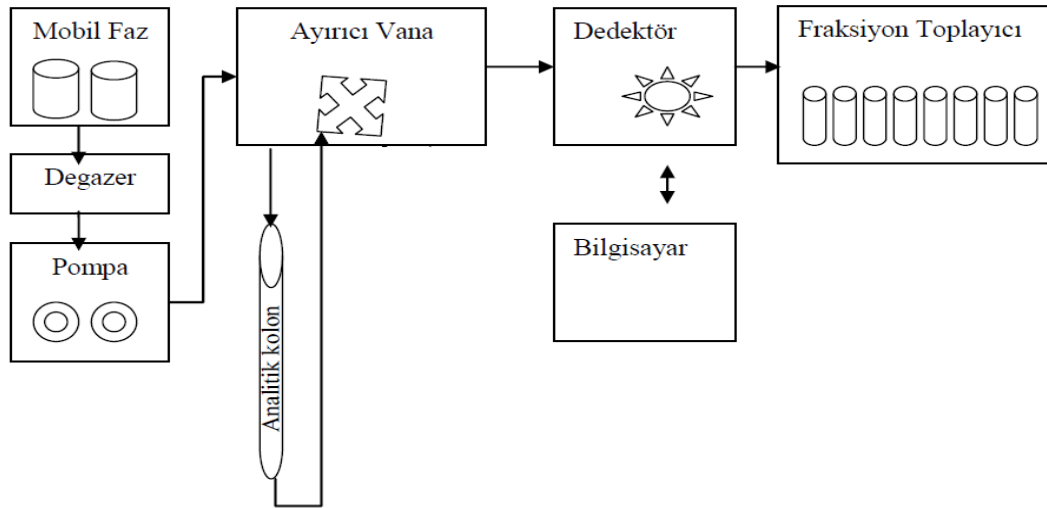
Tüm kukurbitasin standart stok çözeltileri cam saklama şişelerinde hazırlandı ve -20 °C'da muhafaza edildi.

3.2.4. HPLC yöntemi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), son teknolojik gelişmelerle birlikte kimyasal tayin ve saflaştırma yöntemi olarak en pratik ve uygulama alanı en geniş yöntemlerden birisidir. Şekil 3.14 ve 3.15'de hem fraksiyonlardaki kukurbitasinleri tespit etmede hem de bu fraksiyonlardaki kukurbitasin türlerini saf bir şekilde elde etmede kullandığımız HPLC sistemi ve sistemin şematik görünümü verilmiştir.



Şekil 3.14. Çalışmada kullanılan HPLC sisteminin görüntüsü



Şekil 3.15. Kullanılan HPLC sisteminin şematik görünümü

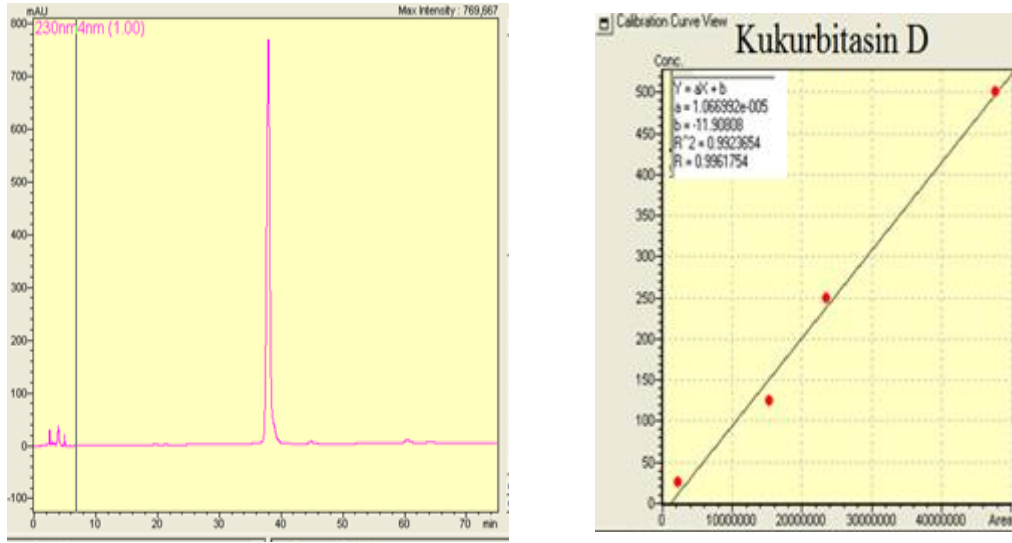
Bu çalışmada; farklı mobil faz sistemleri ve değişik akış hızları uygulanarak kukurbitasinlerin nicel/nitel analizinde kullanılacak en uygun kromatografik koşulların saptanması için yapılan seri deneysel çalışmalar yapıldı. Sonraki analiz işlemlerinde belirlenen kromatografik koşulların uygulanmasına karar verilen HPLC metodu ve kullanılan HPLC sistemine ait bilgiler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

HPLC analizleri için kullanılan çözücüler kullanım öncesi ultrasonik banyoda degaze edilip Millipore süzme sistemi ile 0,45 µm filtreden süzildükten sonra sisteme verildi. Aynı şekilde tüm örnekler ve standart maddeler de 0,45 µm filtreden süzülerek sisteme verildi.

Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması için hazırlanan standart çözeltiler, maksimum dalga boyu verdikleri sırasıyla 230 nm ve 235 nm dalga boylarında ve Tablo 3.1’deki kromatografik koşullarda 10 µl enjeksiyon hacminde üçer defa HPLC cihazına verildi. Şekil 3.16 ve 3.17’de analiz sonrası elde edilen pik alanlarının ortalaması alınarak herbir konsantrasyona (y-ekseni) karşılık gelen pik alanları ortalaması (x-ekseni) kullanılarak kalibrasyon eğrileri çizilip doğru denklemi ve R^2 değerleri Tablo 3.2 ve 3.3’de verilmiştir. $y=mx+n$ şeklindeki doğru dekleminde hareketle izole edilen Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I’nın miktarları (konsantrasyonları) hesaplandı.

Tablo 3.1. Kukurbitasinlerin tayin ve saflaştırılmasında kullanılan HPLC parametreleri

Shimadzu HPLC Sistemi	
Software	LCsolution
Cihaz Bileşenleri (Ekipmanları)	
Degazer	DGU-20A ₅
Pompa	LC-20AD
Otosampler	SIL-20A _{HT}
Kontrolör	CBM-20A
Fraksiyon Toplayıcı	FRC-10A
Kolon Fırını	CTO-20A
Dedektör	SPD-M20A
Kolon	C-18, 4,6 x 250 mm, 5 µm
Akış Hızı	0,75 mL/dk
Mobil Faz A	Asetonitril:Su (20:80; v/v)
Mobil Faz B	Asetonitril:Su (45:55; v/v)
Enjeksiyon Hacmi	20 µL (Tayin için)
	50 µL (Saflaştırma için)
Dalga Boyu	229 nm (Fraksiyon Toplayıcı)
	230 nm (Kukurbitasin D)
	235 nm (Kukurbitasin I)
Kolon Fırın Sıcaklığı	40 °C
Toplam Analiz Süresi	75 dakika
Gradyent Elüsyon Programı	
% Mobil Faz B	Zaman (Dakika)
10	0
100	60
100	70
10	75
Fraksiyon Toplayıcının Analiz Koşulları	
Genişlik (Width)	2 saniye
Eğim (Slope)	100 uV/saniye
Seviye (Level)	1000000 uV
Vial Hacmi	4,5 mL
Yanıt süresi (Response)	1 saniye



Şekil 3.16. 125 mg/L konsantrasyonundaki standart Kukurbitasin D kromatogramı ve oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Tablo 3.2. Kukurbitasin D 'ye ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri ile eğri denklemi, R, R² değerleri ve kalibrasyon aralığı

Konsantrasyon, mg/L (y-ekseni)	Pik alanı ortalaması, n= 3 (x-ekseni)
500	47758515
250	23522313
125	15268737
25	2263896

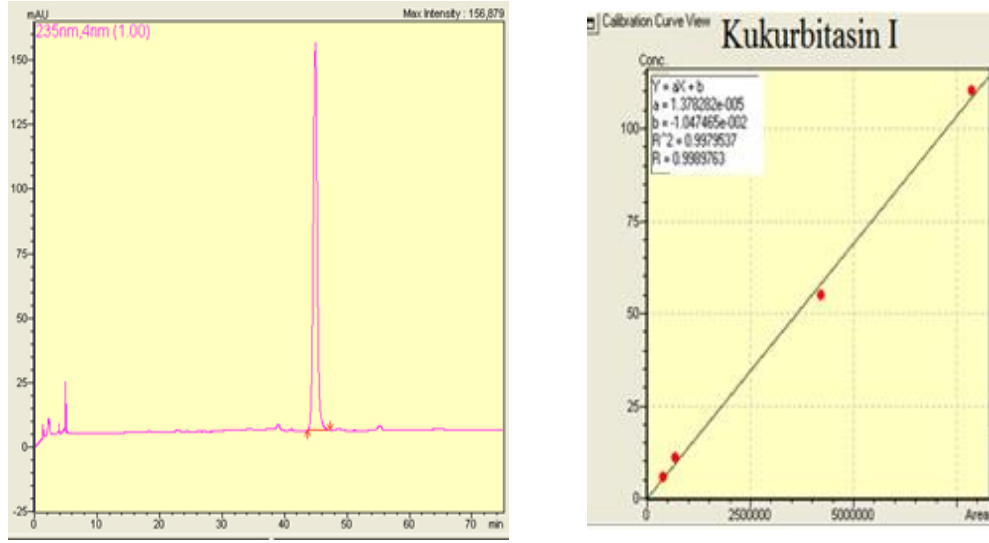
Eğri denklemi;

$$\text{Konsantrasyon} = 1,067 * [\text{Pik Alanı}] * 10^{-5} - 11,91$$

$$R = 0,9962$$

$$R^2 = 0,9924$$

Kalibrasyon aralığı; 25-500 mg/L



Şekil 3.17. 110 mg/L konsantrasyonundaki standart Kukurbitasin I kromatogramı ve oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Tablo 3.3. Kukurbitasin I 'ya ait konsantrasyon ve pik alanı ortalama değerleri ile eğri denklemi, R, R² değerleri ve kalibrasyon aralığı

Konsantrasyon, mg/L (y-ekseni)	Pik alanı ortalaması, n= 3 (x-ekseni)
110	7871188
55	4216135
11	684636
5,5	399650

Eğri denklemi;

$$\text{Konsantrasyon} = 1,378 * [\text{Pik Alanı}] * 10^{-5} - 0,0105$$

$$R = 0,9990$$

$$R^2 = 0,9980$$

Kalibrasyon aralığı; 5,5 - 110 mg/L

TLC ile kukurbitasin varlığı çalışmaları yapılan kolon ve flaş kromatografilerinden elde edilen tüm fraksiyonlar, Tablo 3.1'de belirtilen kromatografik koşullarda HPLC ile de analiz edildi. Bunun için öncelikle fraksiyonlardaki çözücü çeker ocak içinde ısıtıcı üzerinde uzaklaştırılarak kuru haldeki fraksiyonlar 5 mL etanolda çözüldü. Daha sonra 20 µL enjeksiyon hacminde HPLC cihazına verildi. HPLC ile analizi yapılan tüm fraksiyonların pikleri standart pikleri ile karşılaştırılarak alıkonma zamanlarına göre fraksiyonlardaki Kukurbitasin D ve I pikleri belirlendi.

3.2.4.1. Analitik HPLC fraksiyonlama sistemi ve saflık tayini

E.elaterium meyve suyunun kloroform ekstraktının saflaştırılarak, Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I'nın izolasyonu analitik kolonun kullanıldığı HPLC sisteminde gerçekleştirildi. Fraksiyon toplayıcının tepsi sistemi, 4,5 mL hacimli 48 adet vial yerleştirilebilen tepsidir. C₁₈ analitik kolonda (4,6x250 mm; 5 µm) 40 °C kolon fırın sıcaklığında, 229 nm dalga boyunda ve 0,75 mL/dk akış hızında gradientelüsyon programı kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Örnek enjeksiyon hacmi, sistemde takılı olan loopun maximum hacmi olan 50 µL olarak belirlendi. Örneğin bu kromatografik şartlarda bir ön enjeksiyonu ile kromatogramı elde edildi. Fraksiyon toplayıcıda bileşenler, bu elde edilen kromatograma göre sistem valfinin piklerin başlangıç bitiş noktalarına göre açılıp kapanması ile otomatik olarak farklı viallere toplandı.

Diyod Array Dedektör 'de (DAD) analizin yapıldığı dalga boyuyla beraber 1,0 nm aralıklı belirli aralıktaki tüm dalga boylarında kromatogram kaydedilir. Analiz bittikten sonra herhangi bir dalga boyundaki kromatograma bakılabilir. DAD dedektörde pik saflıkları iki yöntemle incelenir. Birinci yöntemde; bir kromatografik pikin n sayıdaki farklı dalga boyundaki görüntüsü üst üste çakıştırılarak pikin saf bir maddeye ait olup olmadığı anlaşılır. Saf olmayan bir kromatografik bantta pik simetriklikleri ve şekilleri farklı dalga boylarında değişir. Saf bileşenler ise pik şiddetlerinin değiştiği, ancak pik simetrikliğinin korunduğu bir pik profili gösterir.

Çalışmamızda, pik saflıkları hem farklı dalga boylarındaki pik profillerinden hem de her pik için pik saflıklarının hesaplatılmasından belirlendi. Analiz 229 nm 'de yapıldığından 5 nm dalga boyu aralıkları ile toplam 11 dalga boyunun (204, 209, 214, 219, 224, **229**, 234, 239, 244, 249, 254) pik profili değerlendirildi. Pik saflıkları ise

Kukurbitasin D ve I pikleri için piklerin her noktasının sırasıyla pikin kümülatif spektrumu ile karşılaştırılması yolu ile elde edilen toplam pik saflığı cinsinden hesaplatıldı.

3.2.4.2. Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I fraksiyonlarının liyofilizasyonu

Liyofilizasyon işlemi liyofilizatörde gerçekleştirildi. Bu işlemin başında saf olarak Kukurbitasin D ve I'yı içeren HPLC fraksiyonları -20 °C'de donduruldu. Daha sonra -40 °C sıcaklığına inen liyofilizatöre yerleştirildi ve mobil faz süblime edildi. Açığa çıkan buhar vakum pompası ile boşaltıldı. Bu şekilde, Kukurbitasin D ve I fraksiyonlarından mobil faz liyofilize edilerek uzaklaştırıldı ve bu kukurbitasinler kristal toz halde elde edildi.

3.2.5. Hücre kültürü

LS174T ve SW620 hücreleri standart şartlarda (%5 CO₂, 37 °C) kültür edildi. Besiyer olarak tüm hücreler için RPMI 1640 kullanıldı. Bütün hücreler -80 °C'de muhafaza edildi. Bu hücreler kullanılmadan önce 37°C'de çözöldü ve 1500 U/dk'da 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan hücre peleti taze hücre besiyerine alınarak inkübatöre bırakıldı.

3.2.5.1. Besiyerin hazırlanması

500 mL RPMI 1640 besiyer içerisinde; 50 mL FBS, 5 mL penisilin /streptomisin, 5 mL L-Glutamin eklenerek besiyer hazırlanıldı. Deneysel çalışmalar süresince hazırlanan besiyer +4 °C buzdolabında muhafaza edildi.

3.2.5.2. Hücre pasajı

Hücreler; hazırlanan besiyer ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm² 'lik flasklara konularak (hücre kültürü şişeleri) iç ortamı %95 nem ve %5 CO₂ içeren 37 °C olan inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler flaskın bütün yüzeyini kaplayınca sıklıklarına göre 3-5 günde bir pasaj edildi. Burada, hücrelerin kullandığı besiyer tek kullanımlık steril pipet yardımıyla çekilerek, hücreler birkaç defa PBS ile yıkandı. Hücre yoğunluğuna göre Tripsin (%0,25) eklendi. Flasklar %5 CO₂'li etüvde 37 °C'de 5-7 dakika bekletilerek flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmalari sağlandı. Tripsin (%0,25) miktarı kadar taze besiyer bu karışım üzerine dökülerek

tripsinin nötralizasyonu sağlandı. Bu şekilde besiyer içine alınan hücreler tümör hücre süspansiyonunu oluşturur. Bu süspansiyondan 10 µL alınarak hücre sayımı yapıldı. Geriye kalan hücre süspansiyonu 10 dakika, 1500 U/dak santrifüj edildi, üstte kalan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan hücre peleti üzerine 1 mL besiyer konuldu. Bu hücreler, içlerine 4 mL besiyer konulan yeni flasklara (hücrenin yoğunluk durumuna göre 2-4 flask) esit miktarda dağıtıldı. Pasajlanan hücrelerin flask içindeki yoğunlukları her gün mikroskopta gözlemlendi. Flask tabanını kaplayan hücreler tekrar pasajlanarak ölçümler için gerekli sayıda flaska yerleştirildi.

3.2.5.3. Kanser hücrelerinin dondurulması

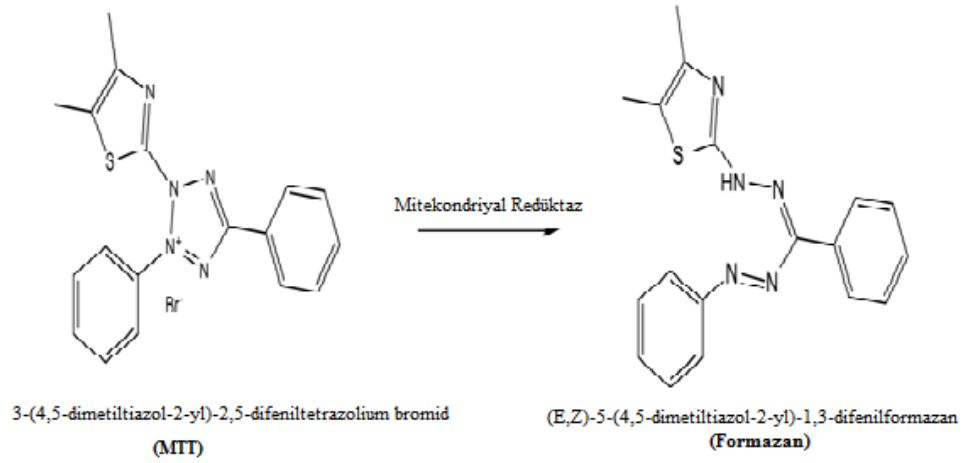
Yukarıda hücre pasajında belirtilen işlemler hücre peleti elde edilene kadar aynı şekilde yürütüldü. 1 mL hücre süspansiyonu içinde $1,5 \times 10^6$ hücre gelecek şekilde hesaplama yapılarak, bu hücre peleti, hazırlanan özel bir besiyer içine (%20 RPMI 1640 Besiyer, %70 FBS ve %10 Dimetilsülfoksit) alındı. -80 °C derin dondurucuya bırakılarak muhafaza edildi.

3.2.5.4. Hücrelerin ekimi

LS174T ve SW620 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına (plakalara) her bir kuyucuğa 4000 hücre/100 µL olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için bir gece beklendi.

3.2.6. MTT proliferasyon testi ve çoğalma kinetiğinin belirlenmesi

LS174T ve SW620 hücrelerinde Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I uygulamasının hücrelerin canlılığı (proliferasyonu) üzerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi kullanıldı. Prensip olarak bu yöntem, canlı hücrelerin 3-(4,5 dimetiltiyazol-2-il) 5-Difeniltetrazolium-Bromid (MTT) ile boyanmasına dayanır. Bu boya canlı hücreler tarafından alınarak Şekil 3.18'deki reaksiyona göre formazan kristallerine metabolize edilir ve mor renkli kristaller oluşur, buna karşılık ölen hücrelerde bu kristaller gözlenmez. Bu oluşan kristaller asidik 2-izopropanol ile çözülür ve spektrofotometrik olarak ölçülür (Jansohn vd., 2012).



Şekil 3.18. MTT'nin formazan kristallerine dönüşümü

MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değerler, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Uygulama sonrası canlı hücre sayısındaki artış ya da azalış MTT molekülünün renk değişimi ile izlenmektedir. Hücre proliferasyonu arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değerleri de artış göstermektedir. Bu test, uygulamadan sonra yaşayabilen hücrelerin sayısının fotometrik olarak belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

3.2.6.1. Kukurbitasin D ve I'nın hazırlanması ve uygulanması

Çalışmada *E.elaterium* olgun meyvelerinden izole edilen Kukurbitasin D ve I kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin D ve I (uygulama grupları) hazırlamak için etil alkol ve RPMI 1640 besiyer kullanıldı.

Plakalara ekilen hücreler 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra uygulama yapılmayan (kontrol grubu) dışındaki hücrelerin üzerine, etil alkolde çözülerek hazırlanan stok Kukurbitasin D ve I'nın besiyer içerisinde seyreltilerek hazırlanan 5, 25, 50, 100 ve 250 nM çözeltileri ayrı ayrı sekiz farklı inkübasyon süresi (6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96 saat) için uygulandı. Her bir konsantrasyon için uygulama sekizerli gruplara ayrılan kuyucuklardaki hücreler üzerine yapıldı. Yani sekiz kuyucuğa 5 nM kukurbitasin, diğer bir sekiz kuyucuğa 25 nM kukurbitasin eklenmesi şeklinde gerçekleştirildi.

Etil alkolün hücreler üzerine etkisini belirlemek için çeşitli etil alkol konsantrasyonları hazırlanarak hücre hatlarına uygulandı. %2,5 etil alkol konsantrasyonuna kadar kontrole göre herhangi bir değişim olmadığı tespit edildi.

Hazırlanan Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarında %0,05'in altında kullanılan etil alkol, sitotoksik etki göstermediğinden kontrol gruplarında sadece besiyer kullanıldı ve uygulama grupları ile aynı sürede inkübe edildi. Kukurbitasinlerin etkisi 6., 12., 24., 36., 48., 60., 72. ve 96. saatlerde inceleneceğinden her saat dilimi için ayrı bir plaka kullanıldı. Uygulamalar tamamlandıktan sonra plakalar inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.2. MTT proliferasyon testi

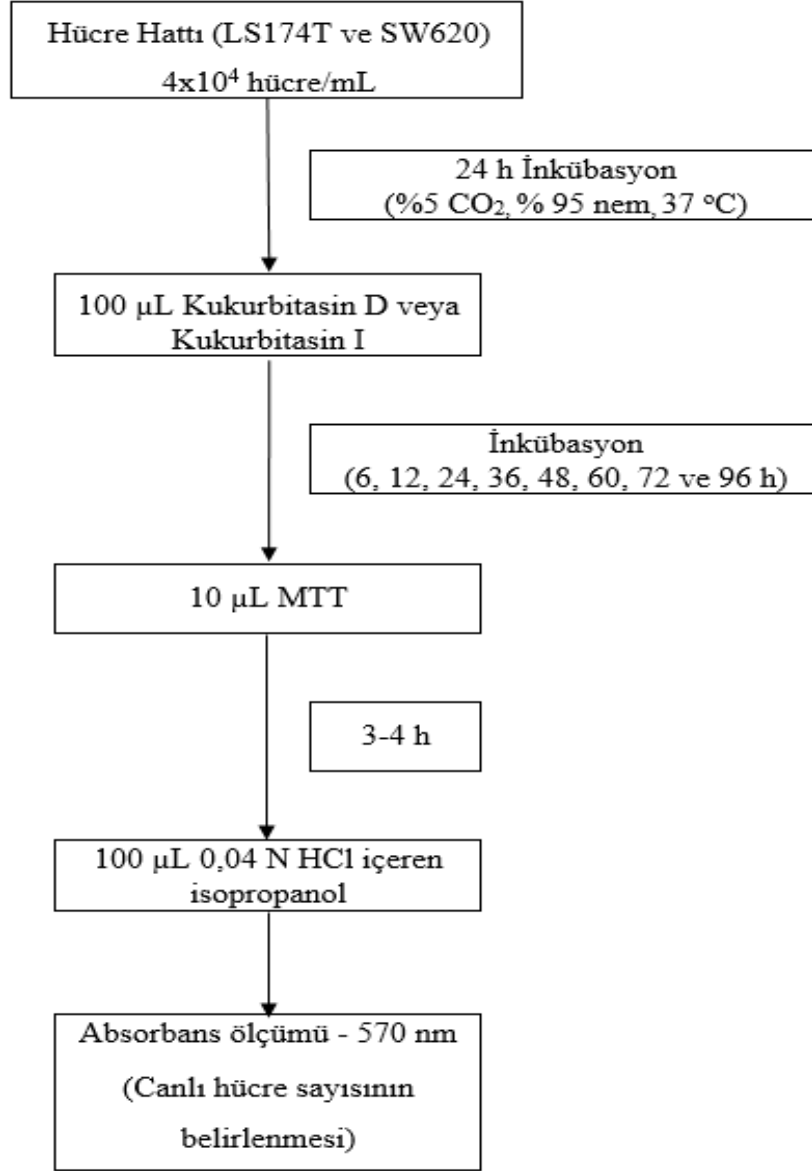
MTT çözeltisi PBS içinde son konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Uygulamadan sonraki 6., 12., 24., 36., 48., 60., 72. ve 96. saatlerde ilgili plaka etüvden çıkarılıp 10 µL steril MTT-çözeltisi her bir kuyucuğa eklendi ve 3-4 saat inkübatörde bekletildi. Bu süre sonunda bütün kuyucuklardaki besiyerler hücrelere ve oluşan formazan kristallerine zarar vermeden uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 100 µL 0,04 N HCl içeren izopropanol eklendi. Kuyucuklardaki çözelti çoklu otomatik pipetle çekilip bırakılarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Absorbanslar, mikropate okuyucuda 570 nm'de ölçüldü. Her bir kontrol ve uygulama yapılan deneyler 3 tekrarlı yapılarak ortalama absorbans değerleri belirlendi. Yapılan MTT testi deneyinin işlem basamaklarını içeren test metodu Şekil 3.19'da, deneyin şematik görüntüsü ise Şekil 3.20'de gösterilmiştir.

Hücre canlılığı üzerine Kukurbitasin D ve I 'nın etkisi, sadece hücre içeren kontrol örneğinin ortalama absorbansı (A_0) %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi ve uygulama yapılan hücrelerden elde edilen absorbans değerleri (A_t), kontrol hücrelerine göre oranlanıp 100 ile çarpılarak hücre canlılığı belirlendi.

$$\% \text{ Canlılık oranı} = \frac{A_t}{A_0} \times 100$$

Aşağıdaki formüle göre hesaplanan % inhibisyon değerleri, hücre proliferasyonunda/canlılığında %50 azalmaya neden olan Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarının (IC_{50}) belirlenmesi için kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100$$



Şekil 3.19. MTT test metodu ile canlı hücre sayısının belirlenmesi



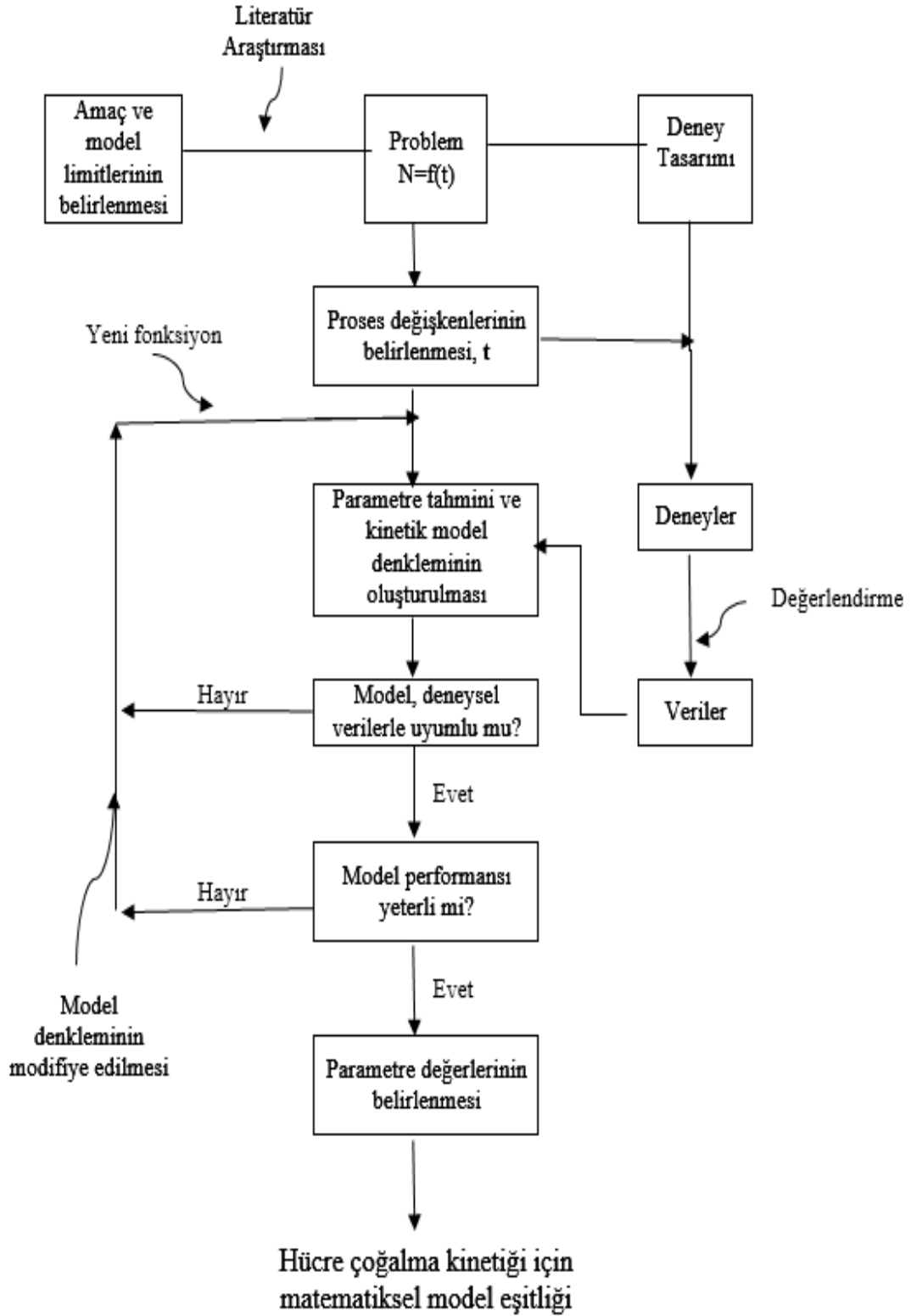
Şekil 3.20. Hücre proliferasyonu (MTT Testi) deneyinin şematik görünümü

3.2.6.3. Hücre çoğalma kinetiği ve model parametre değerlerinin belirlenmesi

In vitro çalışmalarda, Kukurbitasin D ve I uygulaması yapılan kanser hücreleri için çoğalma hızının absorbans değerlerine bakıldığında zamanla yavaşladığı veya sabit kaldığı görülmektedir. Hücre çoğalmasındaki bu azalış hızı, daha önceden belirlenmemiş ve herhangi bir matematiksel eşitlikle ifade edilmemiştir. Hücrelerin ortama alışınca kadarki ve alıştıktan sonraki dönemlerde farklı hızlarda çoğalması, sitotoksik ve antiproliferatif etki amaçlı uygulanan maddelerin etkisini ifade eden parametrelerin matematiksel modellerde yer almasıyla açıklanabilir. Ayrıca, bu modeldeki kinetik parametre değerleri; hücre türü ve uygulanan konsantrasyona bağlı olarak farklılık göstermektedir.

MTT testleri sonucu elde edilen deneysel veriler kullanılarak kontrol gruplarının ve uygulama yapılan kanser hücrelerinin çoğalma kinetiğini temsil edecek eşitlikler, literatürde yer alan büyüme modellerini temsil eden matematiksel ifadeler temel alınarak oluşturuldu. Yukarıda bahsedilen durumlar çerçevesinde matematiksel modelde beş adet parametre belirlendi. Matematiksel modelde yer alan bu parametreler SQP yöntemini temel alan *fmincon* Matlab programı ile belirlendi. Parametre belirleme, Şekil 2.12 'deki algoritma bilgi akış şemasındaki temel adımlara göre yapıldı. Şekil 3.21 'de ifade edilen işlem basamaklarına göre parametre belirleme işlemi yapılır. Öncelikle oluşturulacak modelin amacı ve modelin sınırları belirlenir, sonra bağımlı ve bağımsız değişkenler belirlendi. Tasarlanan plana göre deneyler yapılarak veri grupları elde edilir. Değişkenlere göre parametre sayısı belirlenir ve sistemi temsil edecek model eşitliği oluşturulur. Deneysel verilerle model sonuçlarının uyumluluğu araştırılarak amaç fonksiyonunun değişimine göre işlemler tekrar edilerek istenilen toleranslara ulaşıldığında optimizasyon işlemi sonlandırılır ve parametre değerleri belirlenir.

Parametre değerleri MATLAB R2009b programındaki *fmincon* yöntemi ile yapıldı. Çözüm için oluşturulan MATLAB kodlaması Ek-1 'de ve fonksiyon kodlaması ise Ek-2 'de verilmiştir. Bu matematiksel modelin performansı ise MAE, MAPE, RMSE ve R (Eşitlik 2.7-10) değerleri ile ölçüldü.



Şekil 3.21. Hücre çoğalma kinetiği için matematiksel model oluşturma ve parametre belirleme prosedürü

3.2.7. Hücre kültürlerinde kantitatif Real-Time PCR ile hTERT gen ekspresyonunun analizi

Çalışmanın yöntemi; hücre kültürlerinden izole edilen total mRNA (haberci RNA)'dan hareketle komplementer DNA (cDNA)'ların sentezlenmesi, ardından bu cDNA'ların *in vitro* koşullarda real-time PCR cihazı yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonunda elde edilen değerler hangi oranda yüksek ise hTERT geninin ekspresyon düzeyi de o oranda fazla olacaktır.

3.2.7.1. Hücre kültüründen total RNA 'nın elde edilmesi

Kanser hücre hatlarından (LS174T ve SW620), hTERT mRNA seviyelerinin tespiti için öncelikle her iki hücre hattından da 10^6 sayıda hücre 25 cm²'lik flasklara ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra bu flasklara aynı hacimde 5, 25, 50,100 ve 250 nM Kukurbitasin D ve I eklendi. Kontrol grubuna ise sadece besiyer verildi. 48 saat inkübasyon sonunda kültür ortamından Kukurbitasin D ve I içeren besiyer uzaklaştırıldı ve hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra Roche firmasından temin edilen “High Pure RNA Isolation kit” kullanılarak üretici firmanın önerdiği aşağıdaki protokole göre toplam RNA saflaştırılması yapıldı.

Total RNA saflaştırma Protokolü

- ✓ 48 saat sonra elde edilen hücreler ependof tüplere alındı ve üzerine 200 µL PBS eklenerek süspansiyon haline getirildi. Daha sonra 400 µL “Liysis Buffer” eklenip 15 saniye vortekslendi.
- ✓ Ependorftaki bütün süspansiyon, içerisinde filtreli kolon bulunan bir başka ependorfa aktarıldı (maksimum 700 µL) ve 9000 rpm’de 15 s santrifüj edildi.
- ✓ Santrifüj sonunda toplanan sıvı dökülerek kolon tekrar ependorf tüpe yerleştirildi.
- ✓ Her bir örneğin üzerine 90 µL DNaz I inkübasyon tamponu ve 10µL DNaz I eklendi. 15 dakika inkübe (15-25 °C) edildi.
- ✓ İnkübasyondan sonra 500 µL Wash Buffer I eklendi ve 9000 rpm’de 15 s santrifüj edildi. Kolon altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- ✓ 500 µL Wash Buffer II eklendi ve yine 9000 rpm’de 15 s santrifüj edildi. Kolon altında toplanan sıvı atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine tekrar

yerleştirildi.

- ✓ 200 µL Wash Buffer II eklendi ve 13500 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü atıldı ve kolon steril bir ependorf tüpe alındı.
- ✓ Sonra kolona 100 µL “Elution buffer” eklendi ve 9000 rpm’de 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Tüplerde toplanan sıvı total RNA olarak elde edildi.
- ✓ Elde edilen total RNA’nın miktar tayini ve saflığı “Epoch Biotek” marka spektrofotometre cihazı ile “Gen5” programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumda ölçüldü.

“High Pure RNA Isolation Kit Protokolü” kiti ile hücre hatları örneklerinden saflaştırılan toplam RNA’larda herhangi bir yıkımın olup olmadığının belirlenmesi amacıyla örnekler, %1 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV’de elektroforez işlemine tabi tutuldu. RNA görüntülemesi UVP marka ChemiDocIt² sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. Daha sonra bu RNA’lar Real time PCR (RT-PCR) ile analizlerde kullanılabilecek kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2.7.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Hücrelerden saflaştırılan RNA’nın saflığı ve miktar tayini nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon oranına göre ölçüldü. 260/280 nm oranı yaklaşık 2 olan örnekler saf RNA olarak kabul edildi. Absorbans değerleri saptandıktan sonra RNA miktarı ng/µL cinsinden hesaplandı.

Genlerin mRNA ekspresyonlarına bakabilmek için ilk olarak elde edilen total RNA’ların komplementer DNA’ya (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. RNA izolasyonunu takiben Roche firmasının ürettiği “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” kiti ile total RNA ’dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi, üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı. 100 µL’lik PCR tüpüne 600 ng toplam RNA, 1 µL OligodT18 (50 pmol/µL), 1 µL Random Hexamer Primer (600 pmol/µL) ve toplam hacim 13 µL olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C’de 10 dakika PCR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 µL “Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer”, 0,5 µL “Protector RNase Inhibitor”, 2 µL Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5 µL

“Transcriptor Reverse Transcriptase” enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 µL oldu. Karıştırılan numuneler PCR makinesinde 25 °C’de 10 dakika, 55 °C’de 30 dakika ve 85 °C’de 5 dakika ısıtıldı daha sonra +4 °C’ye soğutularak bir süre bekletildi. Bu işlemten sonra elde edilen numuneler, -20 °C’de analize kadar saklandı.

3.2.7.3. hTERT Geninin ifade düzeyinin RT-PCR ile belirlenmesi

RT-PCR analizi; Roche Light Cycler 96 RT-PCR cihazı, Roche firmasının ürettiği “Fast Start Essential DNA Probes Master” ve “Real Time Ready Assay (β-Actin, hTERT) hidroliz problu primerler (8 pmol/µL) kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10 µL toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µL master mix, 0,5 µL real time ready mix, 2 µL PCR kalitesinde su ve 2,5 µL cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyini incelemek için hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I’nın 50 nM’lık uygulamasının değerlendirilmesine karar verildi ve her iki hücre hattı için 6 tekrar olarak yapıldı.

PCR işlemi firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95 °C’de 10 dakika, ikinci denaturasyon 95 °C’de 10 saniye, bağlanma 60 °C’de 30 saniye ve polimerizasyon 72 °C’de 1 saniye olarak uygulandı ve 55 döngü tekrarlandı. Tablo 3.4’de dizilimleri ve büyüklükleri, Ek-3 ve 4’de Gen Bankasından alınan mRNA dizilimleri ve bu dizilimlerde yerleri gösterilen primerler hTERT gen ifadelerinin analizinde kullanıldı.

Tablo 3.4. hTERT geninin ifade düzeyinin RT-PCR ile belirlenmesinde kullanılan primer dizileri (F: Forward, R: Reverse)

Gen Adı	Primer dizisi (Forward ve Reverse)	NCBI Referans Sekans Sayısı	Beklenen Primer PCR ürün büyüklüğü (Amplifikasyon ürünü)
<i>β-aktin</i>	F: 5’ TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA 3’ R: 5’ CGTGGATGCCACAGGACT 3’	NM_001101	127 bp
<i>hTERT</i>	F: 5’GCCTTCAAGAGCCACGTC 3’ R: 5’CCACGAAGTGTGCGCATGT 3’	NM_01193376 NM_198253	61 bp

3.2.8. İstatistiksel değerlendirme

Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak elde edilen MTT test verilerinin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS for Windows versiyon 22.0 yazılımı kullanıldı. Verilerin normallik dağılımı Shapiro-Wilk ile test edildi ($p>0.05$). Normal dağılım göstermeyen grupların karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanıldı (Bonferroni düzeltmesiyle 0.05/15). Herhangi bir zamanda (24, 48 ve 72. saatlerde) etken maddenin farklı dozları ile kontrol grubu ortalamaları açısından gruplar arası farklar tek yönlü ANOVA testi ile belirlendi ve p değerleri hesaplandı. Farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için varyansların homojen olduğu durumda post-hoc olarak Dunnett t-testi ve homojen olmadığı durumda da Dunnett T3 testi yapıldı. p değeri 0.05 'den düşük ise anlamlı olarak kabul edildi.

In vitro sitotoksiste testlerinde IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında doğrusal olmayan regresyon analizi yapılarak elde edilen eğri formülünden %50 hücre sağkalımına karşılık gelen Kukurbitasin D ve I konsantrasyon değerleri hesaplandı.

RT-PCR ile gen ekspresyonu deneyleri sonunda elde edilen verilerin istatistiki analizinde MedCalc® (11.4.2.0) programı kullanıldı. Gen ifade analizleri için verilerin öncelikle normal dağılım gösterip göstermediği test edildi. Verilerin normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0,05$). Veriler ortanca (%25-%75) olarak gösterildi. Gruplar arasında herhangi bir farkın olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arası çoklu karşılaştırma Conover testi ile yapıldı. p değeri 0,05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

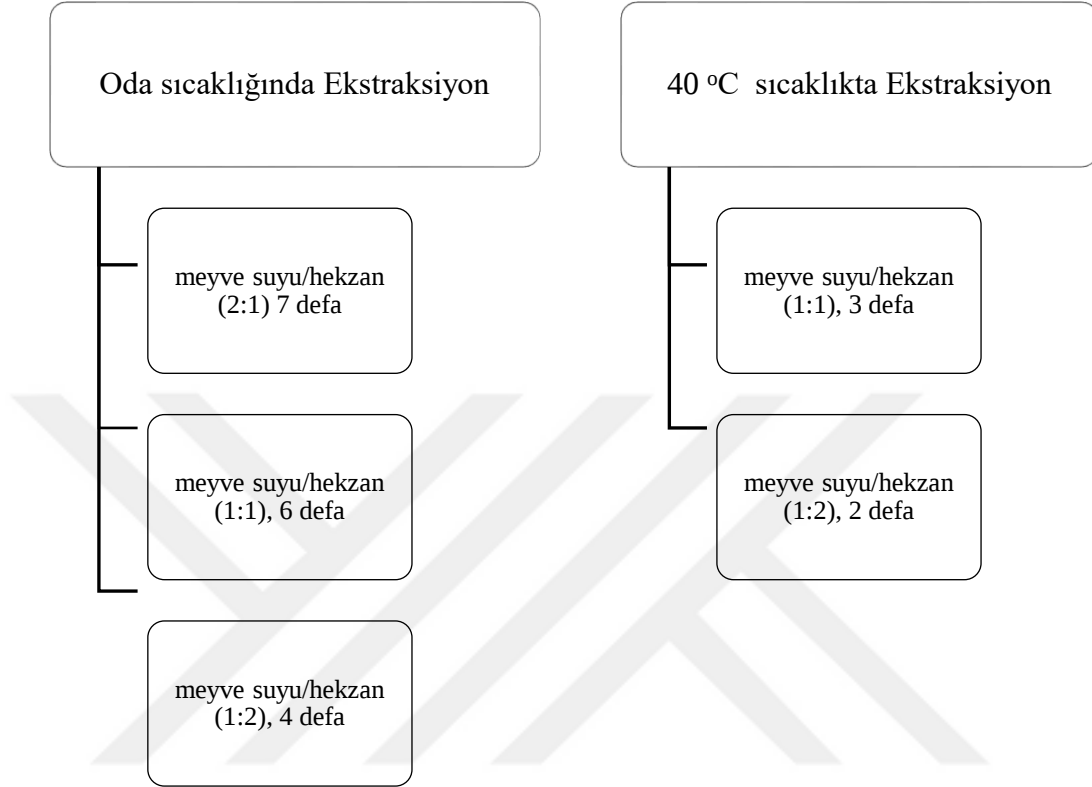
Çalışmada, öncelikle *E.elaterium*'dan Kukurbitasin D ve I'nın kantitatif tayini, izolasyonu ve saflaştırılması yapıldı. Daha sonra izole edilen Kukurbitasin D ve I beş farklı uygulama konsantrasyonu LS174T ve SW620 kolon kanseri hücre hatlarına uygulandı. Belirlenen süreler sonunda sitotoksik, antiproliferatif ve telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri araştırılarak çalışma sonucunda elde edilen bulgular sırasıyla verilmiştir.

4.1. Hekzan ve Kloroform ile Ekstraksiyon Çalışmaları

Saf suda çözülerek hazırlanan meyve suyu örnekleri öncelikle hekzanla ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Farklı sıcaklıklarda ve farklı meyve suyu/hekzan oranlarında yürütülen ekstraksiyon denemelerinde ardışık ekstraksiyon sayısı yönünden elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde ekstraksiyon sıcaklığı ve meyve suyu/hekzan oranının, ardışık ekstraksiyon sayısına (dolaylı olarak ekstraksiyon verimi ve çözücü sarfıyatına) etki eden parametreler olduğu görülmektedir. Burada, hekzan miktarı arttırıldığında ardışık ekstraksiyon sayısının azaldığı açıkça görülmektedir. Ancak, hekzan oranı meyve suyunun iki katı oranında arttırıldığında hekzan fazına geçen bileşen miktarında azalma meydana gelmektedir. Aynı olay sıcaklık arttırıldığında görülmektedir. Bu durum, sadece organik faz ile sıvı faz ara yüzeyinde az miktarda beyaz kalıntı madde oluşmasından anlaşılmaktadır. Sıcaklığın oda sıcaklığından 40 °C'ye çıkarılması ile yarı yarıya daha az ardışık ekstraksiyon ile ekstraksiyon veriminde artış sağlanmıştır. Buradan anlaşılabileceği gibi hekzanla ekstraksiyon işleminde en uygun şartların, meyve suyu/hekzan oranının 1:1 ve ekstraksiyon sıcaklığının 40 °C olduğudur. Hekzanla ekstraksiyon işlemleri belirlenen bu şartlarda yapıldı. Daha sonra sulu faz ile organik faz birbirinden ayrıldı ve organik faz uzaklaştırıldı. Geriye kalan sulu faz bu defa kloroformla ekstarksiyon işlemine tabi tutuldu.

Hekzanla ekstraksiyon işleminden sonra, sulu faz içerisindeki kukurbitasinlerin kloroformla ekstaksiyonunda, meyve suyu/kloroform 1:1 oranında alınarak 6 saat süreyle ekstraksiyon işlemi yapıldı. Ekstraksiyon parametresi olarak sadece sıcaklık denemeleri yapıldı. Sıcaklık denemeleri, kloroformun ekstraksiyon ortamından uzaklaşmasından dolayı verimli bir şekilde yapılamadı. Sonuç olarak, kloroform ekstraktları hazırlanırken ekstraksiyon koşulları, oda sıcaklığında 6 saat

süreyle meyve suyu/kloroform 1:1 oranında alınarak yapılması şeklinde belirlenmiştir. Tüm meyve suyu örnekleri bu şartlarda ekstrakte edilmiştir.



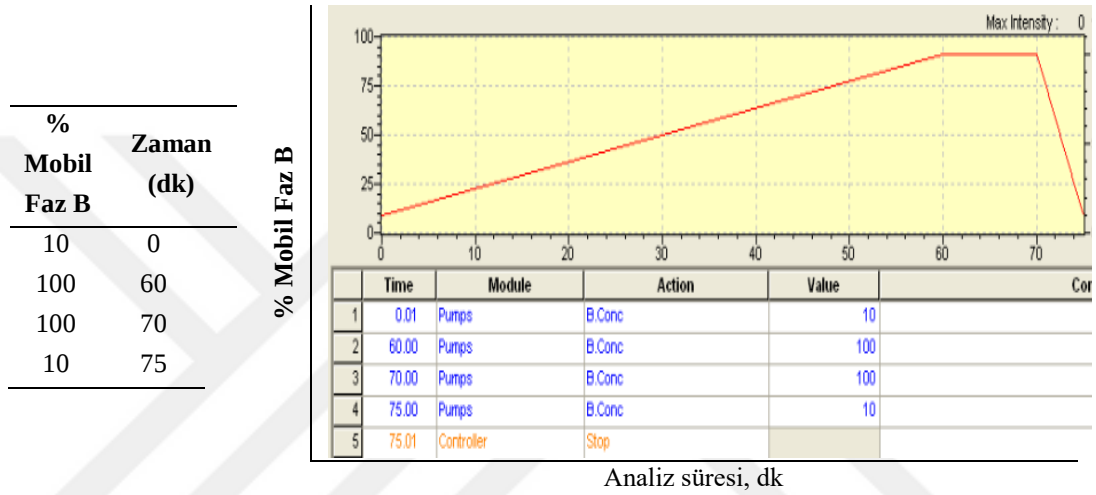
Şekil 4.1. Ekstraksiyon işleminde meyve suyu/hekzan oranları ve sıcaklığın etkisi

4.2. TLC ile Kolon ve Flaş Kromatografisi için Çözücü Sisteminin Belirlenmesi ve Kloroform Ekstraktının Fraksiyonlanması

Kukurbitasin standartlarının da plakalara tatbik edilmesiyle yapılan ayrımlar sonucunda, kloroform:aseton:metanol (77:10:13 ; v/v/v) ile beneklerin en iyi ayrımı gerçekleştiğinden solvent sistemi olarak seçilmiştir. Bu çözücü sistemi kullanılarak kolon ve flaş kromatografisinde izokratik elüsyonla sırasıyla 17 ve 42 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan kolon kromatografisi için 9-11. ve flaş kromatografisi için 21-31. fraksiyonlarda Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I'nın her ikisinin de varlığı tespit edilmiştir.

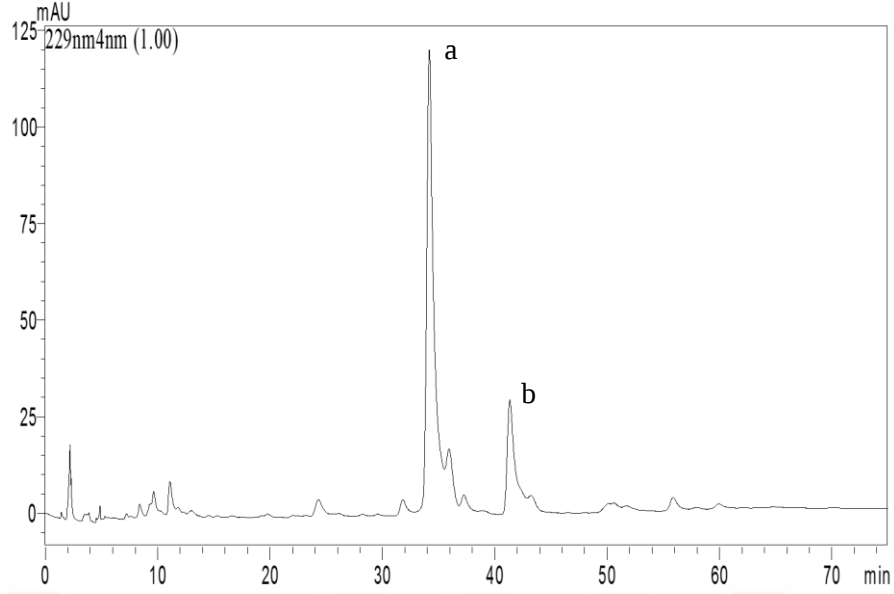
4.3. *E.elaterium* Meyve Suyu Kloroform Ekstraktının HPLC ile Analizi

Materyal ve metod bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan *E.elaterium* meyve suyu kloroform ekstraktının tüm kolon ve flaş kromatografi fraksiyonları analitik kolonda (4,6 x 250 mm; 5 µm) iki farklı çözeltiden oluşan mobil faz sistemi ile gradient olarak yürütülmüştür. Mobil faz sistemini oluşturan çözeltiler (A) Asetonitril:Su (20:80; v/v) ve (B) Asetonitril:Su (45:55; v/v) ile Şekil 4.2'deki gösterilen akış programı kullanılmıştır.

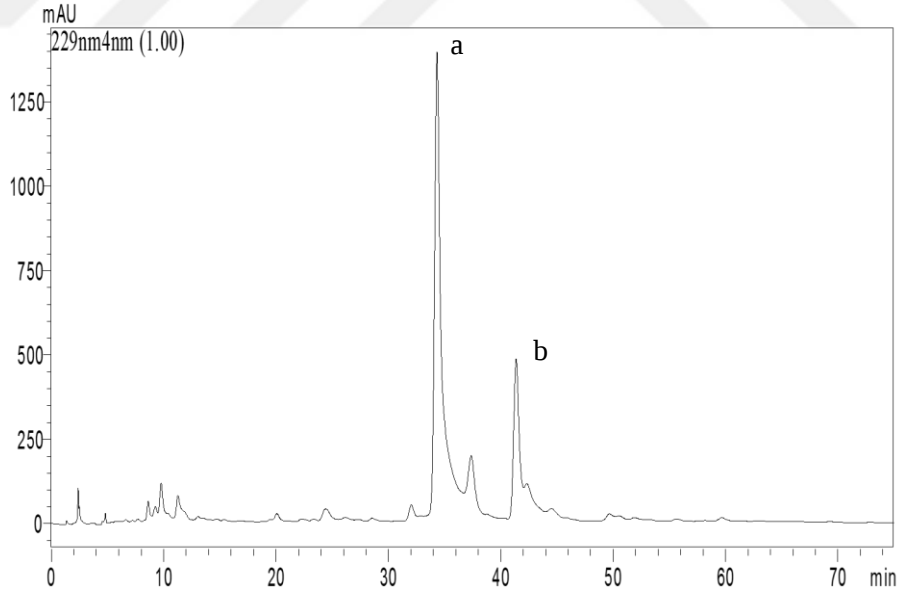


Şekil 4.2. *E.elaterium* meyve suyu kloroform ekstraktının analitik C18 kolonda yürütülmesinde kullanılan gradient akış programı

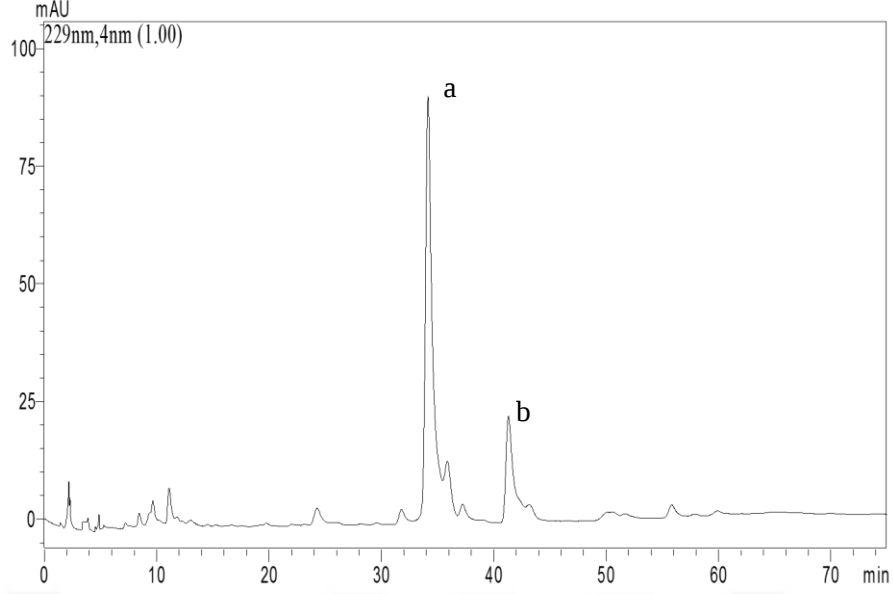
E.elaterium meyve suyunun kloroform ekstraktı, kolon ve flaş kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve bu fraksiyonların hepsi belirlenen kromatografik koşullarda HPLC ile analiz edilmiştir. Kolon kromatografisinin 9, 10 ve 11. fraksiyonlarında, flaş kromatografisinde ise 21-31. fraksiyonlarında kukurbitasin D ve I varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.3-4.16'da Kukurbitasin D ve I varlığı tespit edilen fraksiyonların kromatogramları verilmiştir. Bu şekillerde **a** piki Kukurbitasin D ve **b** piki ise Kukurbitasin I'ya ait piklerdir. Kukurbitasin D belirlenen kromatografik koşullarda hem kolonu daha erken terk etmekte hem de pik yüksekliğine bakıldığında daha fazla miktarda bulunmaktadır.



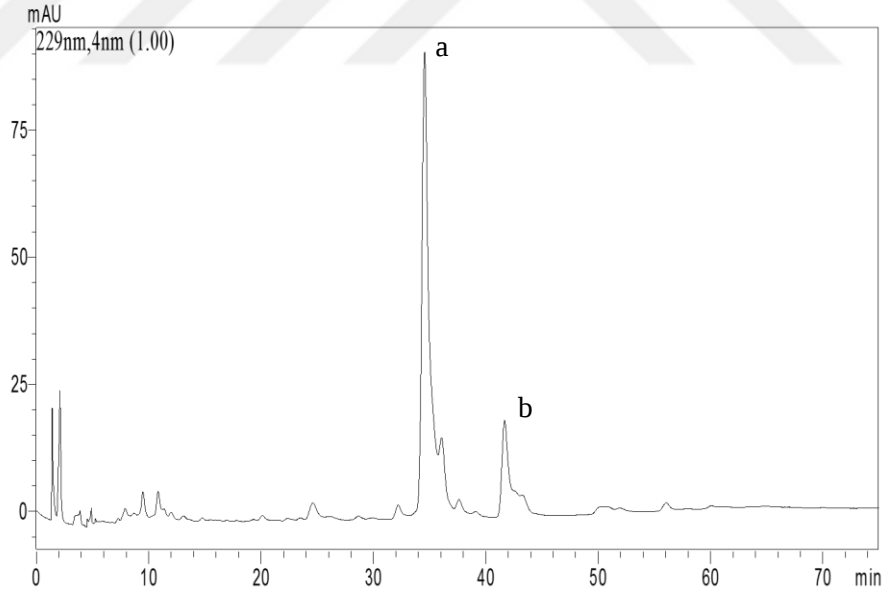
Şekil 4.3. Kolon kromatografisi 9. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



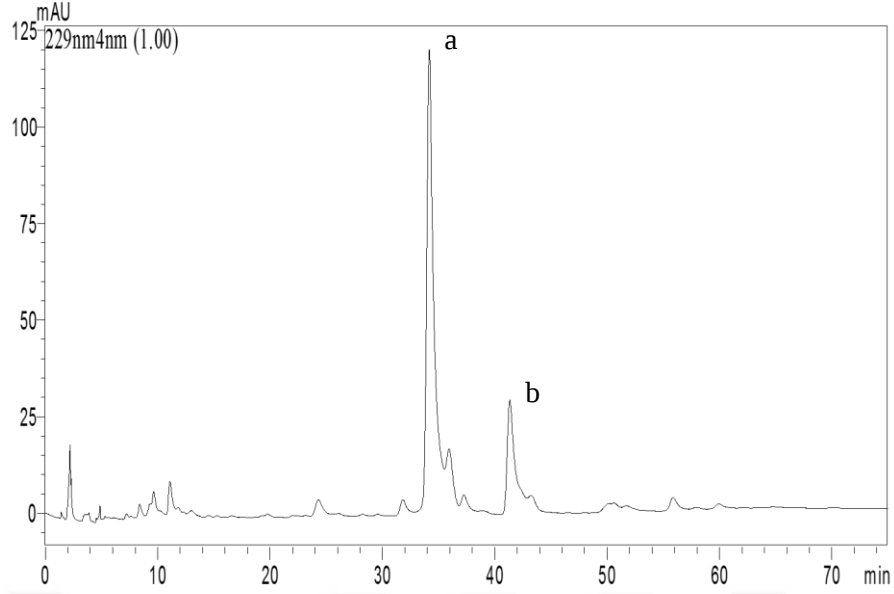
Şekil 4.4. Kolon kromatografisi 10. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



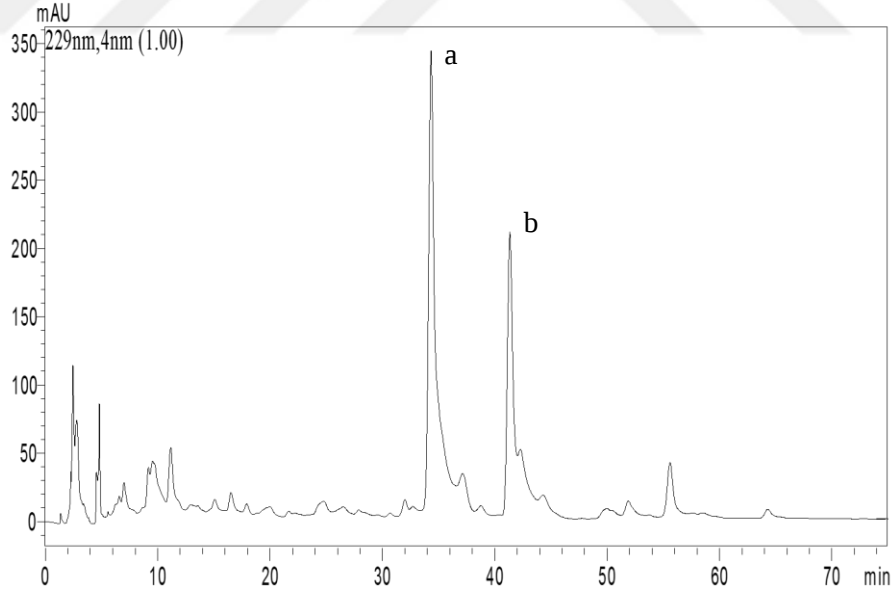
Şekil 4.5. Kolon kromatografisi 11. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



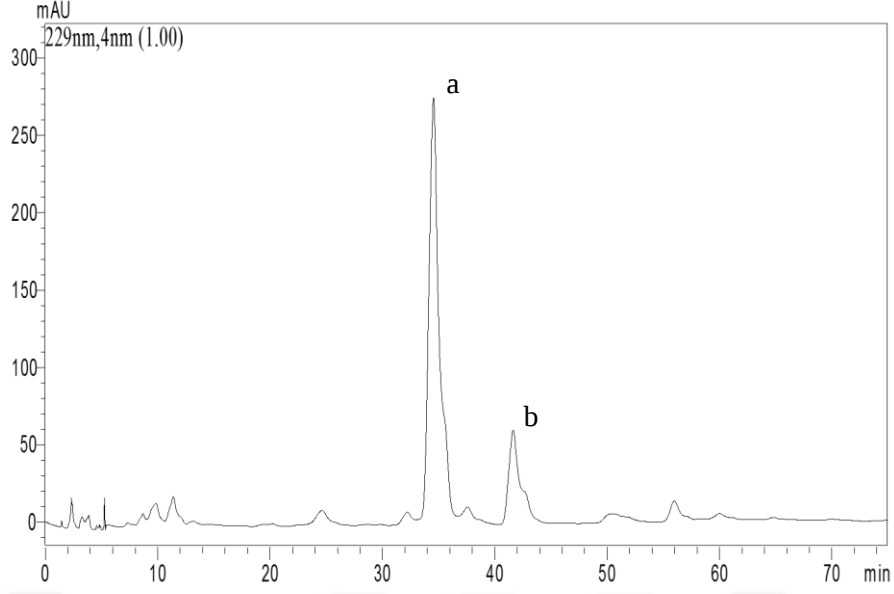
Şekil 4.6. Flaş kromatografisi 21. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



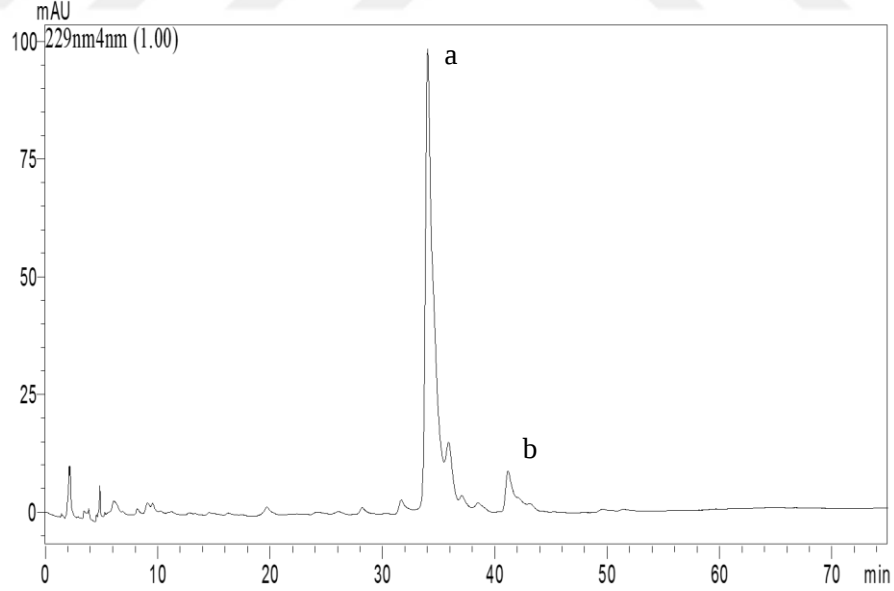
Şekil 4.7. Flaş kromatografisi 22. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



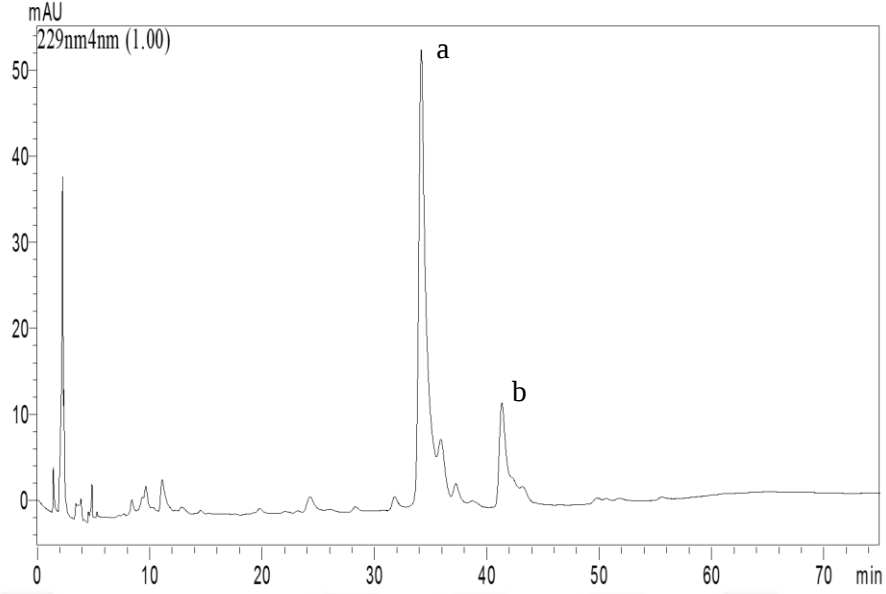
Şekil 4.8. Flaş kromatografisi 23. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



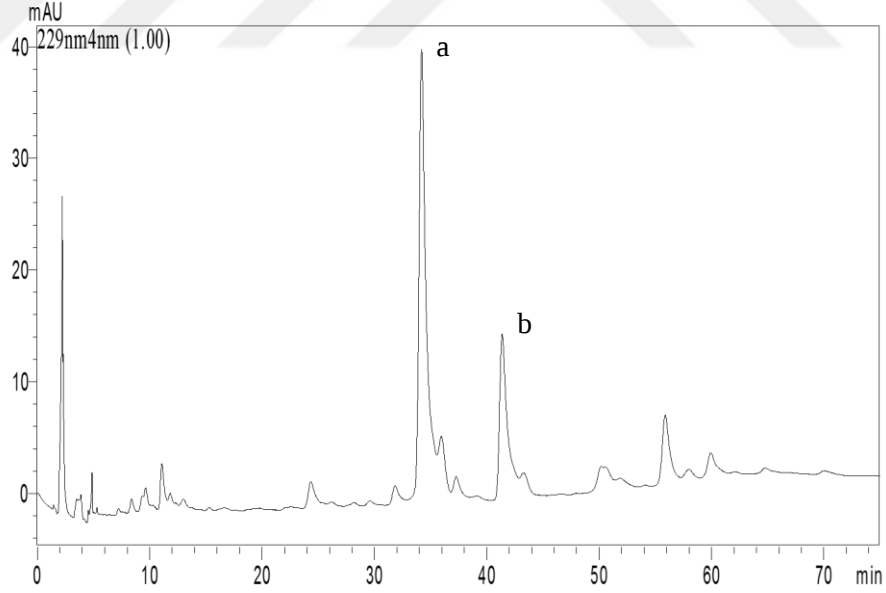
Şekil 4.9. Flaş kromatografisi 24. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



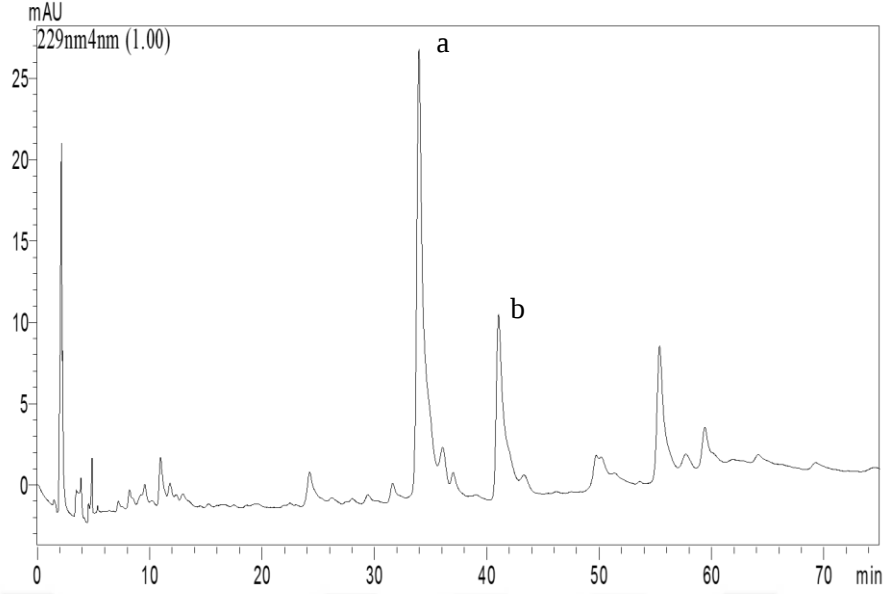
Şekil 4.10. Flaş kromatografisi 25. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



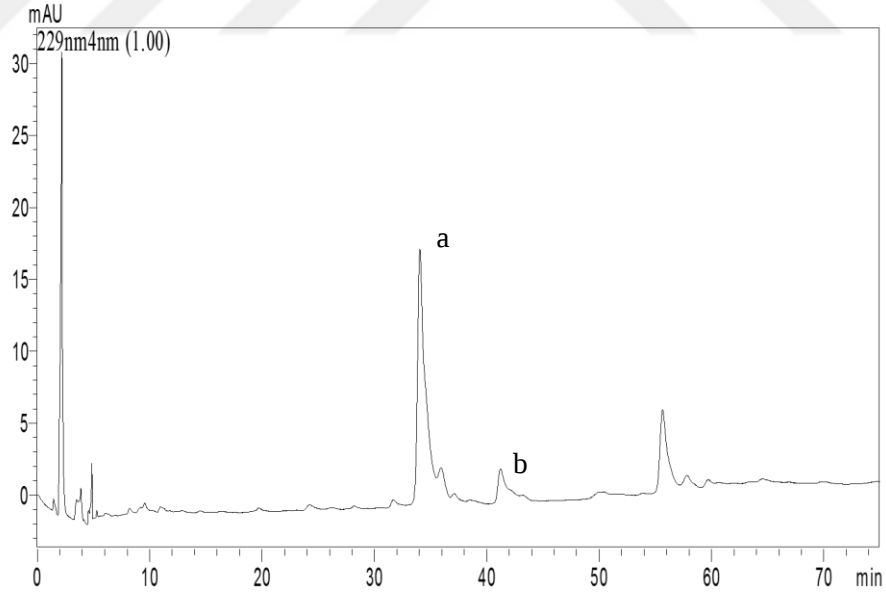
Şekil 4.11. Flaş kromatografisi 26. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



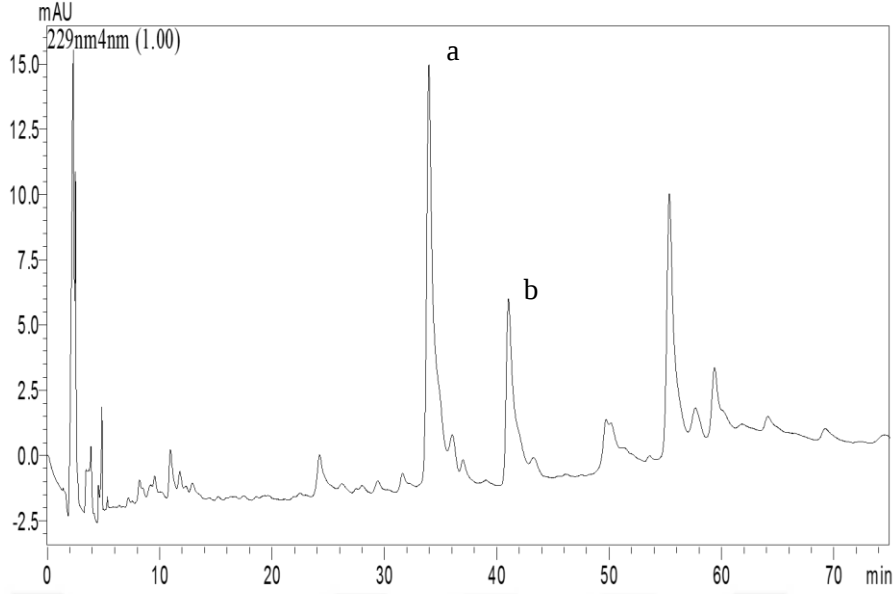
Şekil 4.12. Flaş kromatografisi 27. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



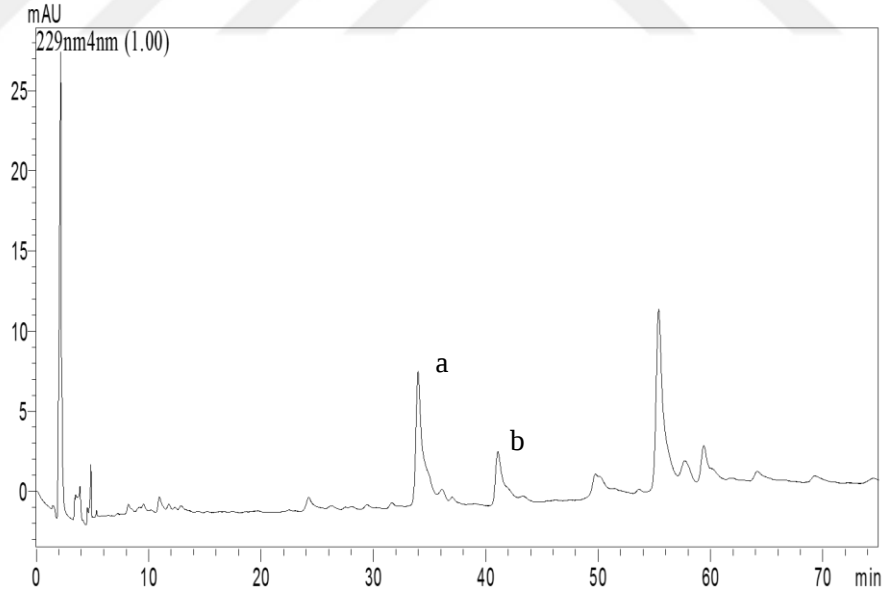
Şekil 4.13. Flaş kromatografisi 28. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



Şekil 4.14. Flaş kromatografisi 29. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



Şekil 4.15. Flaş kromatografisi 30. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)

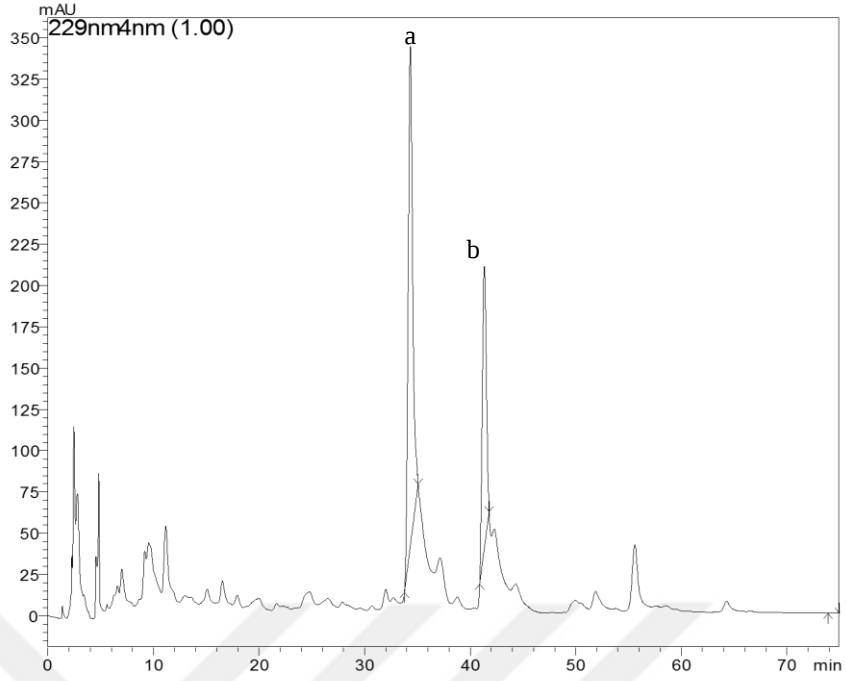


Şekil 4.16. Flaş kromatografisi 31. fraksiyonun C18 kolonda elüsyonunu gösteren kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)

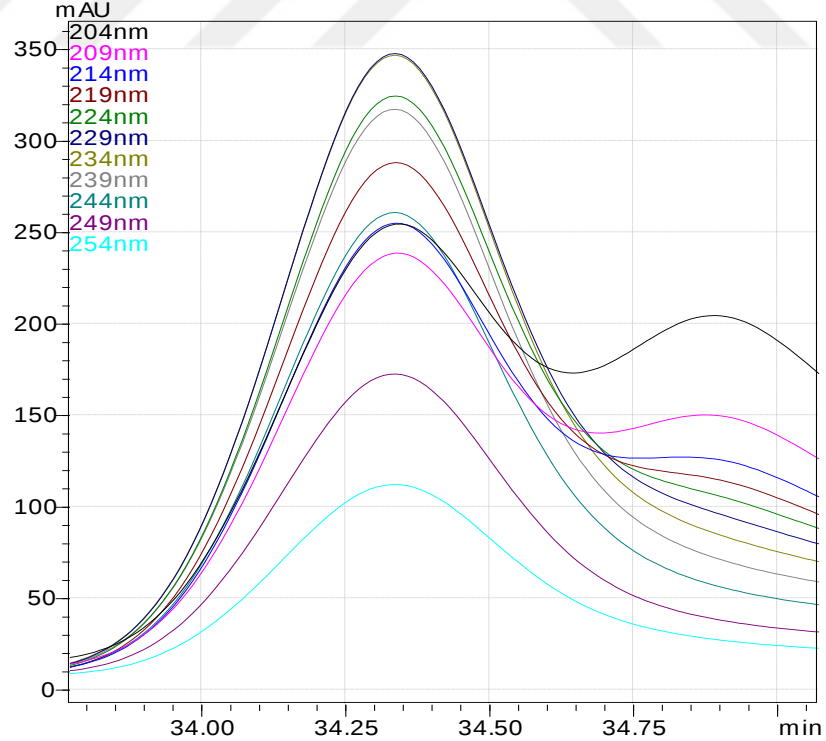
4.4. Kukurbitasin D ve I'nın HPLC'de Fraksiyonlanması ve Saflık Kontrolü

E.elaterium meyve suyunun kloroform ekstraktlarının kolon ve flaş kromatografi fraksiyonlarının C₁₈ ters faz kolondaki ayrımları ile Diode Array dedektörde (DAD) 229 nm dalga boyunda izlenen kromatogramları Şekil 4.3-4.16'da yer almaktadır. Bu fraksiyonlardaki Kukurbitasin D ve I piklerinin en saf hallerinin toplanabilmesi için piklerin alınacağı (pikin başlangıç ve bitiş noktası) aralığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, flaş kromatografisi 23. Fraksiyonu temel alınarak fraksiyonlama işlemi aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır. Öncelikle bu fraksiyonun Şekil 4.17'de manuel integrasyonu yapılmış ve ilgili piklerin başlangıç ve bitiş noktaları belirlenmiştir. Daha sonra integrasyonu yapılan piklerin saflık durumu araştırılmıştır. Bunun için öncelikle ilgili piklerin Şekil 4.18 ve 4.19'da, 229 nm referans dalga boyu dahil olmak üzere 5 nm aralıklarla 204-254 nm aralığındaki 11 farklı dalga boyundaki kromatogramlar karşılaştırılmıştır. Farklı dalga boylarındaki piklerin simetrik olduğu görülmektedir. Piklerin simetrik görüntüsünden pik saflığının çok yüksek olacağı söylenebilir. Ayrıca, piklerin saflık durumları için Şekil 4.20 ve 4.21'de verilen pik saflık spektrumlarına göre Kukurbitasin D ve I pikleri için integrasyonunun başladığı ve bittiği noktalar daha kesin olarak belirlenmiştir. Bu şekillerde maddelerin en saf halde bulundukları zaman aralıkları Kukurbitasin D için 33,97-34,70 dk ve Kukurbitasin I için 40,95-41,75 dk'dır. Bu noktalar arasındaki pikler fraksiyon toplayıcıda toplanmıştır. Ayrıca, bu piklerin Şekil 4.22 ve 4.23'de UV spektrumları verilmiştir. UV spektrumlar, toplanacak bileşenlerin yapısal olarak belirlenmesinde yardımcı olur. Bu şekillerdeki Kukurbitasin D ve I'nın UV spektrumlarına bakıldığında Bölüm 4.5, Şekil 4.29 ve 4.36'da verilen standard Kukurbitasin D ve I ile aynı dalga boyunda (sırasıyla 230 ve 235 nm) maksimum absorbans verdiği görülmektedir.

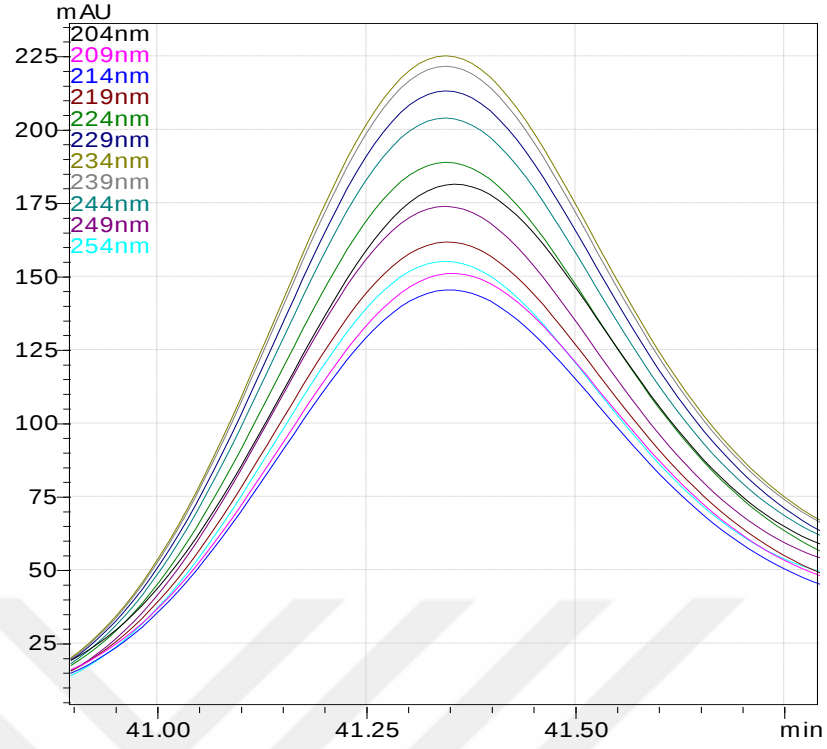
Flaş kromatografisi 23. fraksiyondaki Kukurbitasin D ve I için yapılan işlemler kolon kromatografisi 9-11. fraksiyonlar ve flaş kromatografisi 21, 22 ve 24-31. fraksiyonlar için tekrar edilmiştir. Her bir fraksiyondaki Kukurbitasin D ve I piklerinin başlangıç-bitiş zamanları belirlenip her defasında 50 µl numune enjekte edilerek toplamda 150 kez enjeksiyon yapılmıştır. Fraksiyon toplayıcıda bu iki pik ayrı ayrı toplanmıştır. Tüm enjeksiyonlardan toplanan Kukurbitasin D ve I fraksiyonları ayrı ayrı birleştirilip, liyofilizasyon işlemine kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.



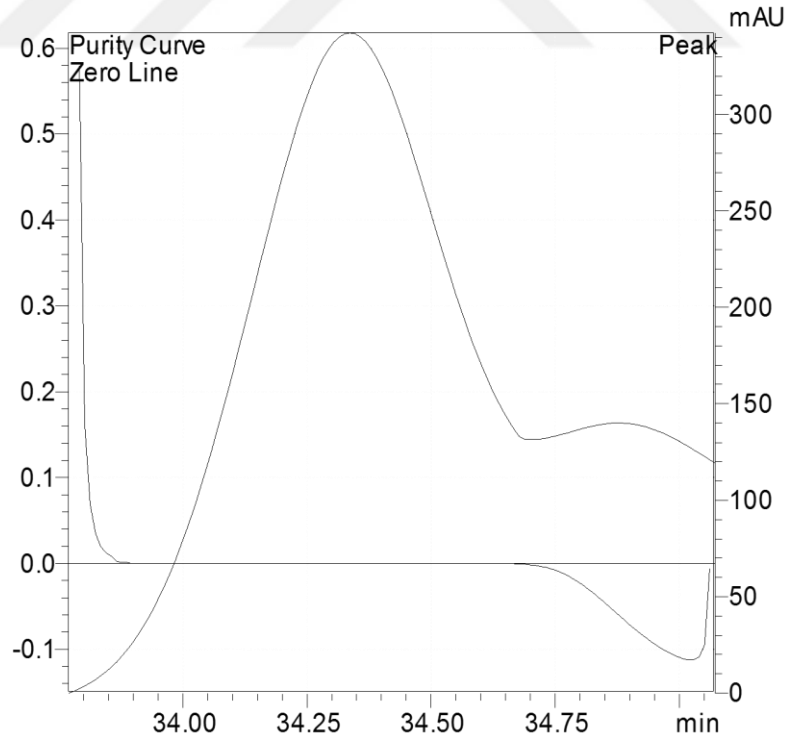
Şekil 4.17. Flaş kromatografisi 23. fraksiyonun 229 nm dalga boyunda manuel integrasyonu (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, a – Kukurbitasin D ve b - Kukurbitasin I)



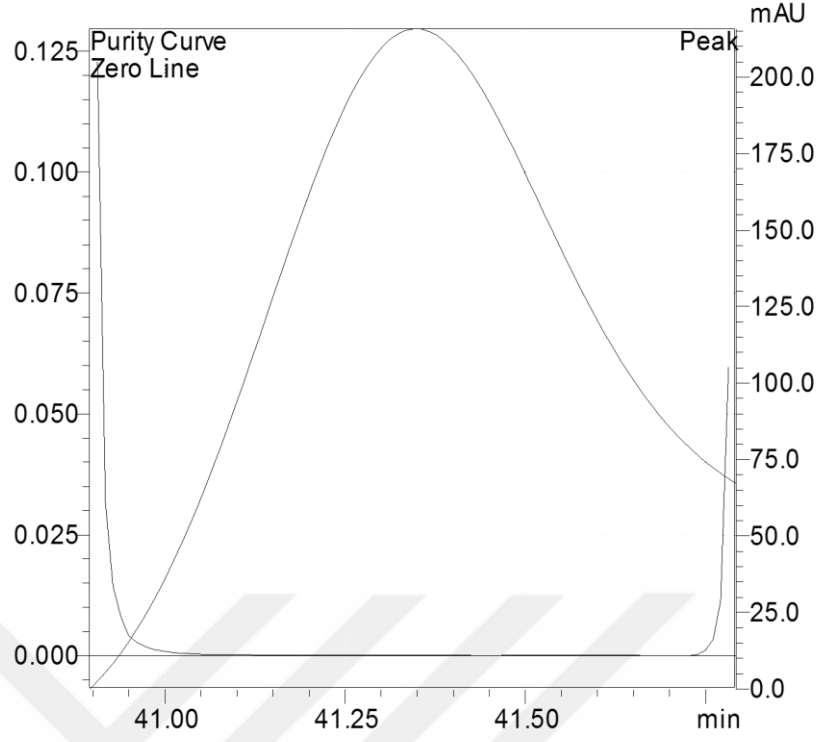
Şekil 4.18. Kukurbitasin D (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları



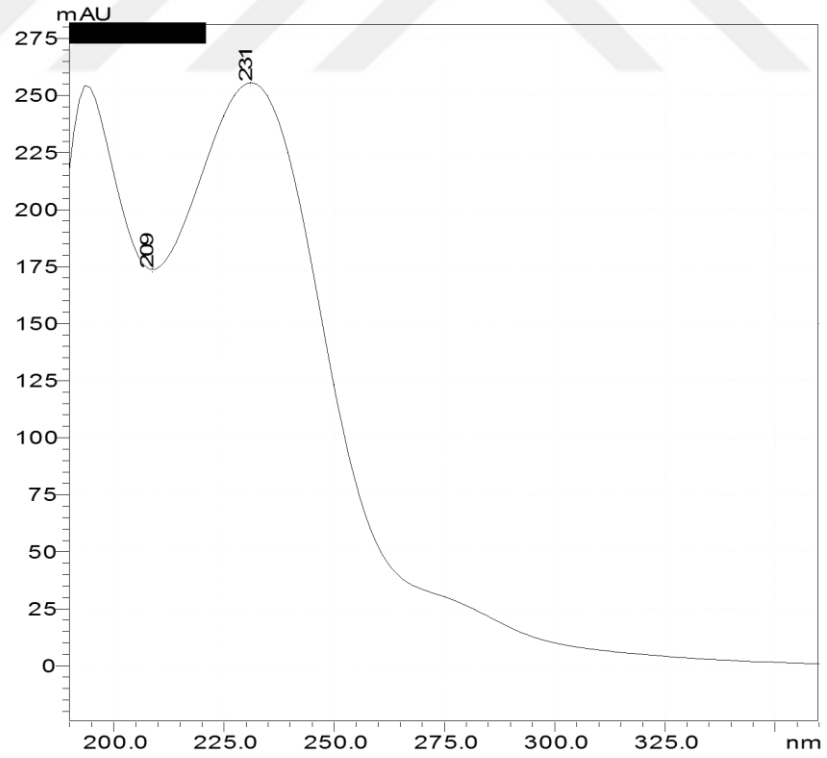
Şekil 4.19. Kukurbitasin I (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları



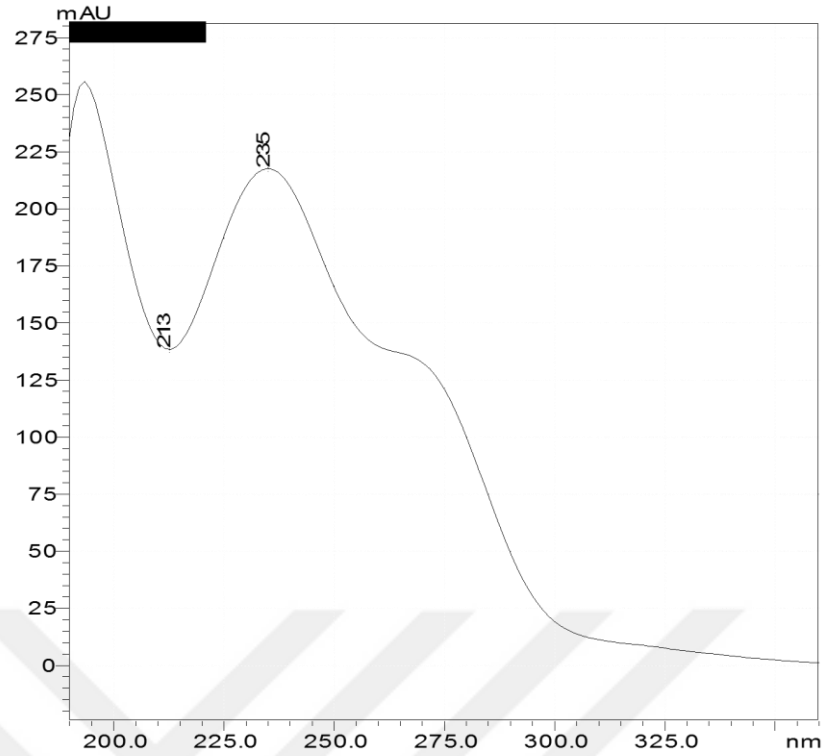
Şekil 4.20. Kukurbitasin D (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) saflık spektrumu



Şekil 4.21. Kukurbitasin I (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) saflık spektrumu



Şekil 4.22. Kukurbitasin D (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) UV spektrumu

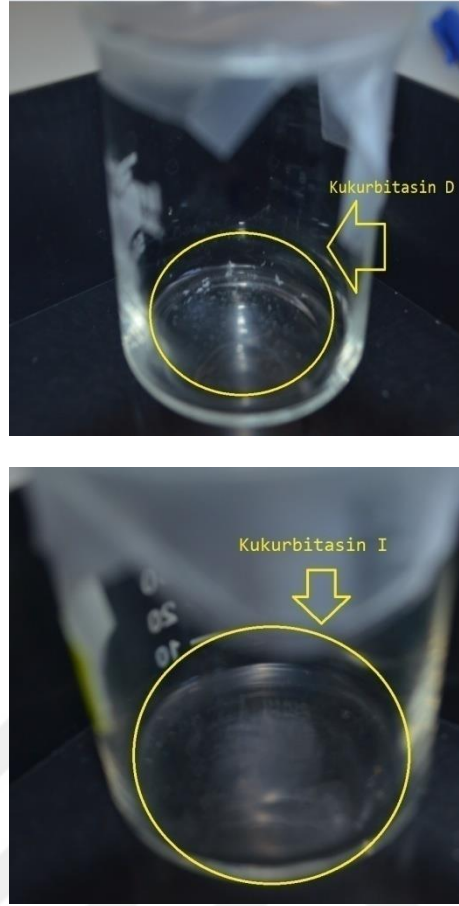


Şekil 4.23. Kukurbitasin I (Flaş kromatografi 23. fraksiyon) UV spektrumu

4.5. Kukurbitasin D ve I Fraksiyonlarının Liyofilizasyonu ve Saflık Kontrolü

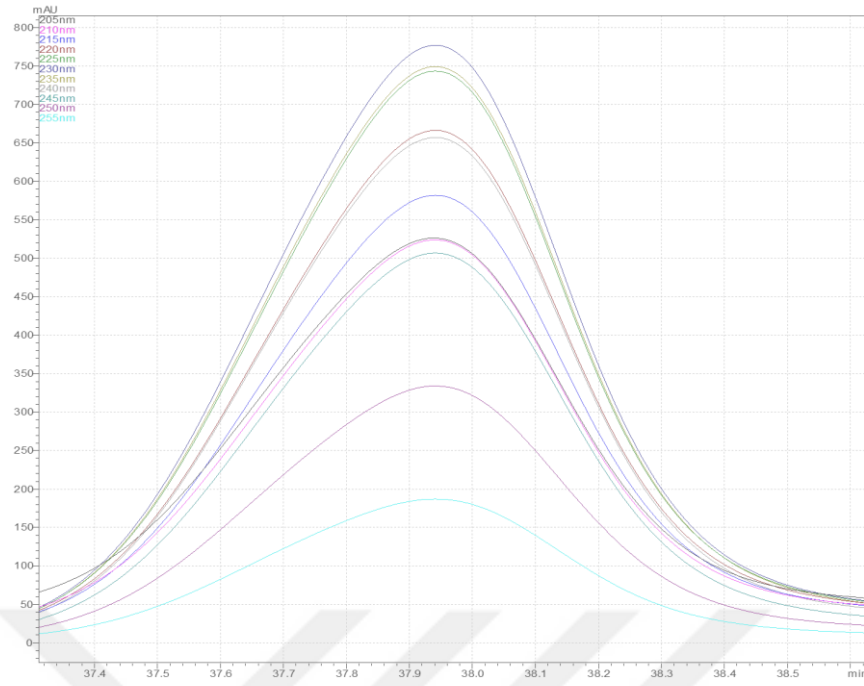
Fraksiyonlanarak toplanan Kukurbitasin D ve I fraksiyonları derin dondurucudan çıkartılıp küçük hacimlerde bir gece -20 °C’de bekletildikten sonra liyofilizatörde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon aynı kap içerisinde tüm fraksiyonlardaki mobil faz uzaklaştırılıncaya kadar yapılmıştır. Liyofilizasyon işlemi tamamlandığında Şekil 4.24’de beher içerisinde görülen Kukurbitasin D ve I kristalleri elde edilmiştir.

Liyofilizasyon sonucu elde edilen Kukurbitasin D ve I kristallerinin saflık kontrolleri yapılmıştır. Bunun için flaş kromatografi 23. fraksiyon için uygulanan prosedür aynı şekilde yinelenmiştir. Öncelikle izole edilen Kukurbitasin D ve I, 2 mL etil alkol içerisinde çözülerek belirlenen kromatografik koşullarda HPLC ile analizi yapılmıştır. Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I’nın 229 nm dalga boyunda pikleri elde edilmiş ve 11 farklı dalga boyundaki pik profilleri, pik saflık dereceleri ve UV spektrumları alınmıştır.

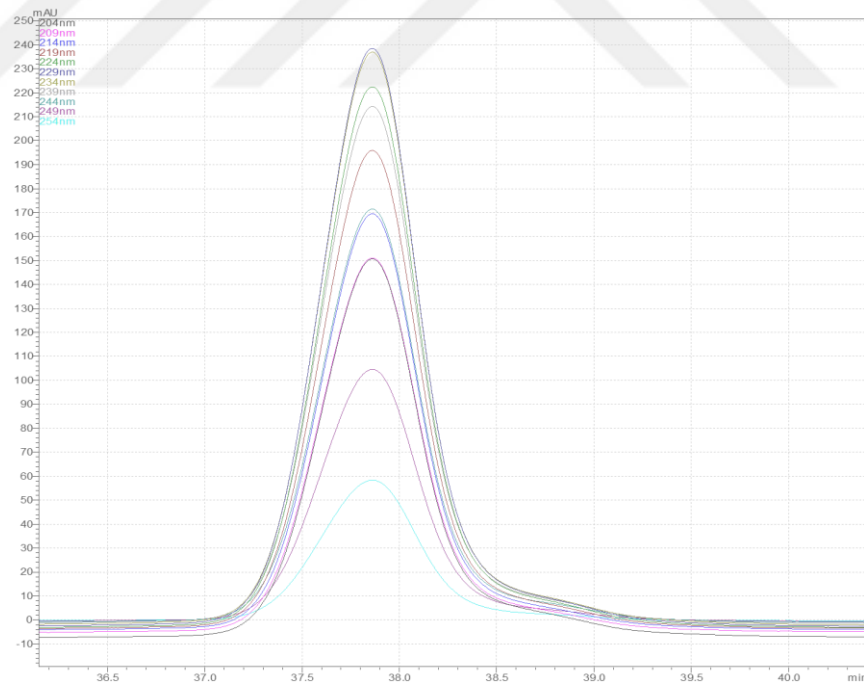


Şekil 4.24. İzole edilen liyofilize Kukurbitasin D ve I kristalleri

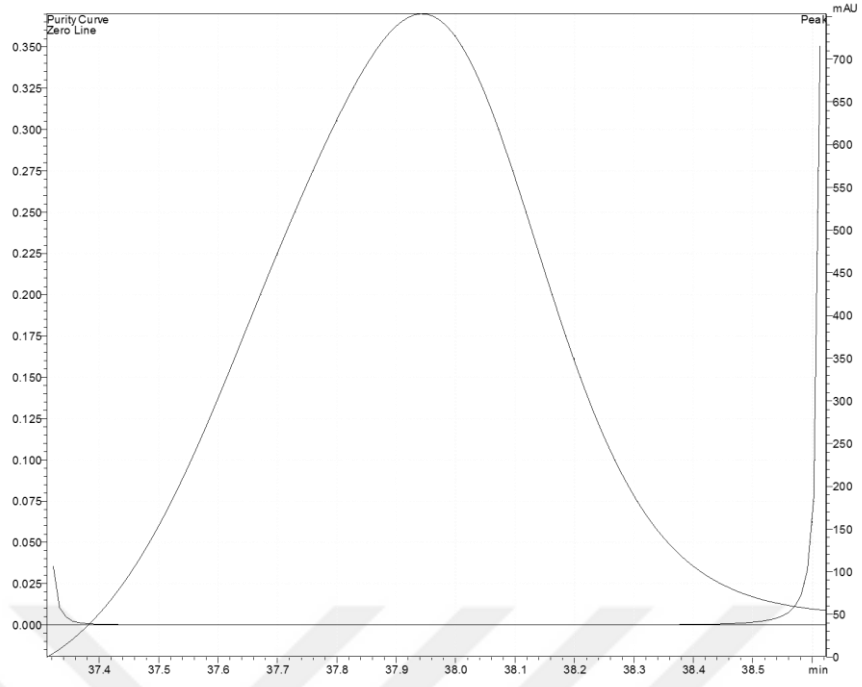
İzole edilen Kukurbitasin D ve I'ya ait spektrumlar standard Kukurbitasin D ve I'nın spektrumları ile karşılaştırılarak elde edilen kukurbitasinlerin saflık dereceleri belirlenmiştir. Şekil 4.25 ve 4.26'da standard ve izole edilen Kukurbitasin D pikinin 11 farklı dalga boyundaki kromatogramları karşılaştırılmıştır. İzole edilen Kukurbitasin D'nin kromatogramında elde edilen simetrik görüntünün standardın kromatogramındaki gibi olması pikin yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. Saflık derecesi için ise Şekil 4.27 ve 4.28'deki saflık spektrumları incelendiğinde; pikin başlangıç ve bitiş noktaları arasında saflık çizgisinden sapma olmadığı görülmektedir. Bu pikin saflık indeksi 1,0000 olarak bulunmuştur. Şekil 4.29 ve 4.30'daki standard ve izole edilen Kukurbitasin D'nin UV spektrumlarına bakıldığında aynı dalga boyunda maksimuma sahip olmaları izole edilen maddenin Kukurbitasin D olduğunu açıkça göstermektedir. Standard ve izole edilen Kukurbitasin D'nin aynı kromatografik koşullarda HPLC ile elde edilen piklerinin Şekil 4.31'de aynı kromatogram üst üste karşılaştırılmış görüntüsü ile izole edilen kukurbitasin türünün Kukurbitasin D olduğunu daha net göstermektedir.



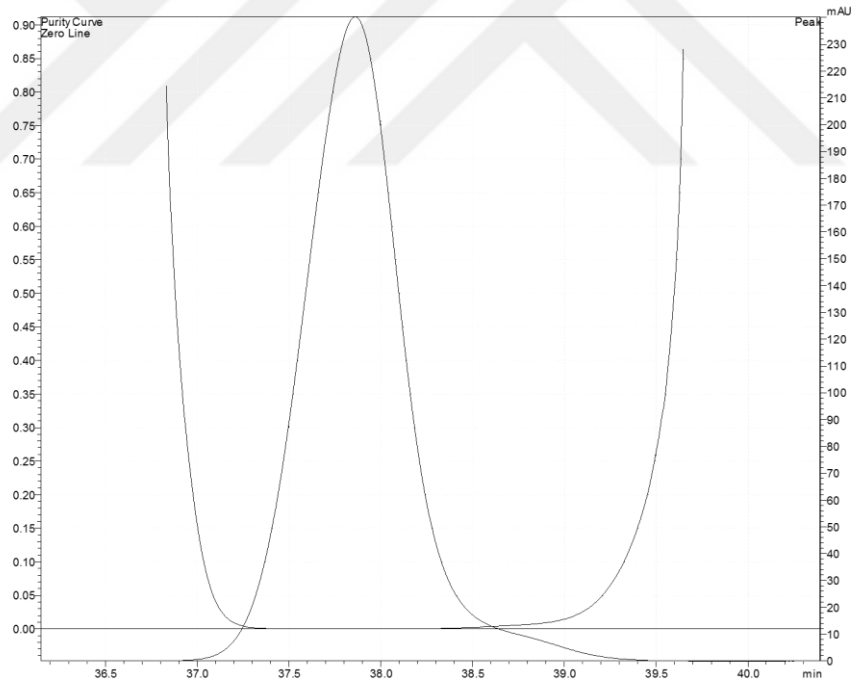
Şekil 4.25. Standard Kukurbitasin D'nin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları



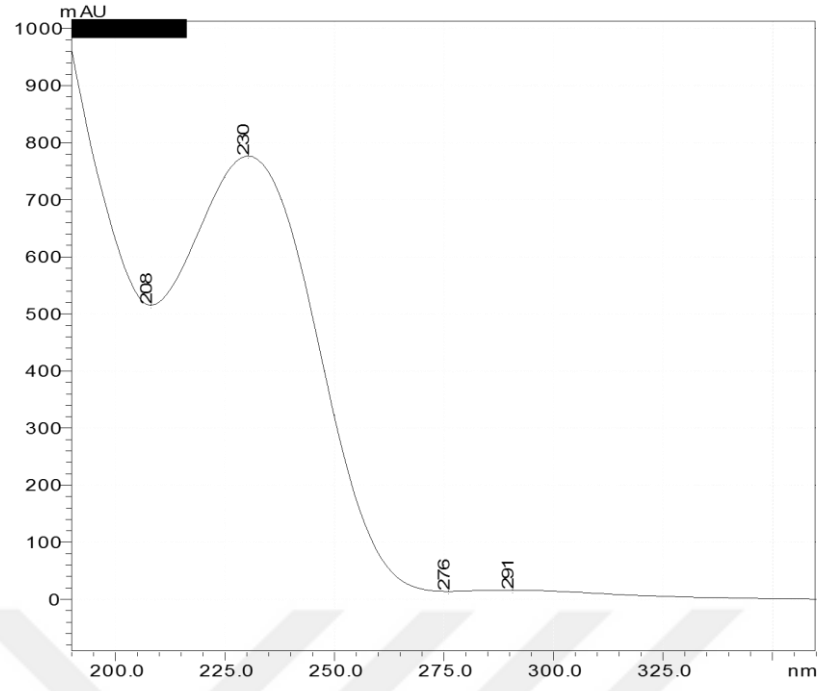
Şekil 4.26. İzole edilen Kukurbitasin D'nin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramları



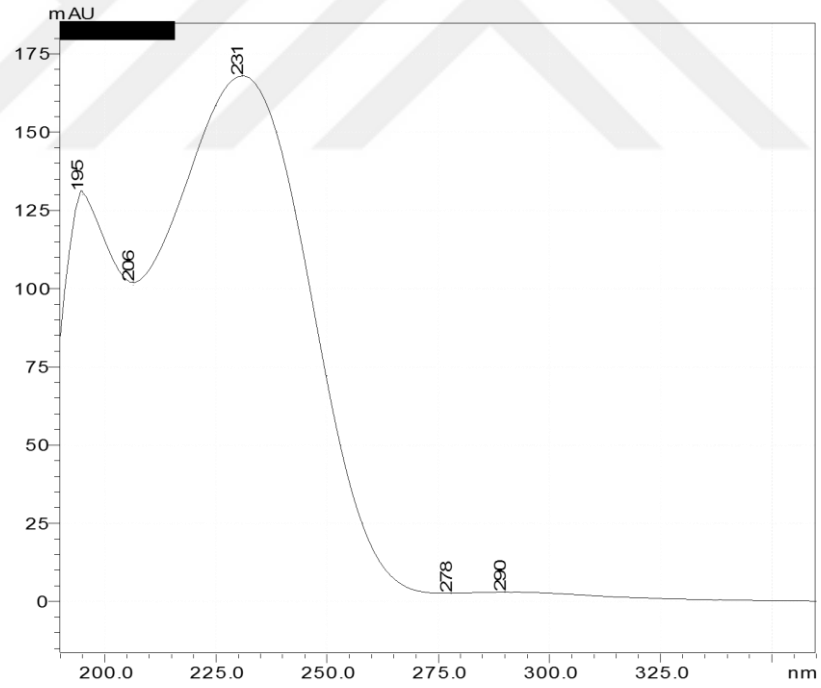
Şekil 4.27. Standard Kukurbitasin D'nin saflık spektrumu



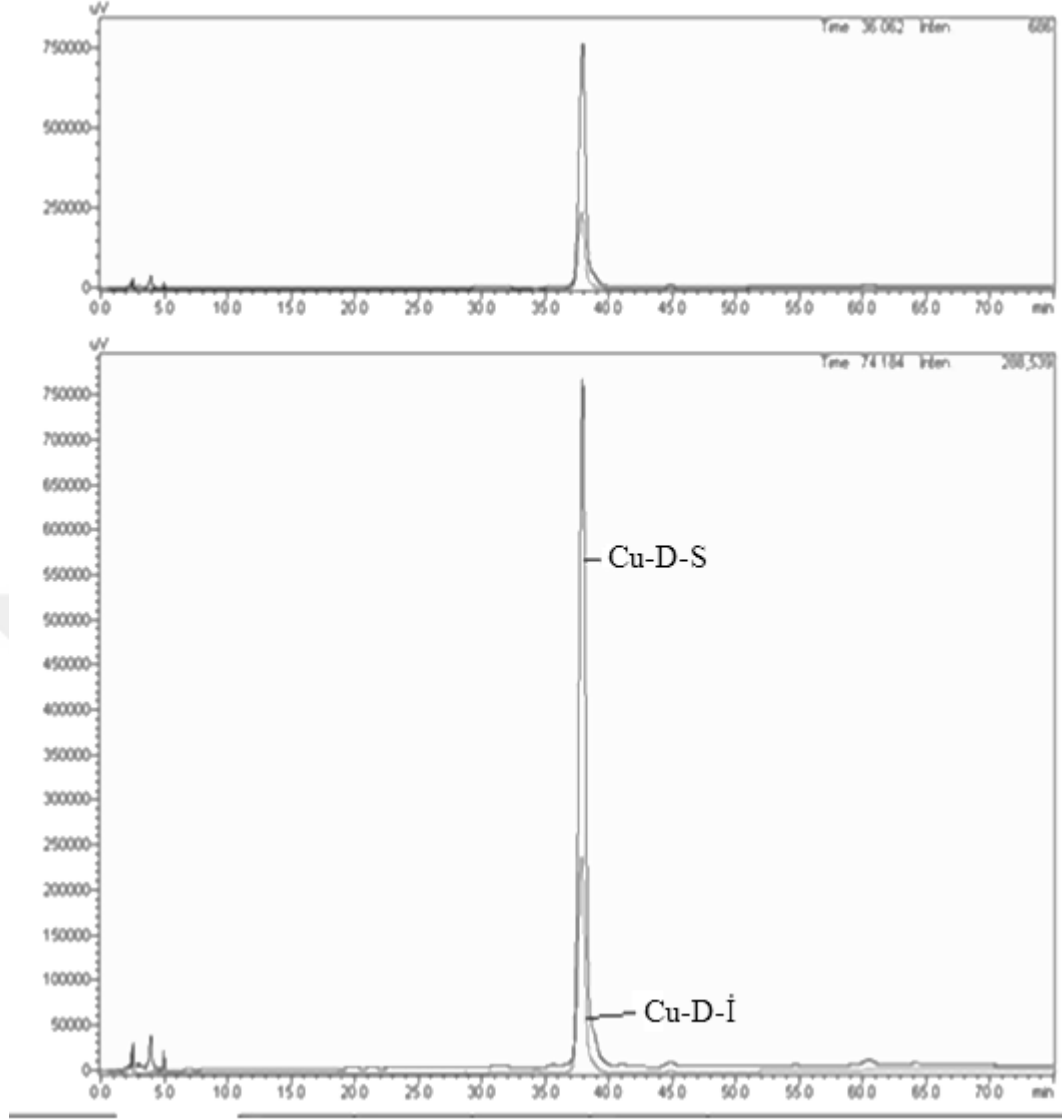
Şekil 4.28. İzole edilen Kukurbitasin D'nin saflık spektrumu



Şekil 4.29. Standart Kukurbitasin D pikinin UV spektrumu

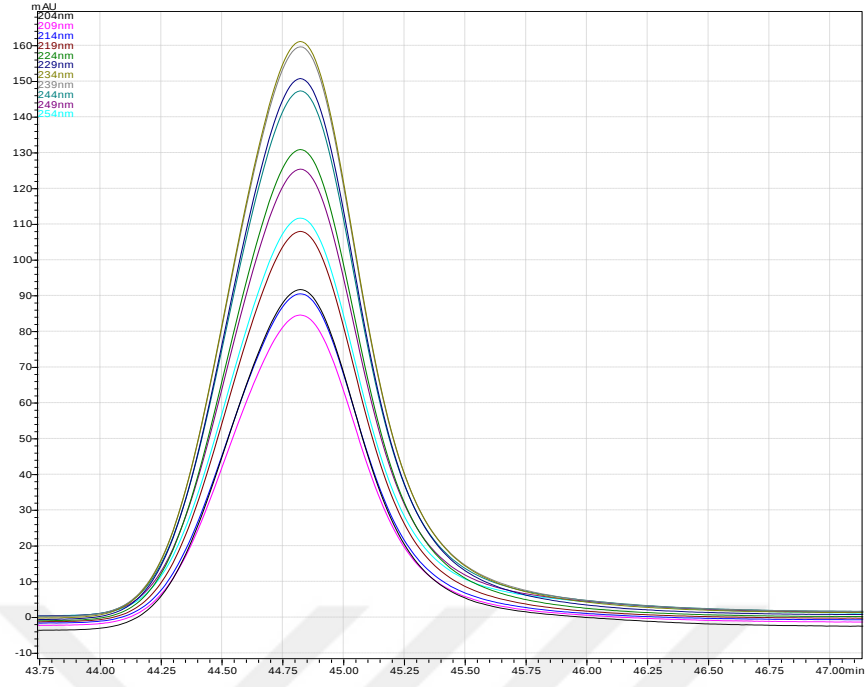


Şekil 4.30. İzole edilen Kukurbitasin D pikinin UV spektrumu

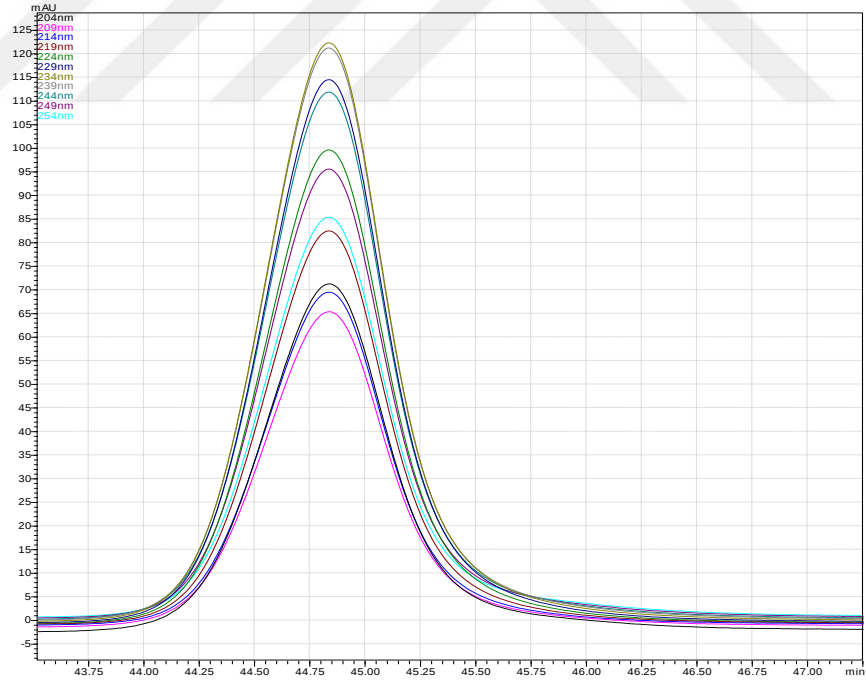


Şekil 4.31. Standart ve izole edilen Kukurbitasin D piklerinin karşılaştırıldığı kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, Cu-D-S – Standart Kukurbitasin D ve Cu-D-İ – İzole Edilen Kukurbitasin D)

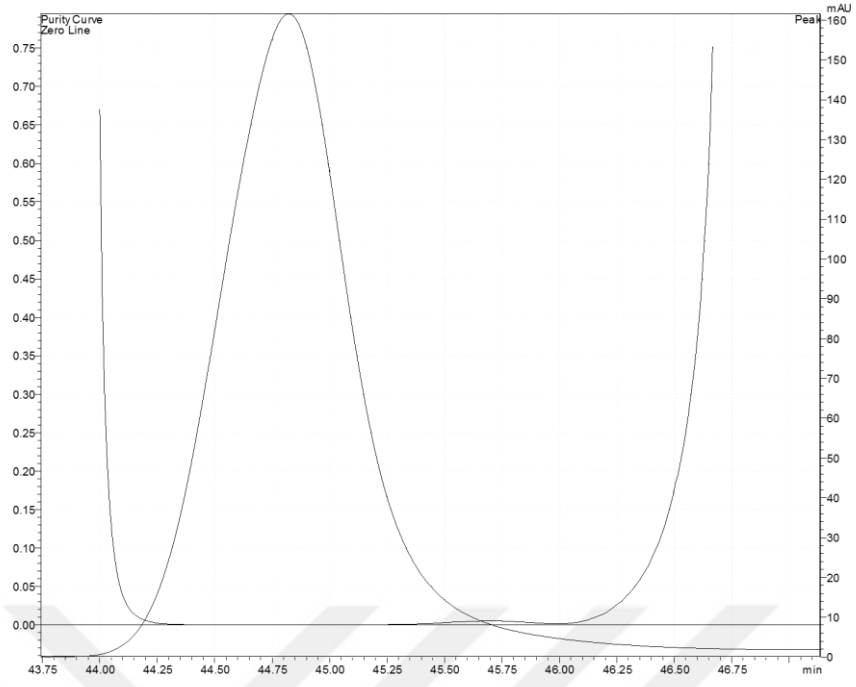
Aynı şekilde, standart ve izole edilen Kukurbitasin I pikinin de 11 farklı dalga boylarındaki kromatogramları karşılaştırıldığında pikin yüksek saflıkta olduğu Şekil 4.32 ve 4.33’de görülen simetrik görüntüden anlaşılmaktadır. Saflık derecesi ise Şekil 4.34-35’deki standart ve izole edilen Kukurbitasin I’nın saflık spektrumu incelendiğinde; pikin başlangıç ve bitiş noktaları arasında saflık çizgisinden sapma olmadığı görülmektedir. Bu pikin saflık indeksi 0,9990 olarak bulunmuştur. Şekil 4.36-37’deki standart ve izole edilen Kukurbitasin I ’nin UV spektrumlarına bakıldığında her ikisinin de 235 nm dalga boyunda maksimuma sahip olduğu görülmektedir.



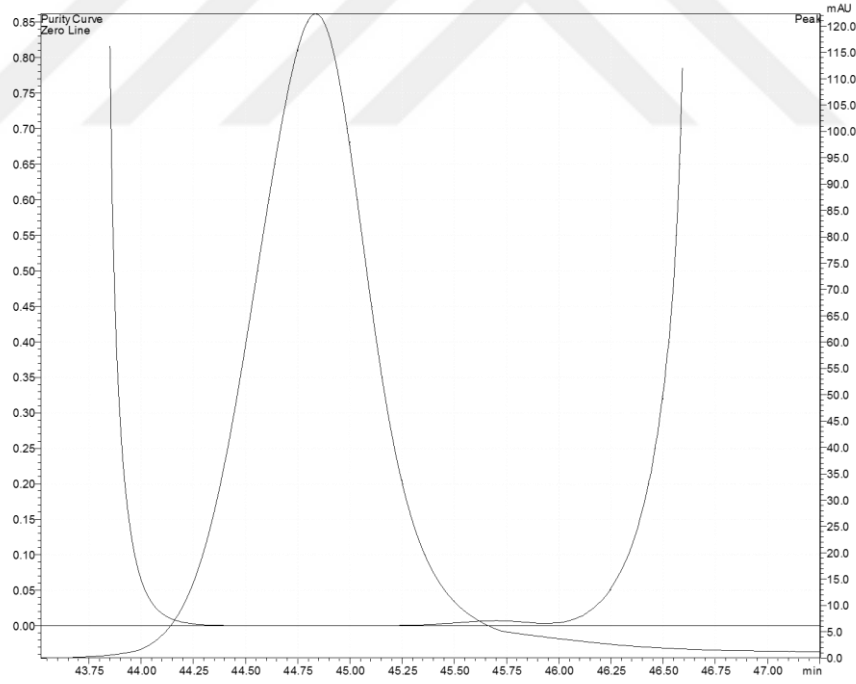
Şekil 4.32. Standart Kukurbitasin I pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramlarının görüntüsü



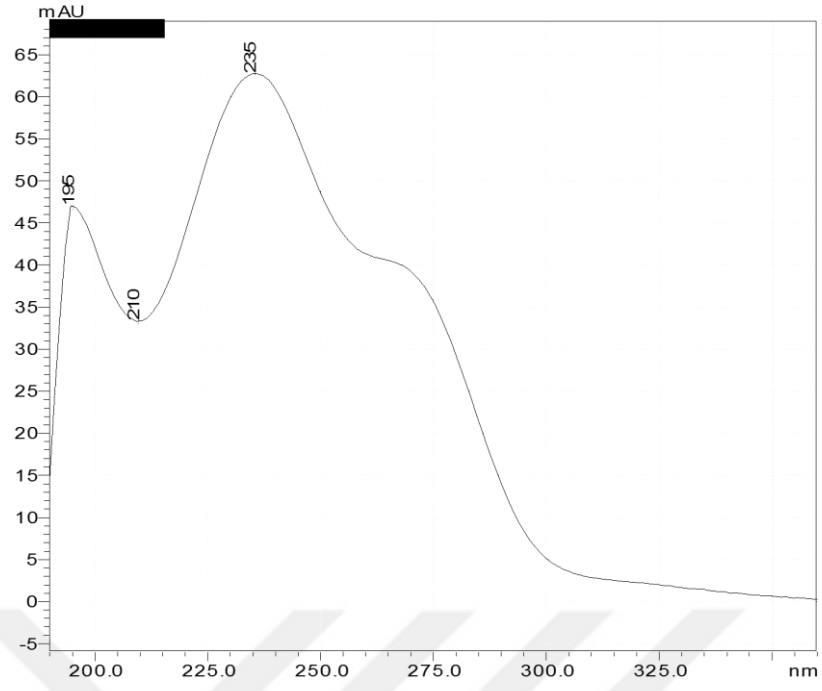
Şekil 4.33. İzole edilen Kukurbitasin I pikinin 204-254 nm dalga boyu aralığında 5 nm aralıkla kaydedilen kromatogramlarının görüntüsü



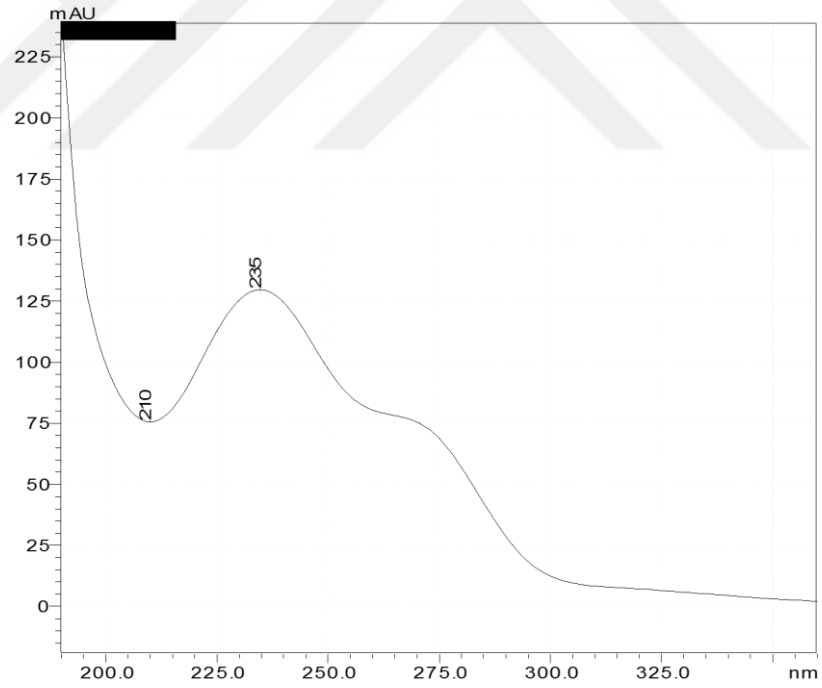
Şekil 4.34. Standart Kukurbitasin I pikinin saflık spektrumu



Şekil 4.35. İzole edilen Kukurbitasin I pikinin saflık spektrumu



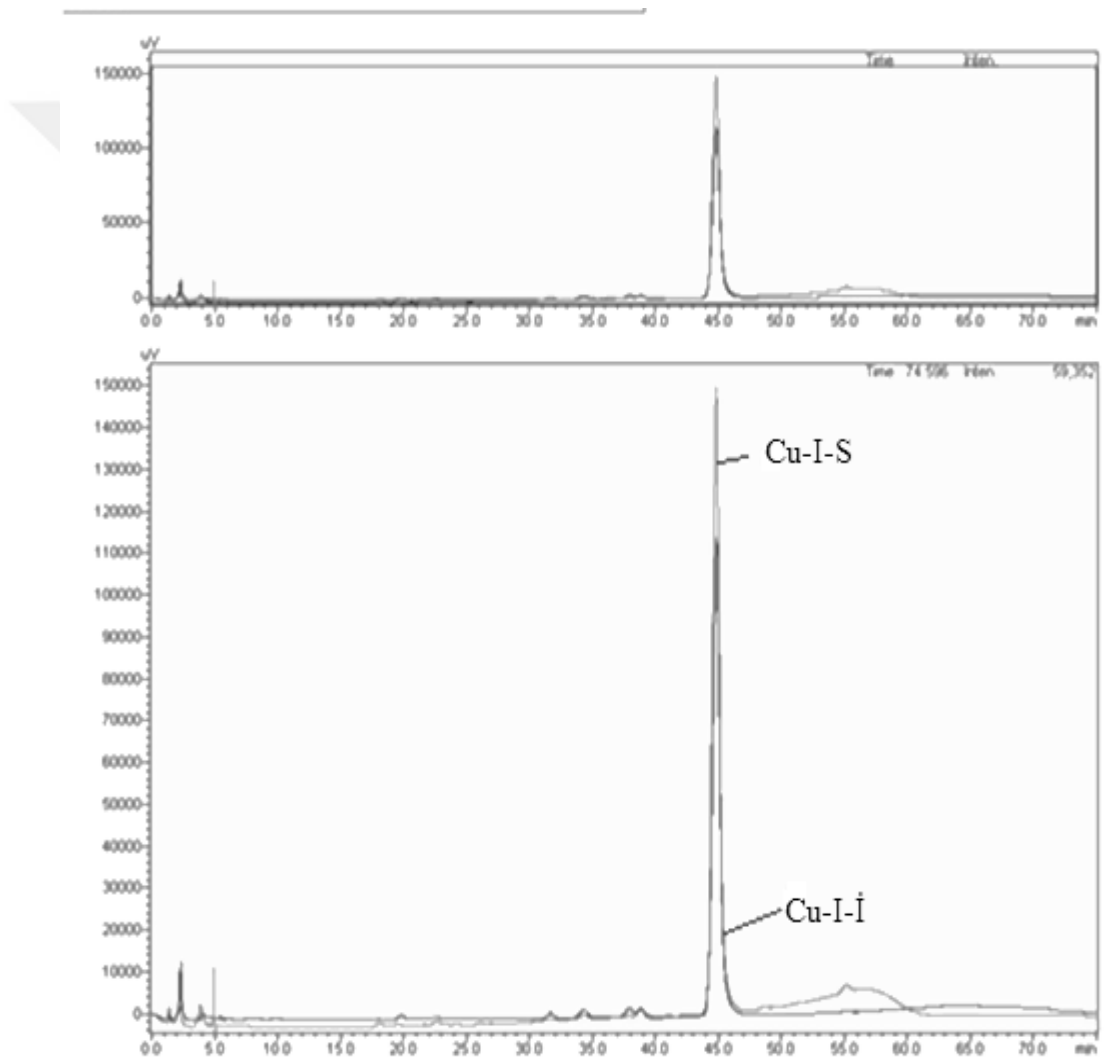
Şekil 4.36. Standart Kukurbitasin I pikinin UV spektrumu



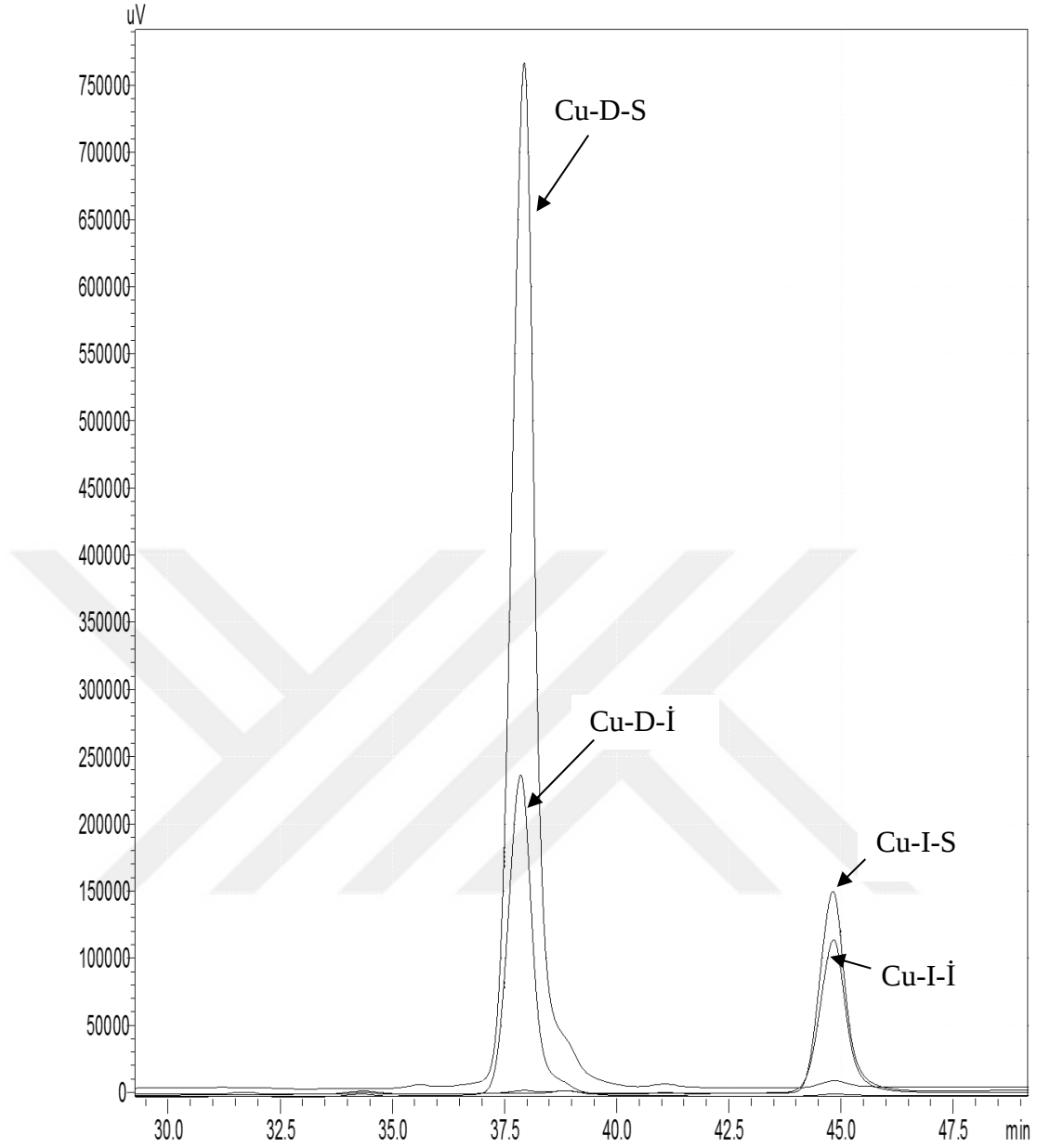
Şekil 4.37. İzole edilen Kukurbitasin I pikinin UV spektrumu

Standard ve izole edilen Kukurbitasin I'nın aynı kromatografik koşullarda HPLC ile elde edilen piklerinin Şekil 4.38'de aynı kromatogram üst üste çakıştırılmış görüntüsü ile izole edilen kukurbitasin türünün Kukurbitasin I olduğunu daha net göstermektedir.

Standart ve izole edilen hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I'nın aynı kromatografik koşullarda HPLC ile elde edilen pikleri çakıştırılarak elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.31 ve 4.38'de ayrı ayrı verilmiştir. Şekil 4.39'da ise her iki kukurbitasin türünün çakıştırılmış pikleri aynı kromatogramda gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Standart ve izole edilen Kukurbitasin I piklerinin çakıştırıldığı kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 °C; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, Cu-I-S – Standart Kukurbitasin I ve Cu-I-İ – İzole Edilen Kukurbitasin I)

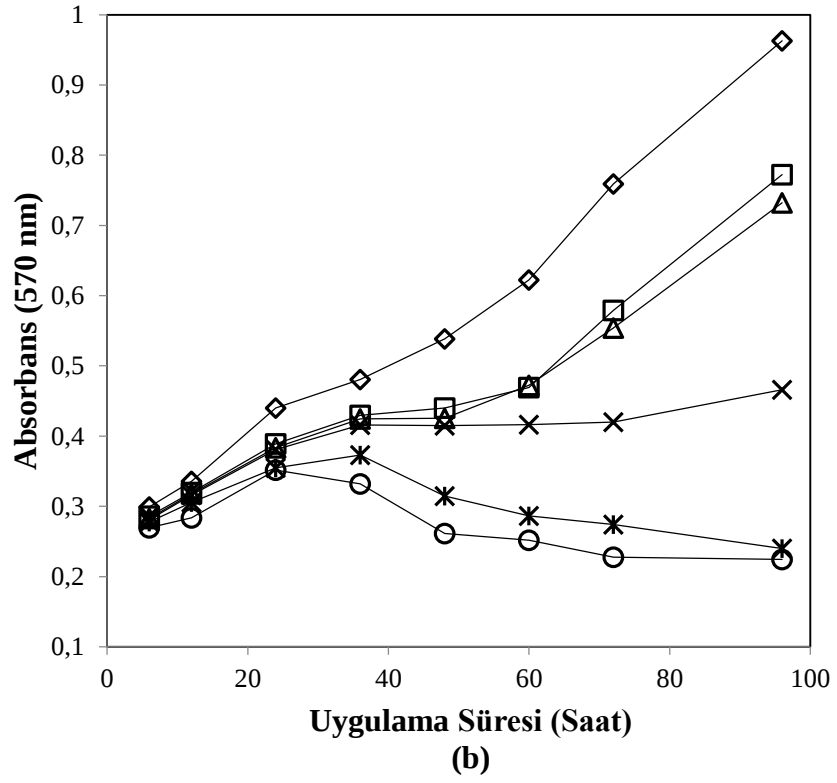
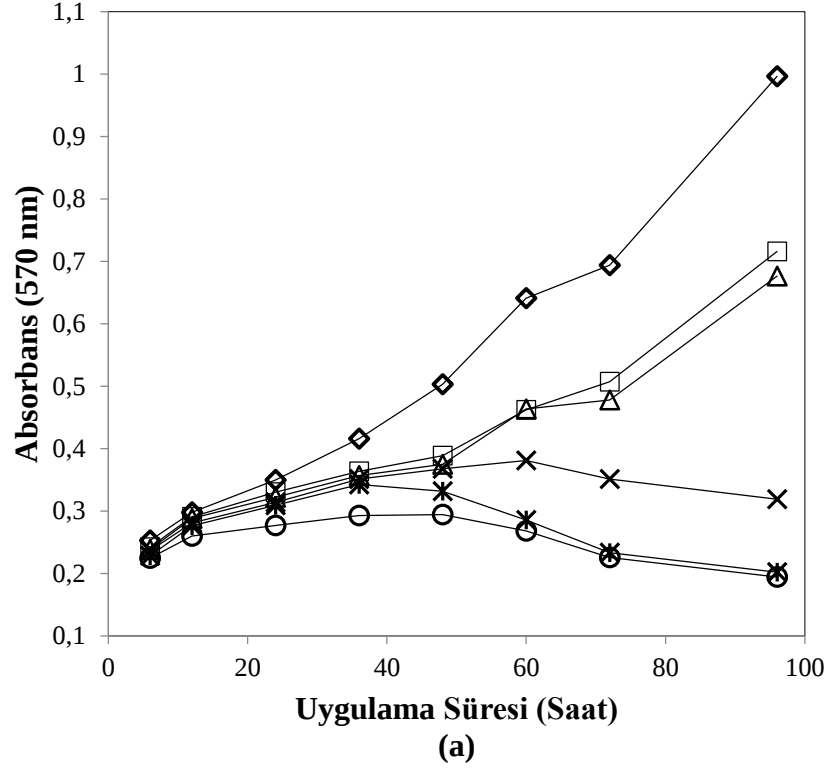


Şekil 4.39. Standart ve izole edilen Kukurbitasin D ve I piklerinin birlikte karşılaştırıldığı kromatogram (Gradient elüsyon: % ACN/Su (45:55): 0. dk; %10, 0-60 dk; %100, 60-70 dk; %100, 70-75 dk; %10, akış hızı 0,75 mL/dk; sıcaklık 40 oC; enjeksiyon hacmi 10 µL; dalga boyu 229 nm, Cu-D-S; Kukurbitasin D Standardı, Cu-D-İ; İzole edilen Kukurbitasin D, Cu-I-S; Kukurbitasin I Standardı, Cu-I-İ; İzole edilen Kukurbitasin I)

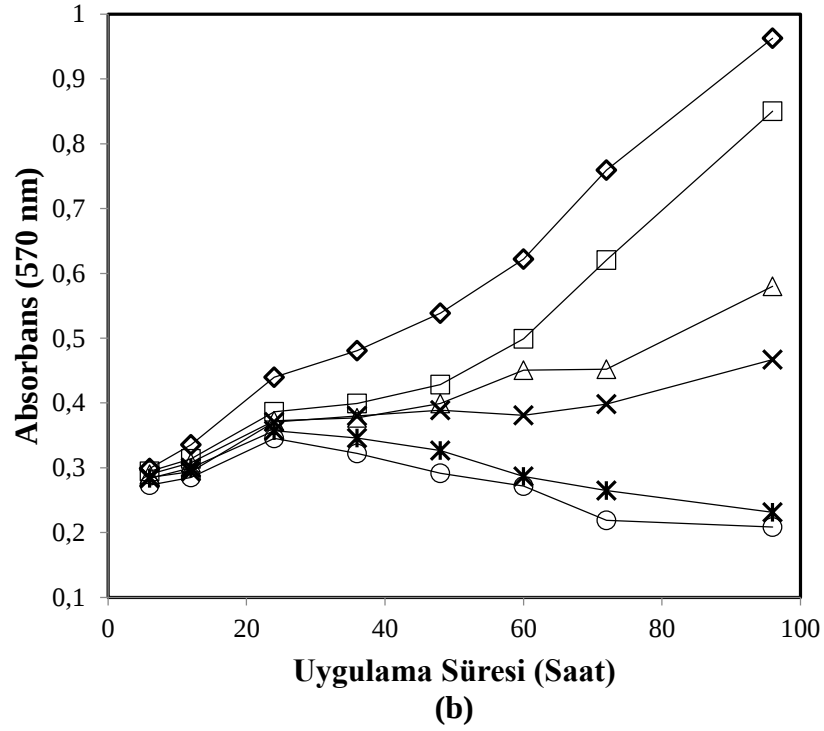
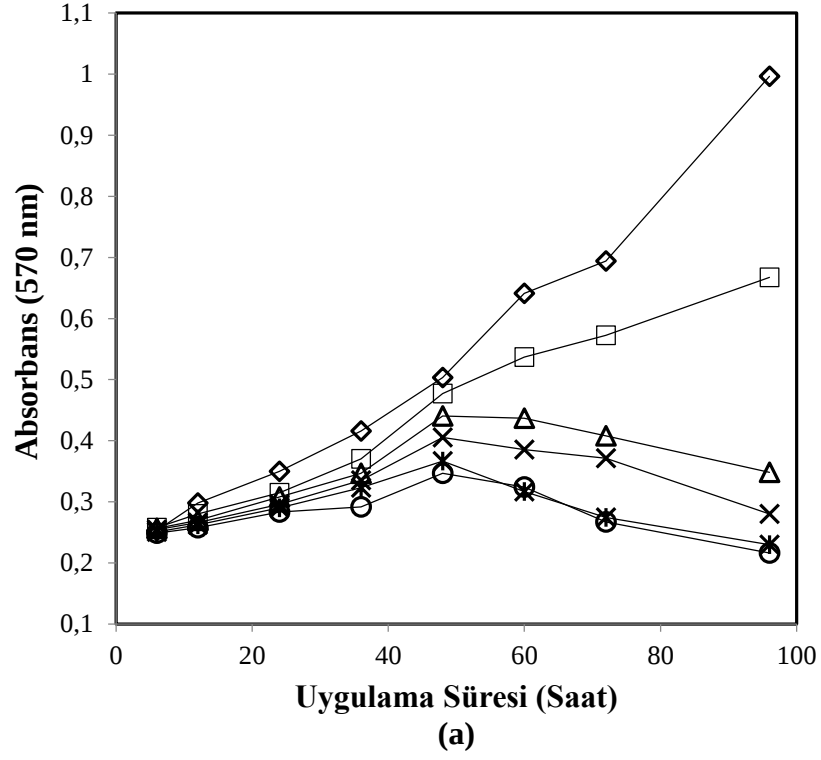
4.6. MTT Proliferasyon Test Sonuçları

Kukurbitasin D ve I'nın LS174T ve SW620 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini in vitro belirlemek için MTT yöntemi uygulandı. MTT deneylerinde; LS174T ve SW620 canlı hücreleri izole edilen Kukurbitasin D ve I'ya maruz bırakılarak formazan MTT molekülünün enzimatik azalımına dayanarak spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve absorbans değerleri alınmıştır.

Çalışmada 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 4000 hücre/100 µL olacak şekilde hücrelerin ekimi yapılmış ve 24 saat inkübasyonları sonrasında üzerlerine izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın değişen konsantrasyonları (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) eklenmiştir. 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96 saatlik uygulama süreleri sonrasında her bir kuyucuğa 10 µL MTT belirteci konularak 4 saat boyunca 37°C'da bekletilmiş, mavi-mor formazon kristalleri oluşumunu takiben isoprpanol/HCl çözülerek 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Bu absorbans değerleri kullanılarak elde edilen-LS174T ve SW620 hücrelerine farklı sürelerde Kukurbitasin D ve I uygulaması sonrası- konsantrasyon-absorbans eğrileri Şekil 4.40 ve Şekil 4.41'de gösterilmiştir. Kontrol grubu kanser hücrelerine Kukurbitasin D ve I uygulanmamış, bu hücrelere sadece besiyer ortamı olan RPMI 1640 besiyer verilmiştir. Şekiller incelendiğinde, Kukurbitasin D ve I'nın LS174T ve SW620 hücreleri üzerine konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda (5 ve 25 nM) kontrol grubuna paralel bir çoğalma gerçekleşirken yüksek konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 nM) kısa uygulama sürelerinde yine kontrole göre paralel bir eğri elde edilirken uygulama süresi arttığında bu paralellikten oldukça sapmalar olmuştur. Bu durum, ortamdaki hücre çoğalmasının durması ve varolan hücrelerin ölmeye başlamasıyla açıklanabilir. Sözü edilen durumlar hem her iki hücre hattı hem her iki uygulama maddesi (Kukurbitasin D ve I) için de geçerlidir. Uygulama sonrası absorbans değerlerindeki düşüş Kukurbitasin D ve I'nın hücre çoğalmasını negatif yönde etkilediğini göstermektedir. Yani antiproliferatif etki gösterdiğinin açık kanıtıdır. Yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşen hücre ölümü ise sitotoksik etkinin bir sonucudur.



Şekil 4.40. Kukurbitasin D konsantrasyonuna bağlı olarak (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin proliferasyonunun uygulama süresi ile değişimi (◇ Kontrol, ◻ 5 nM, △ 25 nM, × 50 nM, ✱ 100 nM, ○ 250 nM)



Şekil 4.41. Kukurbitasin I konsantrasyonuna bağlı olarak (a) LS174T ve (b) SW620 hücrelerinin proliferasyonunun uygulama süresi ile değişimi (◇ Kontrol, □ 5 nM, △ 25 nM, × 50 nM, ✱ 100 nM, ○ 250 nM)

4.6.1. Hücre çoğalma kinetiği model parametre değerlerinin belirlenmesi

Kontrol gruplarının ve Kukurbitasin D ve I uygulanan LS174T ve SW620 kanser hücrelerinin çoğalma kinetiğini temsil edecek eşitlikleri belirlemek için ilk olarak, MTT testleri sonucu elde edilen absorbans değerlerinin ($N(t)$; $N(t)=\text{Absorbans}$ (570 nm)) zamana karşı grafiğe geçirildiği grafikler (Şekil 4.40-41) incelendi. İncelenen eğrilerin üç gruba ayrılabilceği görüldü. Birinci grupta Kukurbitasin D ve I uygulaması yapılamayan kontrol grubu LS174T ve SW620 hücreleri, ikinci grupta düşük konsantrasyonda (5, 25 nM) hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I uygulaması yapılan LS174T ve SW620 hücreleri, üçüncü grupta ise yüksek konsantrasyonda Kukurbitasin D ve Kukurbitasin I uygulaması yapılan LS174T ve SW620 hücrelerinin çoğalma eğrileri yer almaktadır. Birinci grupta yer alan eğrileri temsil eden eşitlikler literatürdeki büyüme modelleri esas alınarak oluşturuldu. Bu eşitliklerde yer alan parametreler direk optimizasyon yöntemi ile belirlendi. İkinci grupta yer alan eğriler birinci gruptaki eğrilere paralel olup benzer çoğalmı göstermektedir. Fakat ortama Kukurbitasin D ve I eklenmesinden sonra hücrelerin bu yeni ortama alışmaları çoğalmı hızlarını değiştirdiğinden farklı bir modelleme yapıldı. Bu grup için belirlenen 25 nM konsantrasyonda bazı uygulama gruplarında apoptotik etkiler gözlemlendiğinden bu eğriler üçüncü gruba dahil edildi. Üçüncü grupta yer alan eğrilere apoptotik etkiler açıkça görüldüğünden bu gruptaki eğriler için yeni bir model oluşturuldu.

Birinci grupta yer alan eğrilerin zamanla değişimini bulmak için

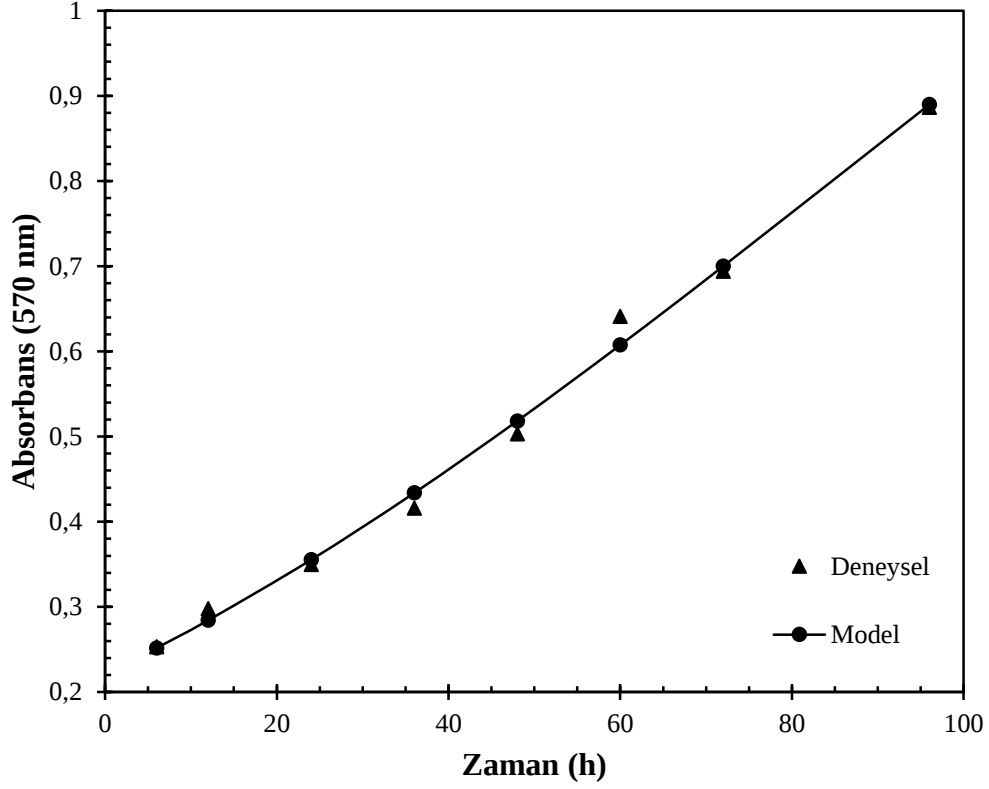
$$N(t) = N(0) * \exp(k * [1 - \exp(-b * t)]) \quad (2.5)$$

$$k = \log_e \left[\frac{N(\infty)}{N(0)} \right]$$

Gompertzian modeli kullanıldı. Burada, $N(\infty)$ ve $N(0)$ sırasıyla maksimum ve başlangıçtaki absorbans değerlerini ifade etmektedir. Deneysel verilerin modele uygunluğu ve parametre değerleri MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi ile belirlendi. Modelde deneysel verilerin kullanılması ile elde edilen eğri Şekil 4.42 ve 4.43’de, modelin performansını gösteren MAE, MAPE, RMSE ve R değerleri ise Tablo 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Şekillerde, deneysel sonuçlar ile modelden elde edilen değerlerin örtüştüğü görülmektedir. Dolayısıyla, LS174T ve SW620 kolon

kanser hücrelerinin çoğalımı bu modele uymaktadır. Tablo 4.1 ve 4.2'deki performans değerleri de bu uygunluğu doğrulamaktadır.

$$N(t) = N(0) * \exp(k * [1 - \exp(-b * t)])$$

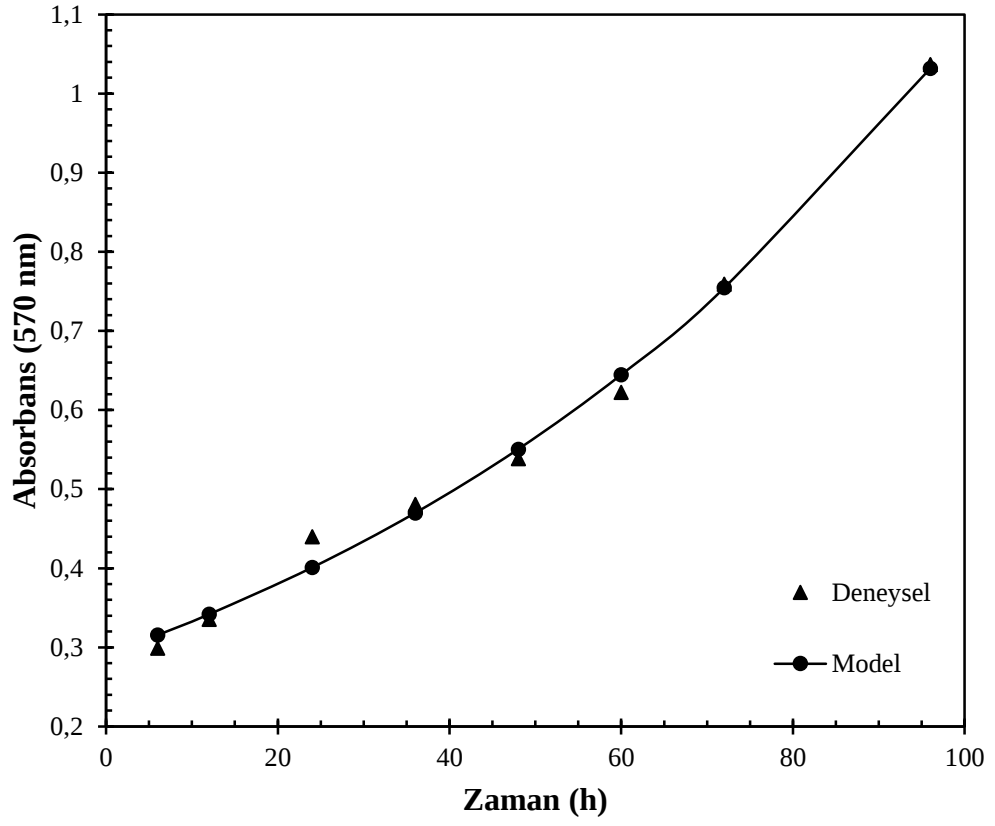


Şekil 4.42. LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

Tablo 4.1. LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri

Performans Değerleri	Parametre Değerleri
MAE = 0,0120	N(0) = 0,2214
MAPE = 2,5346	k = 2,3339
RMSE = 0,0155	b = 0,0094
R = 0,9971	

$$N(t) = N(0) * \exp(k * [1 - \exp(-b * t)])$$



Şekil 4.43. SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

Tablo 4.2. SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri

Performans Değerleri	Parametre Değerleri
MAE = 0,0148	N(0) = 0,2867
MAPE = 3,0909	k = 4,0650
RMSE = 0,0179	b = 0,0037
R = 0,9963	

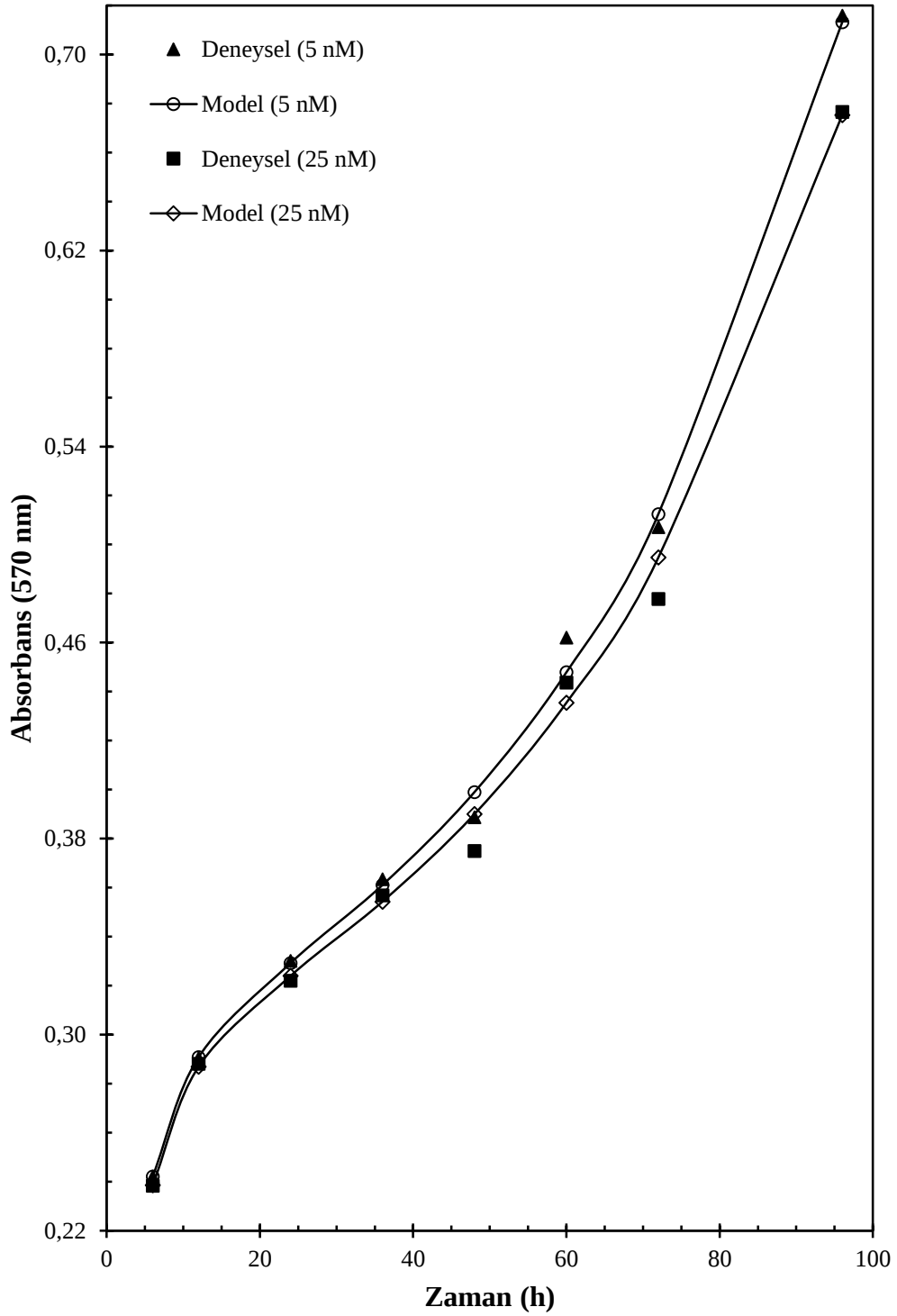
İkinci grupta yer alan düşük konsantrasyon (5-25 nM) eğrileri incelendiğinde birinci grupta yer alan kontrol grubu eğrilerinden farklılıklar gösterdiği görüldü. Dolayısıyla, aynı model eşitliğiyle bu eğrilerin ifade edilemeyeceği ve yeni bir modelin belirlenmesi gerektiği anlaşıldı. Fakat literatürde yer alan modellerin bu eğrilere uymadığı görüldü. Bu nedenle yeni bir model oluşturuldu. Parametre belirleme işlemlerinde olduğu gibi öncelikle model ve bu modelin içerdiği parametre sayısı belirlendi. Buna göre Eşitlik 4.2 ile verilen model önerildi.

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t) \quad (4.1)$$

Bu modelde yer alan birinci terim, çoğalmayı, ikinci terim ise uygulama sonrası ortama adaptasyon sürecini ifade etmektedir. Parametre sayısı ise bu iki durum için modelden alınan tahmin değerleri ile deneysel değerler arasındaki farkın minimum olması kriterine göre belirlenmiştir. ‘b ve d’ parametreleri çoğalma hızlarını ifade ederken ‘a ve c’ parametrelerinin ise iki ayrı durumdaki eğrilerin başlangıç değerleri olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, eğrilerdeki konkav veya konveks durumu ifade etmek için de zaman terimine bir üs ‘n’ parametresi eklenmiştir.

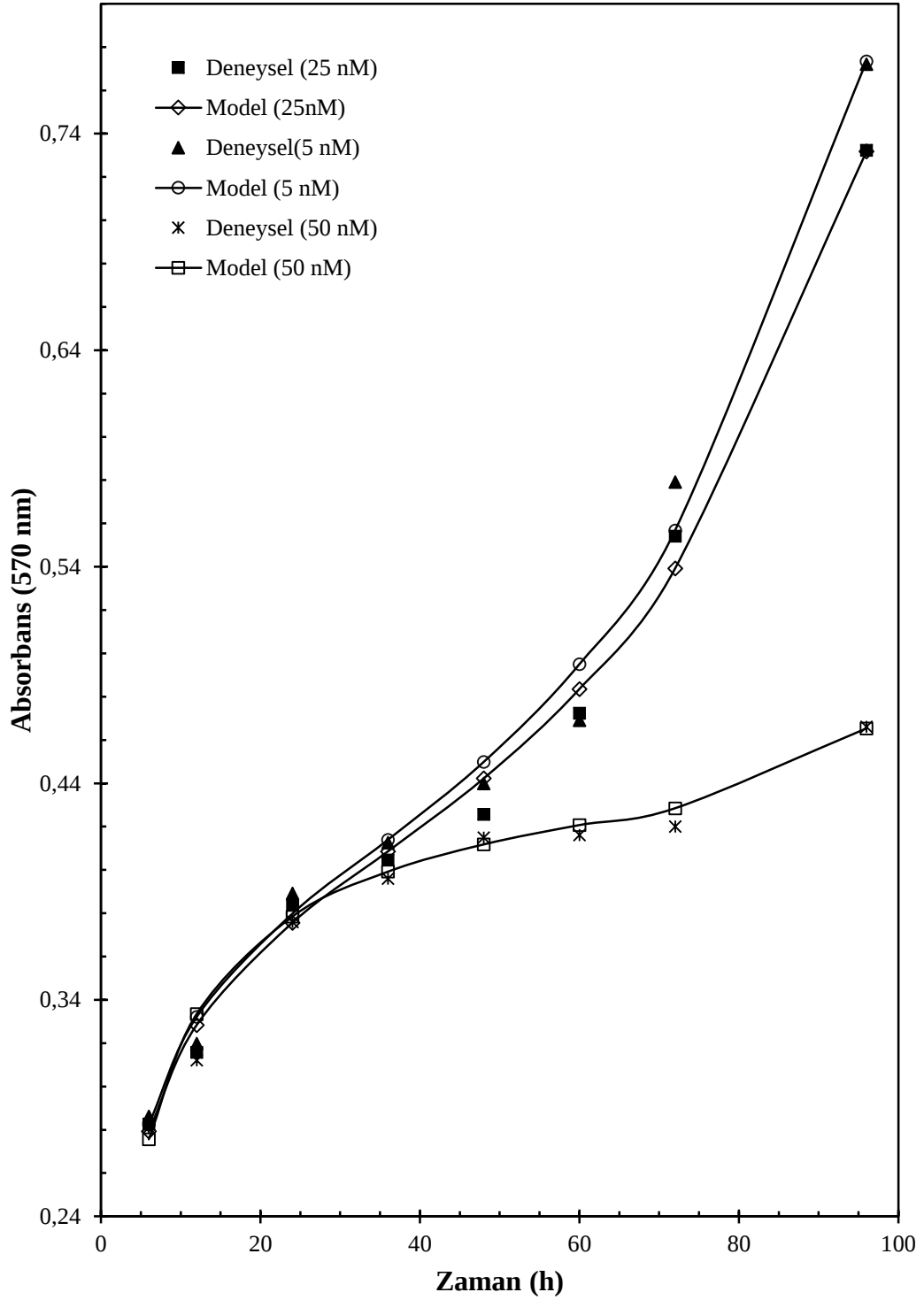
Parametrelerin değerleri, optimizasyonla bulunmuştur. Deneysel verilerin modele uygunluğu ve parametre değerleri MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi ile belirlenmiştir. Düşük konsantrasyon Kukurbitasin D ve I uygulamasından sonra deneysel aborbans değerlerinin model eşitliğinde yerine konulması ile oluşturulan eğriler Şekil 4.44-47’de verilmiştir. Modelde yer alan parametrelerin ve model performansını gösteren MAE, MAPE, RMSE ve R değerleri Tablo 4.3’de yer almaktadır. Çoğalma eğrileri incelendiğinde deneysel değerler ile model değerlerinin örtüştüğü açıkça görülmektedir. Ayrıca, performans değerleri de bu uygunluğu doğrulamaktadır.

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t)$$



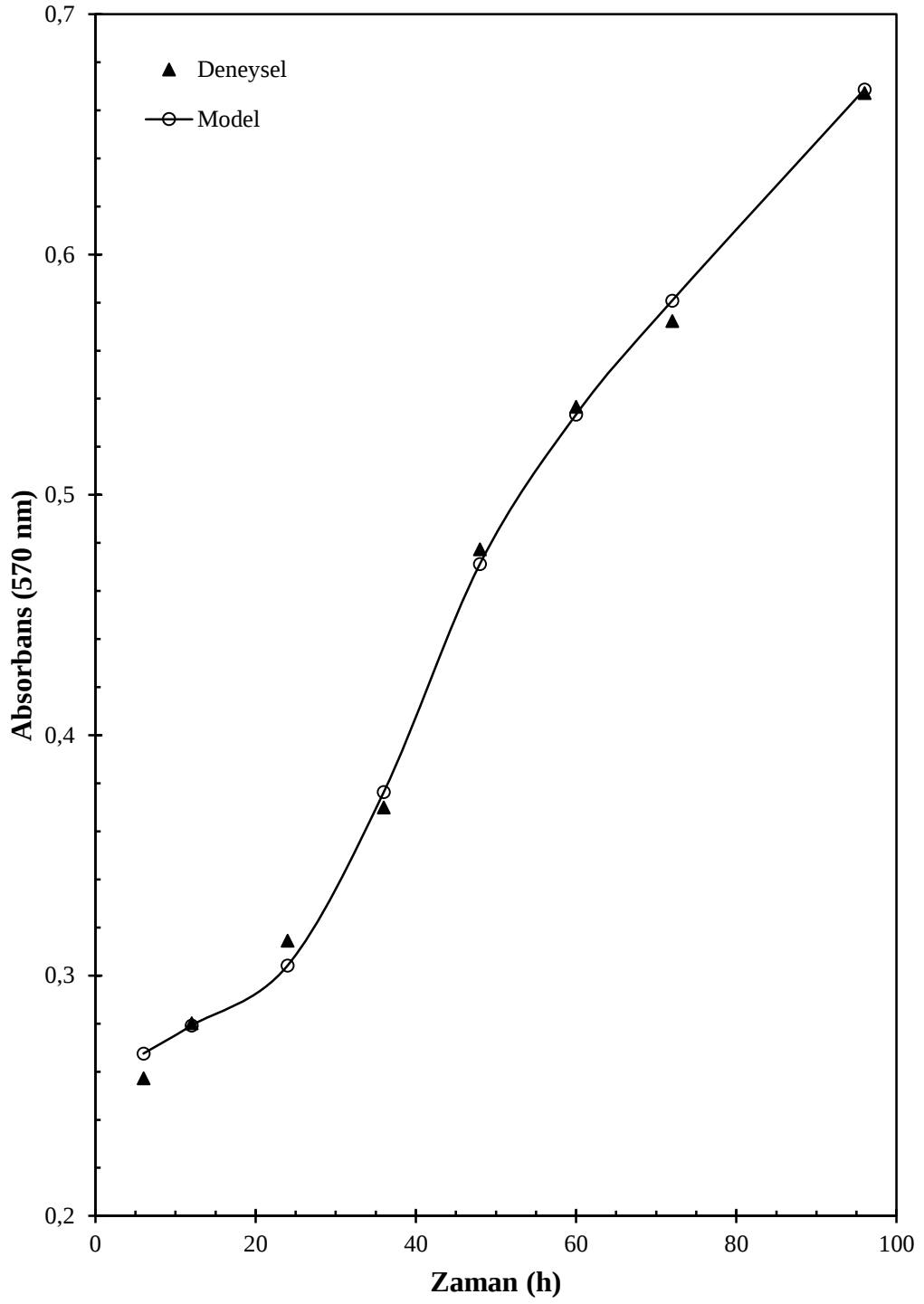
Şekil 4.44. 5 ve 25 nM Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t)$$



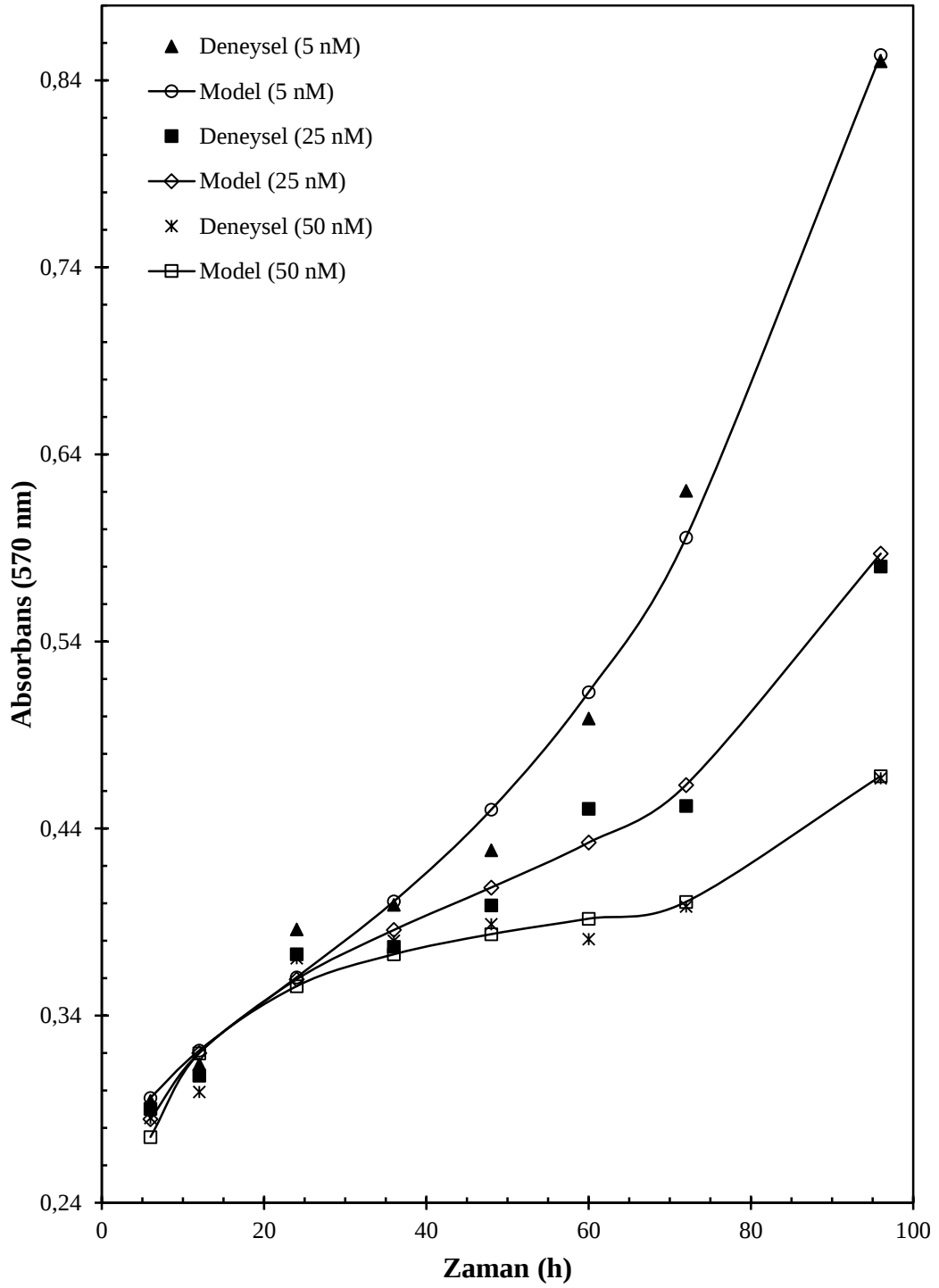
Şekil 4.45. 5, 25 ve 50 nM Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t)$$



Şekil 4.46. 5 nM Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t)$$



Şekil 4.47. 5, 25 ve 50 nM Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

Tablo 4.3. Kukurbitasin D ve I uygulanan LS174T ve SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri (Eşitlik 4.1)

$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t)$											
Uygulama Maddesi	Hücre Türü	Uygulama Konsantrasyonu (nM)	Model Parametreleri					Performans Değerleri			
			a	b	n	c	d	MAE	MAPE	RMSE	R
Kukurbitasin D	LS174T	5	0,2647	3,4339	-1,3223	0,0433	0,0244	0,0043	0,9945	0,0065	0,9989
		25	0,2576	3,7560	-1,3743	0,0448	0,0233	0,0085	1,9628	0,0128	0,9951
	SW620	5	0,4446	1,3375	-0,5230	0,0157	0,0332	0,0127	2,8902	0,0148	0,9947
		25	0,4574	1,3309	-0,4869	0,0140	0,0331	0,0103	2,4428	0,0115	0,9963
		50	0,4863	1,6326	-0,5895	0,00000059	0,1129	0,0074	2,0308	0,0095	0,9861
Kukurbitasin I	LS174T	5	0,1657	2745002,24	-4,0645	0,2564	0,0071	0,0058	1,6022	0,0068	0,9988
	SW620	5	0,700	1,2525	-0,0907	0,0469	0,0256	0,0127	2,7970	0,0159	0,9957
		25	10,5545	3,9348	-0,0470	0,0009	0,0530	0,0097	2,5409	0,0110	0,9918
		50	0,4571	1,2618	-0,5083	0,000002	0,1081	0,0097	2,9044	0,0122	0,9745

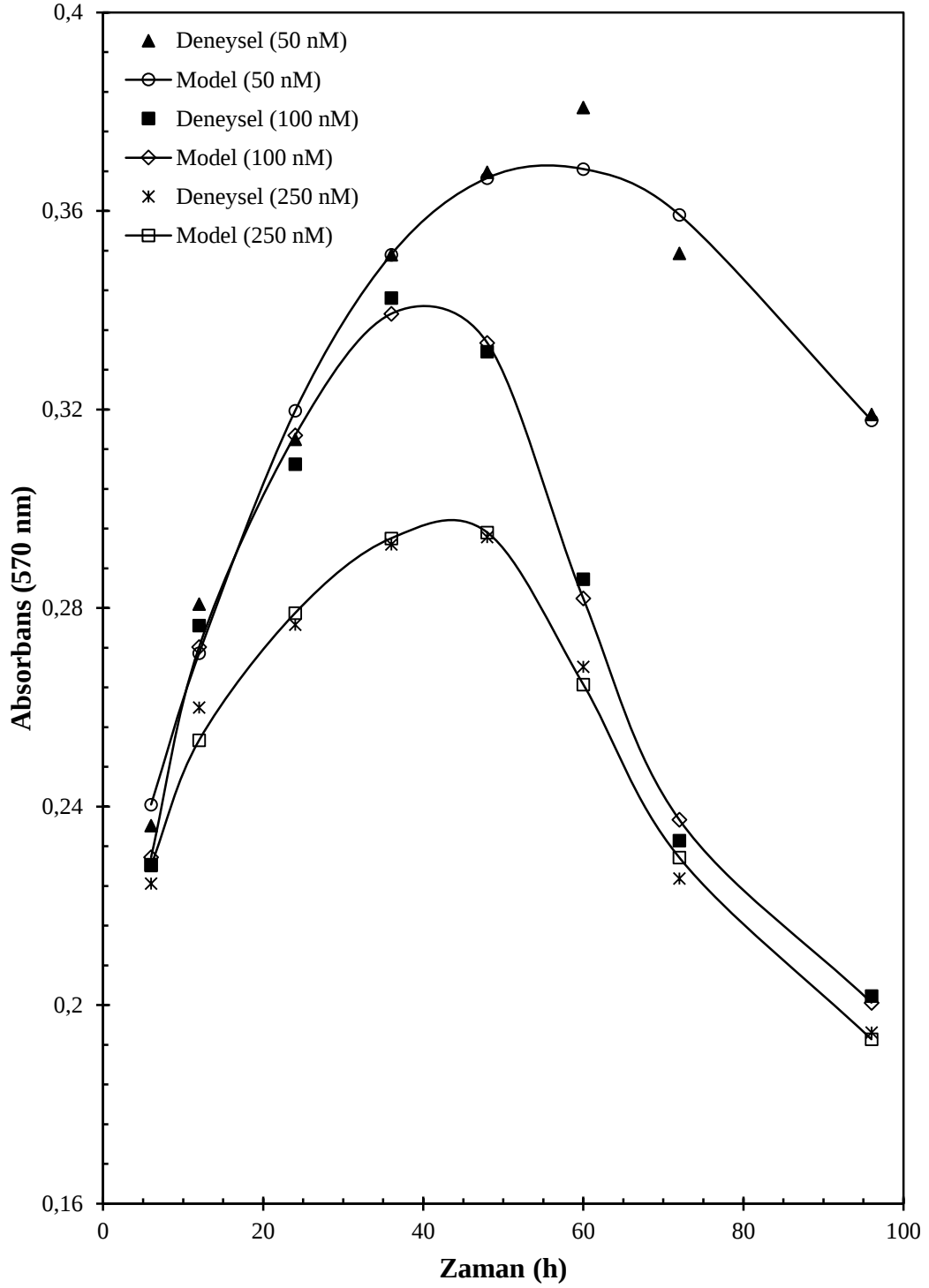
Üçüncü grupta yer alan yüksek konsantrasyon (50-250 nM) eğrileri incelendiğinde hem birinci grupta hem de ikinci gruptaki eğrilerden farklılıklar gösterdiği görüldü. Bu eğrilerde çoğalmanın durduğu ve hücre ölümlerinin gerçekleştiği açıkça anlaşılmaktadır. Bu nedenle hücrelerin ölüm hızını da ifade edecek yeni bir model oluşturulması gerektiği anlaşıldı. Diğer modelde (Eşitlik 4.1) olduğu gibi öncelikle modelin içerdiği parametre sayısı belirlendi. Buna göre Eşitlik 4.2 ile verilen model önerildi.

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m) \quad (4.2)$$

Bu modele göre, birinci terim hücre sayısındaki azalmayı, ikinci terim ise çoğalmayı ifade etmektedir. Parametre sayısı ise bu iki durum için modelden alınan tahmin değerleri ile deneysel değerler arasındaki farkın minimum olması kriterine göre belirlenmiştir. ‘b ve c*a’ parametreleri çoğalma ve ölüm hızlarını ifade ederken ‘a, n ve m’ parametreleri farklı deneyler için farklı değerlere sahip denklem sabitleridir. Çoğalma ve ölüm durumunda eğrilerdeki konkav veya konveks durumu ifade etmek için de zaman terimine bir üs ‘n ve m’ parametreleri eklenmiştir.

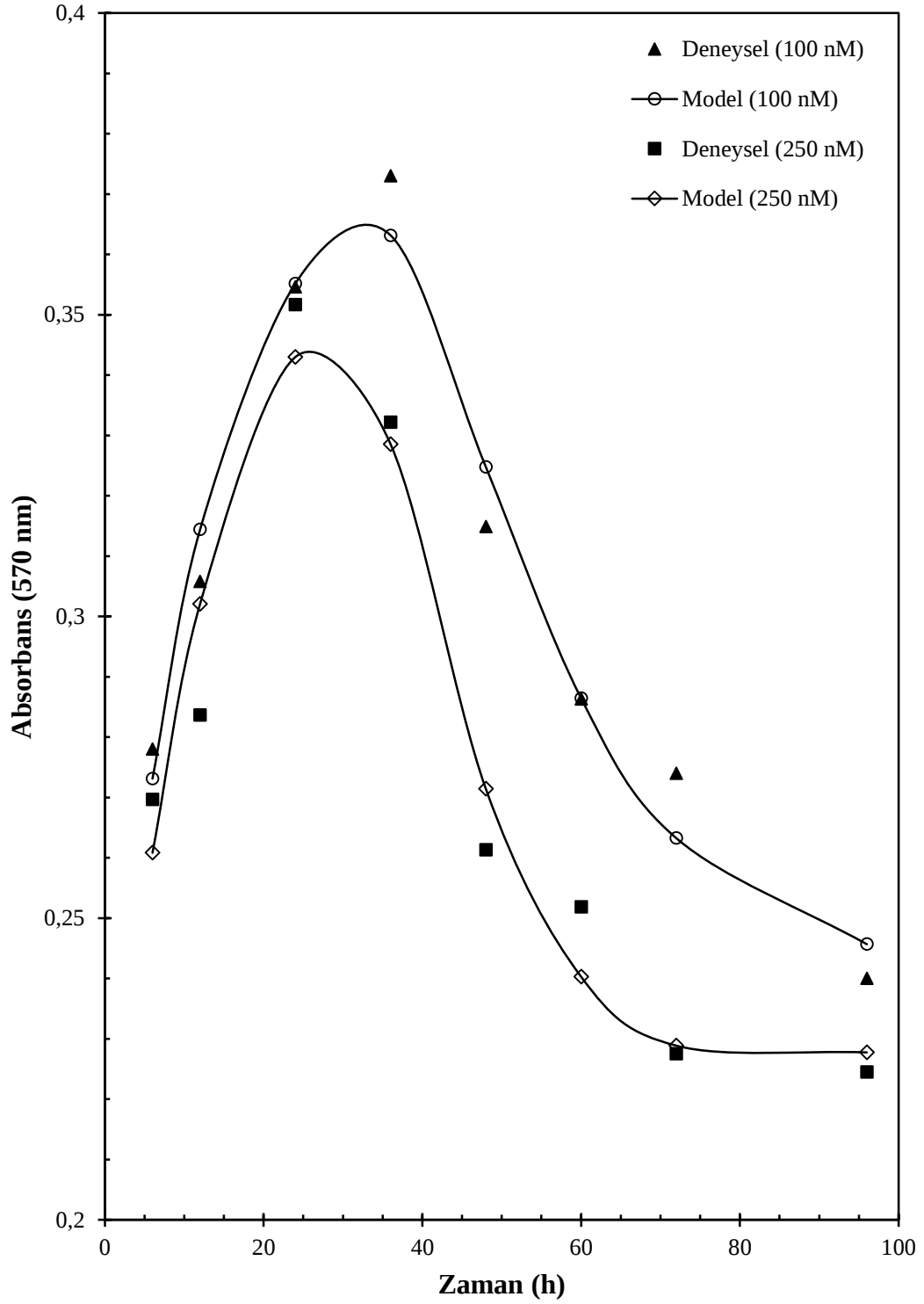
Parametrelerin değerleri optimizasyonla bulunmuştur. Deneysel verilerin modele uygunluğu ve parametrelerin değerleri MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi ile belirlendi. Modelde deneysel verilerin kullanılması ile elde edilen eğriler Şekil 4.48-51’de verilmiştir. Model parametre değerleri ve model performansını gösteren MAE, MAPE, RMSE ve R değerleri de Tablo 4.4’de yer almaktadır. % inhibisyon hızı eğrileri incelendiğinde deneysel değerler ile model değerlerinin örtüştüğü görülmektedir.

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m)$$



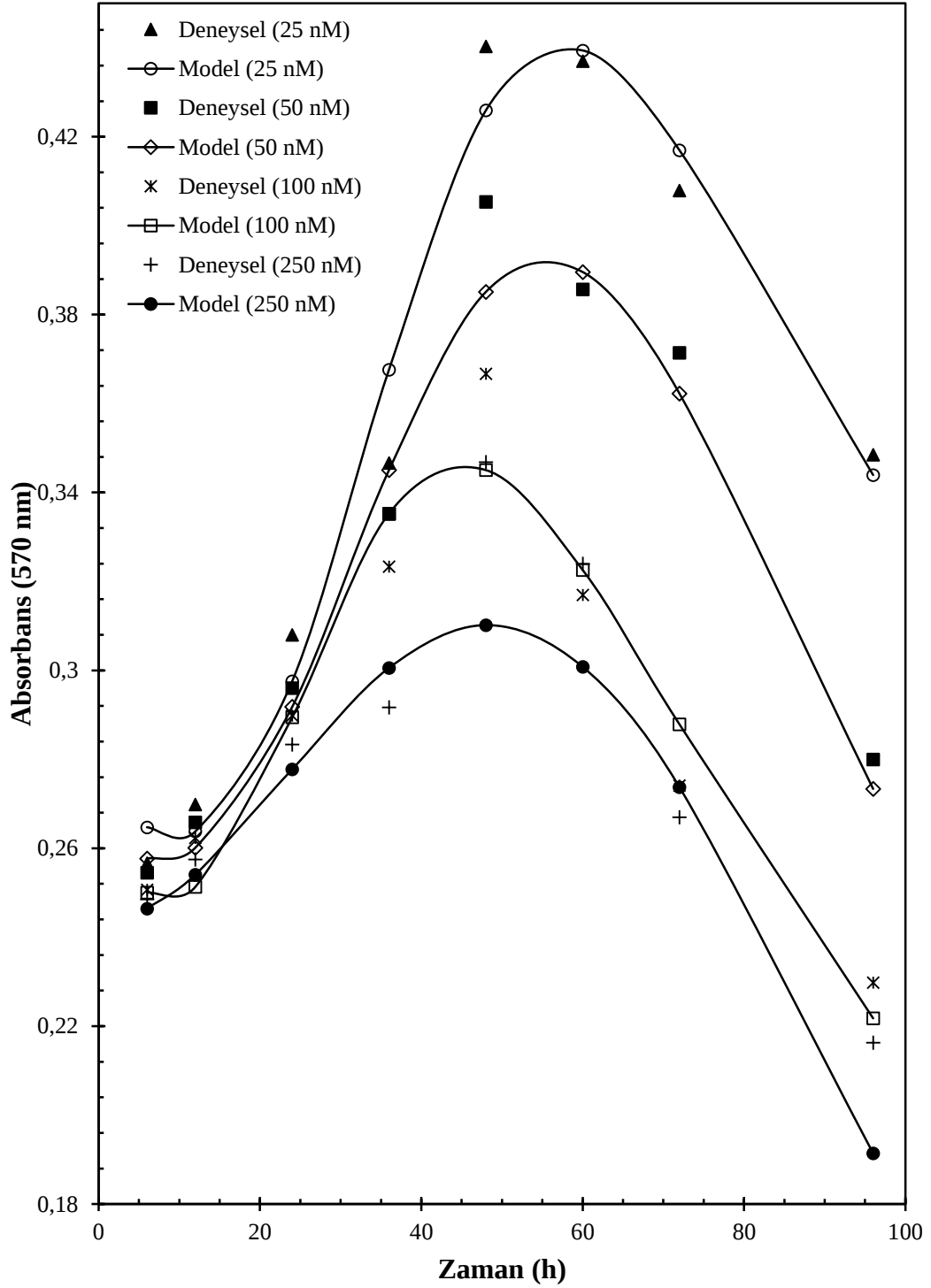
Şekil 4.48. 50, 100 ve 250 nM Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m)$$



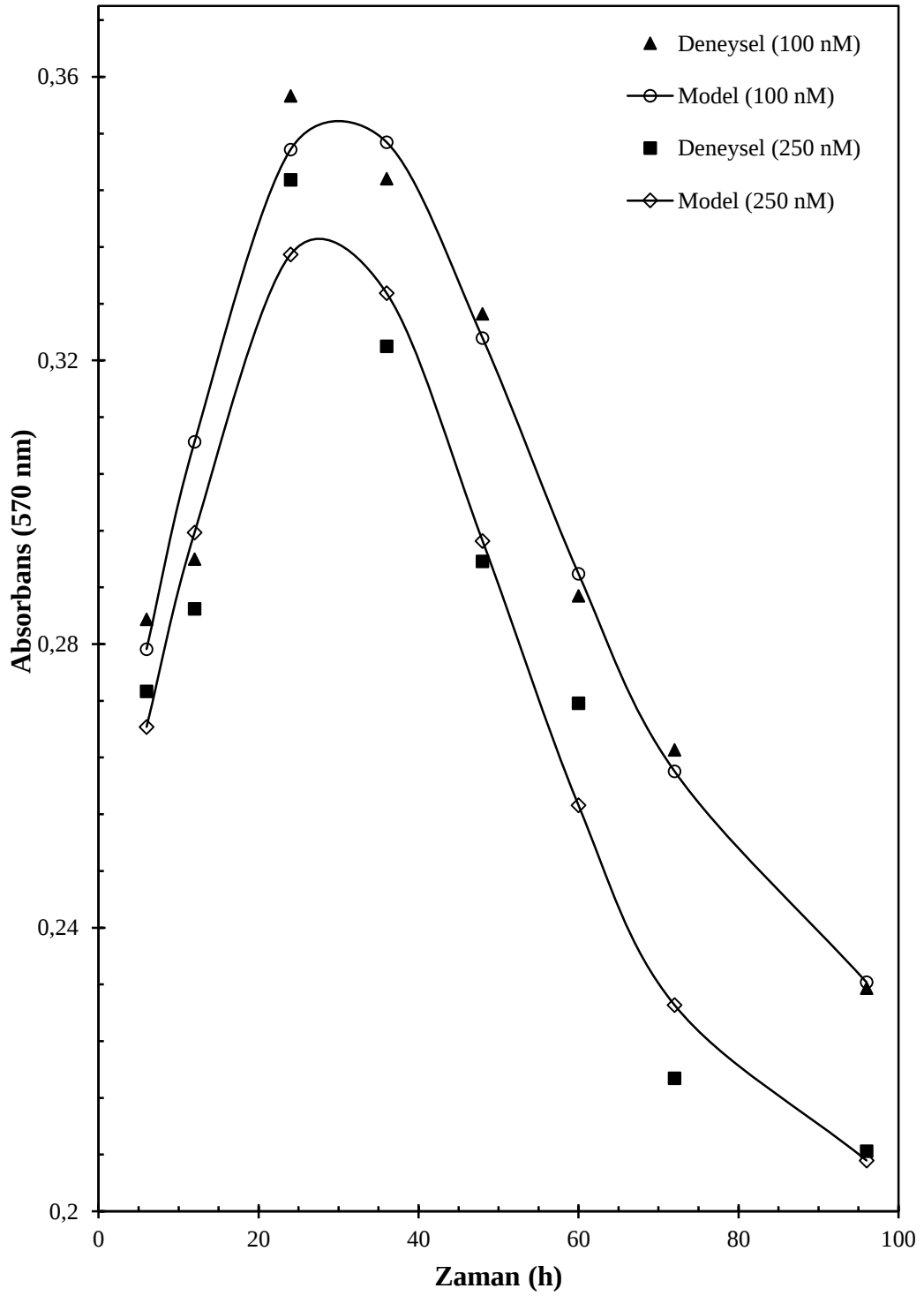
Şekil 4.49. 100 ve 250 nM Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m)$$



Şekil 4.50. 25, 50, 100 ve 250 nM Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m)$$



Şekil 4.51. 100 ve 250 nM Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiği grafiği

Tablo 4.4. Kukurbitasin D ve I uygulanan LS174T ve SW620 hücrelerinin çoğalım kinetiğine ait performans ve parametre değerleri (Eşitlik 4.2)

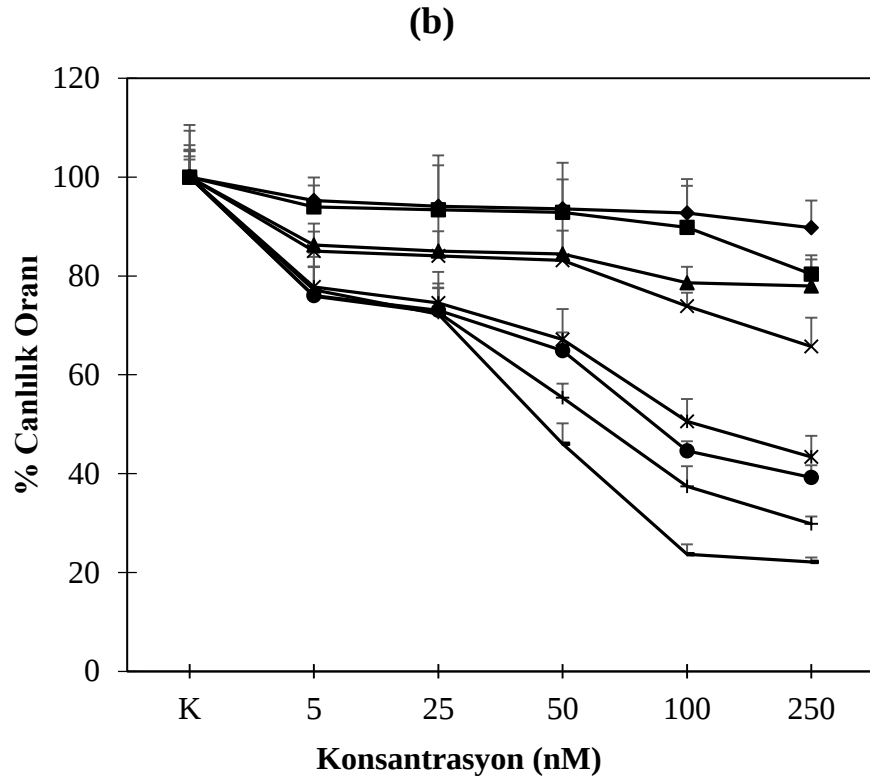
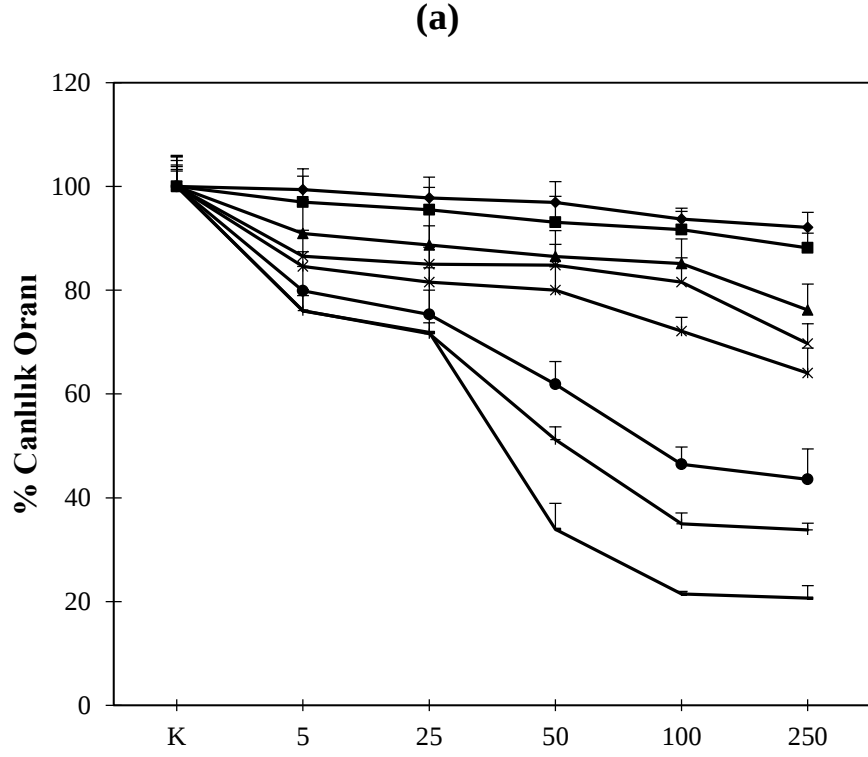
$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m)$											
Uygulama Maddesi	Hücre Türü	Uygulama Konsantrasyonu (nM)	Model Parametreleri					Performans Değerleri			
			a	b	n	c	m	MAE	MAPE	RMSE	R
Kukurbitasin D	LS174T	50	-0,3955	0,012	-1,1038	-0,0002	1,9011	0,0053	1,6684	0,0067	0,9890
		100	-0,2294	8235639,05	3,9000	-7,7850	-0,2173	0,0033	1,7496	0,0036	0,9972
		250	-0,1717	4786390,41	3,6996	-9,3512	-0,1224	0,0030	1,1996	0,0035	0,9946
	SW620	100	-0,2161	107309,69	2,9614	-7,0675	-0,2068	0,0063	2,1130	0,0074	0,9835
		250	-0,2045	569724,83	3,5542	-7,8547	-0,2037	0,0082	2,9723	0,0097	0,9742
Kukurbitasin I	LS174T	25	-0,3647	0,00006	-2,6263	-0,003	1,3867	0,0095	2,7663	0,0109	0,9866
		50	-0,3699	0,00014	-2,3742	-0,0015	1,6027	0,0066	1,9062	0,0084	0,9881
		100	-0,3552	0,0007	-2,1029	-0,0323	0,9931	0,0100	3,4169	0,0116	0,9611
		250	-0,3782	0,0006	-1,903	-0,0006	1,8637	0,0107	3,7132	0,0141	0,9336
	SW620	100	-0,7760	317,9917	1,3231	0,1086	0,5372	0,0045	1,4480	0,0051	0,9917
		250	-0,7773	376,1263	1,3872	0,0810	0,6058	0,0078	2,8263	0,0089	0,9789

4.6.2. Kukurbitasin D ve I 'nın antiproliferatif etkisinin araştırılması

Kukurbitasin D ve I'nın hücre proliferasyonunu ne kadar baskıladığı 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatler için değerlendirilmiş, kontrol gruplarının absorbans ölçümlerine oranlanarak hesaplanan canlı kanser hücrelerinin yüzdesindeki (% canlılık oranı) konsantrasyona göre değişimler Şekil 4.52 ve 4.53'de gösterilmiştir. Elde edilen grafikler incelendiğinde, konsantrasyon ve zaman artışına bağlı olarak Kukurbitasin D ve I'nın kanser hücre hatlarında (LS174T ve SW620) antiproliferatif etkisinin arttığı gözlenmiştir.

LS174T hücrelerine Kukurbitasin D'nin dört farklı konsantrasyonunun (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM) uygulanmasından sonra 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.52(a)'da LS174T hücrelerinin Kukurbitasin D'ye olan cevabı hücre canlılığı olarak gösterilmiştir. Buna göre; bu hücrelerin canlılık oranlarının Kukurbitasin D'nin uygulama konsantrasyonuna bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. En fazla inhibisyonun gerçekleştiği 250 nM konsantrasyondaki Kukurbitasin D ile yapılan deney değerlendirilecek olursa LS174T hücre sayılarında 24. saatte %24, 48. saatte %36 ve 72. saatte ise %66'lık bir azalmanın meydana geldiği görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; antiproliferatif etki 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde tüm konsantrasyonlarda ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulunmuştur.

SW620 hücrelerine dört farklı konsantrasyonda (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM) Kukurbitasin D uygulamasından sonra 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.52(b)'de SW620 hücrelerinin Kukurbitasin D'ye olan cevabı hücre canlılığı olarak gösterilmiştir. Buna göre bu hücrelerin canlılık oranlarının Kukurbitasin D konsantrasyonuna bağlı olarak düştüğü görülmüştür. En fazla inhibisyonun gerçekleştiği 250 nM konsantrasyondaki Kukurbitasin D ile yapılan tedavi değerlendirilecek olursa SW620 hücre sayılarında 24. saatte %22, 48. saatte %57 ve 72. saatte ise %70'lık bir azalmanın olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında; antiproliferatif etki 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde tüm konsantrasyonlarda ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulunmuştur.

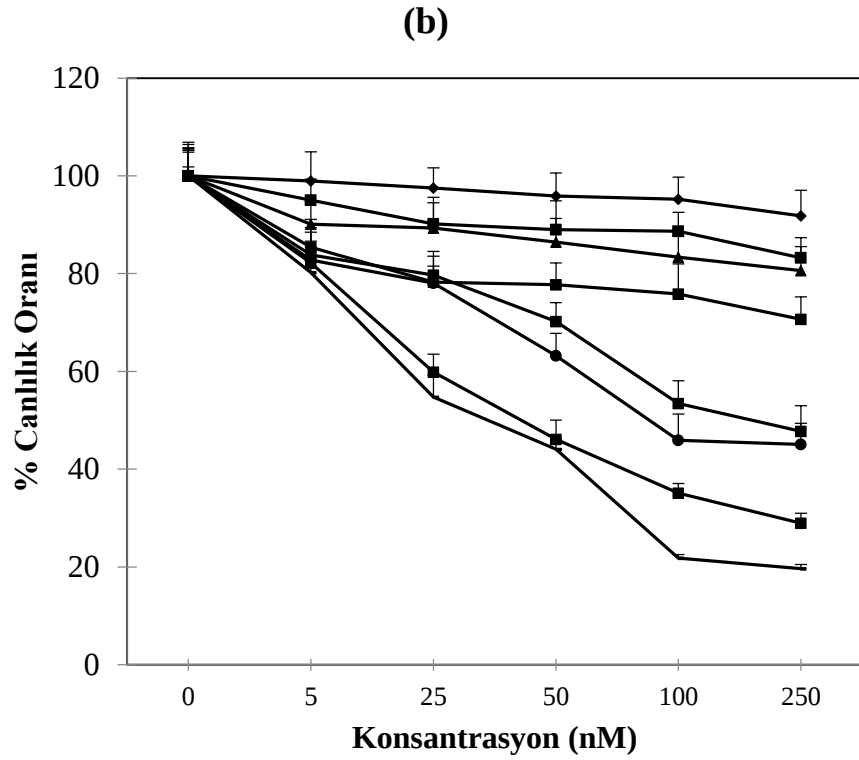
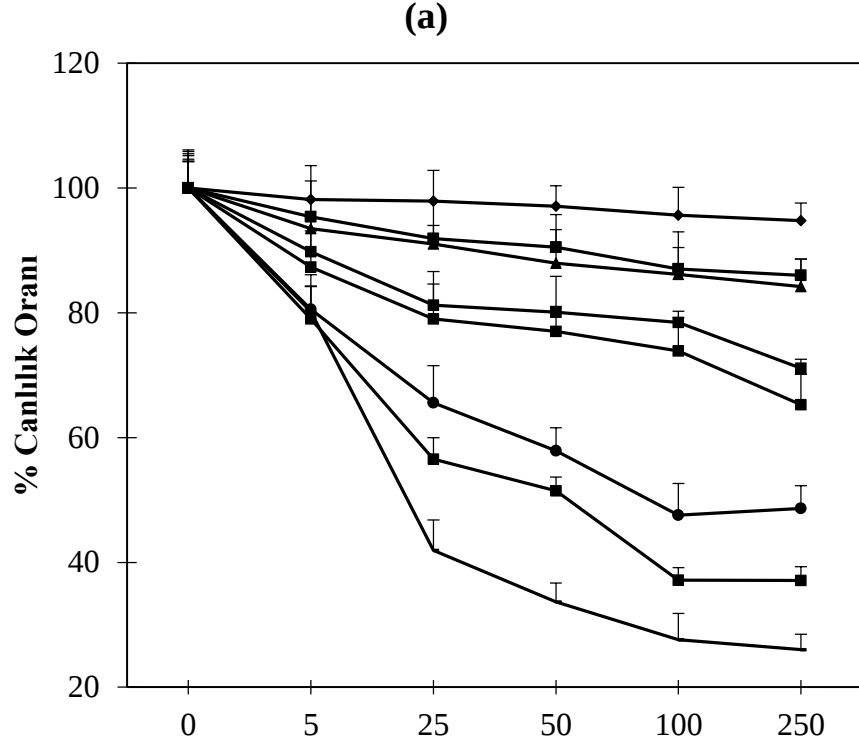


Şekil 4.52. Kukurbitasin D uygulaması sonrası (a) LS174Tve (b) SW620 hücrelerinin canlılık oranları (h; Saat, — 6h, — 12h, — 24h, — 36h, — 48h, — 60h, — 72h, — 96h).

LS174T hücrelerinin Kukurbitasin I'nın dört farklı konsantrasyonunun (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM) uygulanması sonrası 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.53(a)'da LS174T hücrelerinin Kukurbitasin I'ya olan cevabı hücre canlılığı olarak gösterilmiştir. Buna göre; bu hücrelerin canlılık oranlarının Kukurbitasin I konsantrasyonuna bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. En fazla inhibisyonun gerçekleştiği 250 nM konsantrasyondaki Kukurbitasin I ile yapılan tedavi değerlendirilecek olursa LS174T hücre sayılarında 24. saatte %16, 48. saatte %35 ve 72. saatte ise %63'lük bir azalmanın olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında; antiproliferatif etki; 6, 12 ve 24. saatte, 25 nM, 100 nM ve 250 nM'de; 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulunmuştur.

SW620 hücreleri Kukurbitasin I'nın dört farklı konsantrasyonunun (5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM ve 250 nM) uygulaması sonrası 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.53(b)'de SW620 hücrelerinin Kukurbitasin I'ya olan cevabı hücre canlılığı olarak gösterilmiştir. Buna göre bu hücrelerin canlılık oranlarının Kukurbitasin D dozuna bağlı olarak düştüğü belirlenmiştir. En fazla inhibisyonun gerçekleştiği 250 nM konsantrasyondaki Kukurbitasin D ile yapılan tedavi değerlendirilecek olursa SW620 hücre sayılarında 24. saatte %19, 48. saatte %52 ve 72. saatte ise %71'lik bir azalmanın olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında; antiproliferatif etki 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96. saatlerde tüm konsantrasyonlarda ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, artan Kukurbitasin D ve I konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak hem LS174T hem de SW620 hücrelerinin canlılıklarında %80'e varan azalmalar olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.53. Kukurbitasin I uygulaması sonrası (a) LS174Tve (b) SW620 hücrelerinin canlılık oranları (h; Saat, —◆— 6h, —■— 12h, —▲— 24h, —✱— 36h, —✱— 48h, —◆— 60h, —◆— 72h, —◆— 96h).

4.6.3. Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerine etkileri

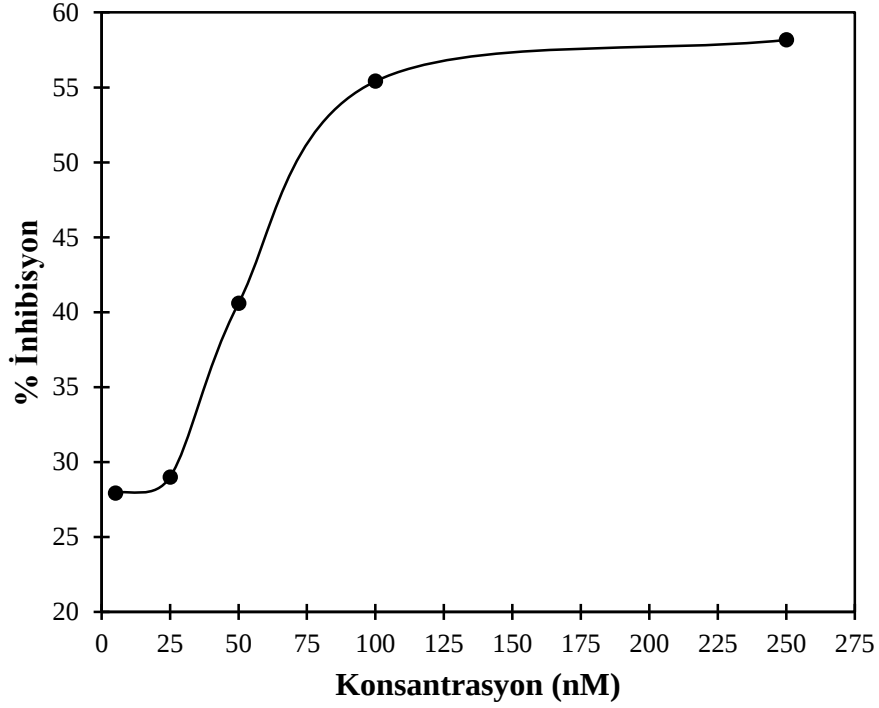
4.6.3.1. IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

LS174T ve SW620 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) ve sürelerde Kukurbitasin D ve I uygulamasından sonra MTT test sonuçlarına göre % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. LS174T hücrelerine kukurbitasinlerin uygulanmasından sonra ilk 48 saatlik sürede, SW620 hücrelerine kukurbitasinlerin uygulanmasından sonra ilk 36 saatlik sürede %50 ve üzeri inhibisyon değerlerine ulaşamamıştır. Hücre ve uygulama maddesi türüne göre %50 ve üzeri inhibisyon gerçekleşen uygulama süreleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. %50 inhibisyonun gerçekleştiği uygulama süreleri

Uygulama Maddesi	Hücre Türü	Uygulama Süresi (h)
Kukurbitasin D	LS174T	60
		72
		96
	SW620	48
		60
		72
		96
Kukurbitasin I	LS174T	60
		72
		96
	SW620	48
		60
		72
		96

LS174T ve SW620 hücrelerine kukurbitasinlerin uygulama konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon değerleri için grafikler oluşturulmuştur. Bu grafiklerin temsili bir örneği Şekil 4.54'de verilmiştir. Şekilde, LS174T hücrelerine Kukurbitasin D uygulaması sonrası 60. saat sonunda elde edilen % inhibisyon değerleri ile çizilen grafik görülmektedir.



Şekil 4.54. LS174T hücrelerine 60 saat süreyle Kukurbitasin D uygulaması sonrası % inhibisyon grafiği

Şekil 4.54'te, % inhibisyon değerlerinin konsantrasyon değişimine göre doğrusal olmadığı görülmektedir. Uygulama maddeleri (Kukurbitasin D ve I), hücre türleri (LS174T ve SW620) ve uygulama süreleri (6-96 h) için de elde edilen diğer grafikler de aynı şekildedir. Bu durumda en doğru/hassas IC_{50} değerlerinin hesaplanması için bu eğrileri temsil eden eşitliklerin bulunması gerekmektedir. Genel olarak, IC_{50} değerlerinin hesaplanmasında lineer ya da logaritmik regresyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler kullanıldığında elde edilen eşitlikler tam olarak eğriyi temsil etmemekte ve IC_{50} değeri hassas olarak hesaplanamaktadır. Doğrusal olmayan regresyon yönteminin uygulanması ile daha doğru sonuçların elde edileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, model uydurma yöntemi uygulanmıştır.

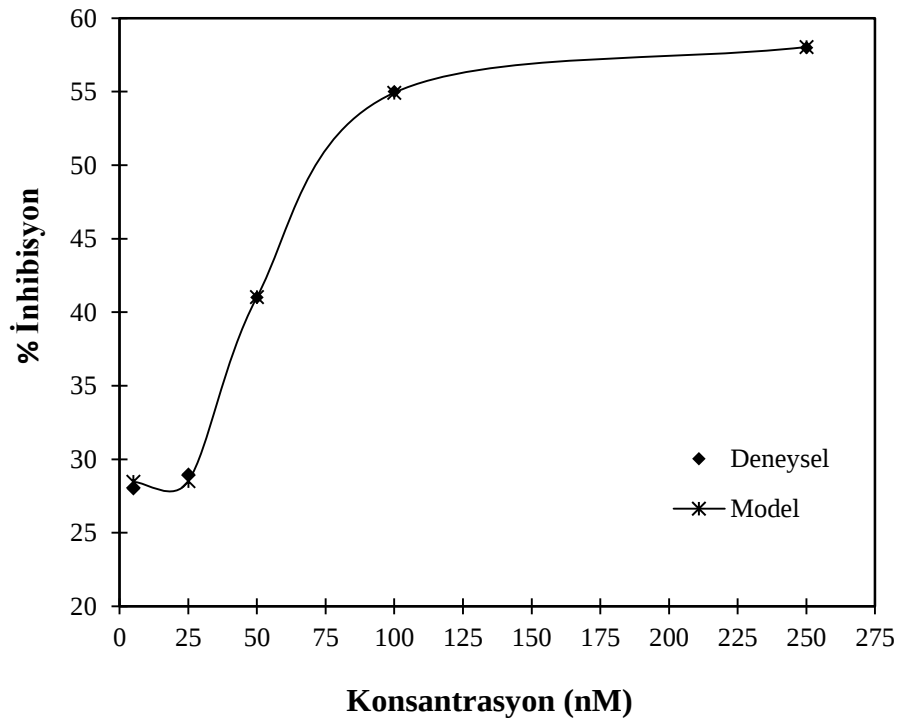
Doğrusal olmayan regresyon analiz yöntemi kullanılarak, doğrusal olmayan bir model olan Weibull eşitliği (Eşitlik 4.4) yardımıyla deneysel olarak %50 inhibisyonun gerçekleştiği uygulama süreleri için IC_{50} değerleri belirlenmiştir (Keskintürk vd., 2009).

$$f(x) = \alpha - \beta * \exp(-\gamma * x^{\delta}) \quad (4.3)$$

Burada; $f(x)$: % İnhibisyon, x : konsantrasyon, α , β , γ , δ : parametreler

Eşitliğin parametre değerleri; MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi ile belirlenmiş ve modelin performansını gösteren MAE, MAPE, RMSE ve R değerleri Tablo 4.6’da verilmiştir. Parametre değerlerine göre, Şekil 4.55-68’de görülen farklı Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarına bağlı % inhibisyon eğrileri oluşturulmuştur. Şekiller incelendiğinde deneysel sonuçlar ile modelden elde edilen değerlerin hemen hemen tamamen çakıştığı görülmektedir. Bu da kullanılan modelin sistem için uygun olduğunu göstermiştir.

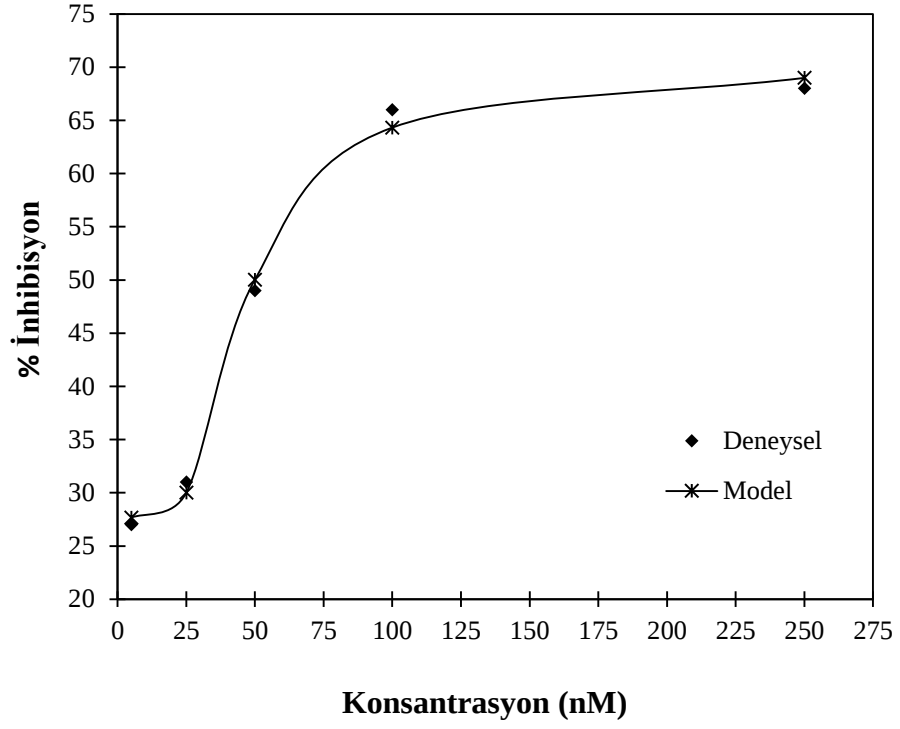
Tablo 4.6’da hesaplanan parametreler kullanılarak Weibull eşitliği yardımıyla kanser hücrelerinin sayısında %50 inhibisyonun gerçekleştiği Kukurbitasin D ve I konsantrasyonları hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.7’de verilmiştir. Uygulama süresinin artmasıyla her iki uygulama maddesi ve hücre türü için IC_{50} değerlerinin düştüğü görülmektedir.



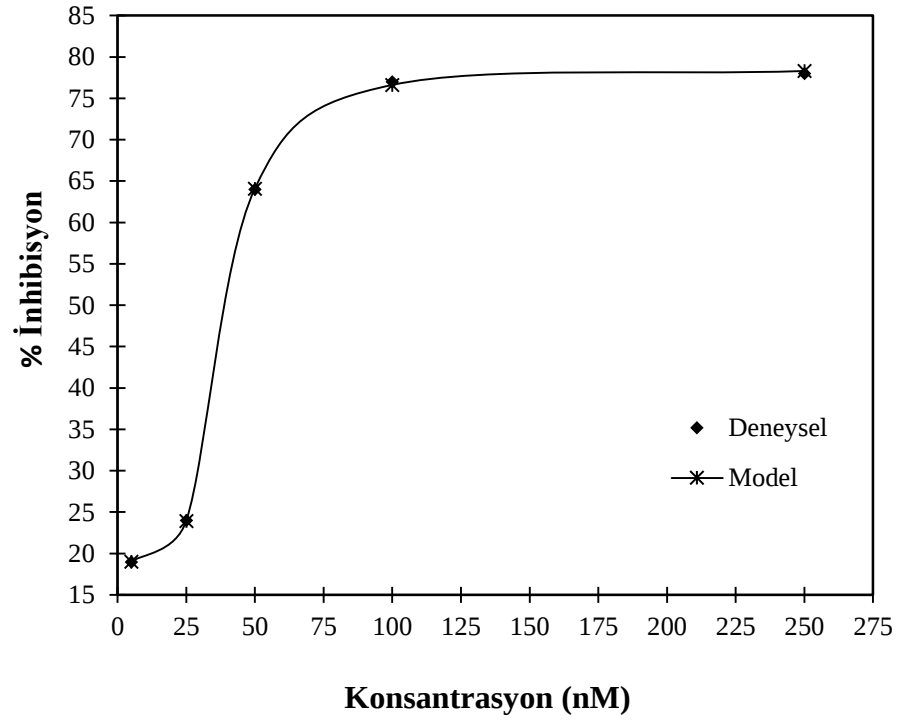
Şekil 4.55. Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)

Tablo 4.6. Doğrusal olmayan regresyon analizi ile IC50 model parametre ve performans değerleri

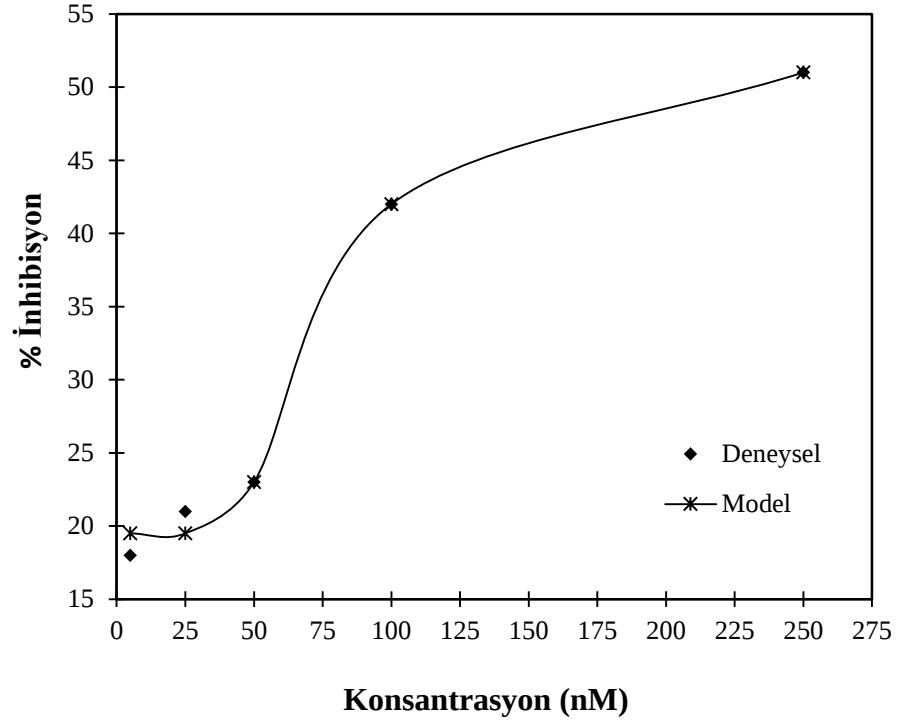
$f(x) = \alpha - \beta * \exp(-\gamma * x^\delta)$										
Madde	Hücre Türü	Uygulama Süresi (h)	Model Parametreleri				Performans Değerleri			
			α	β	γ	δ	MAE	MAPE	RMSE	R
Kukurbitasin D	LS174T	60	28,4644	-29,8390	60738,8053	-2,8527	0,2162	0,7149	0,3003	0,9997
		72	27,6617	-42,1041	3349,3663	-2,1918	1,0714	2,3540	1,1216	0,9978
		96	19,0321	-59,3668	68614,2391	-3,1762	0,1732	0,2830	0,2240	1,0000
	SW620	48	19,4999	-32,6104	55715,0351	-2,5882	0,6001	3,0955	0,9487	0,9974
		60	23,4980	-37,0508	79546,3905	-2,8058	0,2007	0,8519	0,3154	0,9998
		72	24,5284	-47,3038	2249,8045	-2,0264	0,5800	1,5583	0,5946	0,9995
		96	27,4967	-50,8238	9324364,5277	-4,2278	0,7307	2,3624	0,9676	0,9991
Kukurbitasin I	LS174T	60	15,9695	-39,4561	39,8213	-1,1639	1,1708	2,6860	1,4345	0,9942
		72	17,1912	-49,0949	21,8173	-1,0456	1,3504	2,5359	1,6687	0,9946
		96	24,3952	-52,8591	41,1358	-1,3795	0,1845	0,2604	0,2332	0,9999
	SW620	48	20,2389	-39,3815	44,8961	-0,9519	0,8789	2,6608	1,0123	0,9961
		60	21,3819	-37,7246	282,6457	-1,5513	1,4031	3,4581	1,5810	0,9935
		72	16,3559	-68,1542	12,0055	-0,7381	1,7268	3,3290	2,1135	0,9937
		96	18,0285	-68,2542	43,0837	-1,1653	2,1320	3,3660	2,6009	0,9936



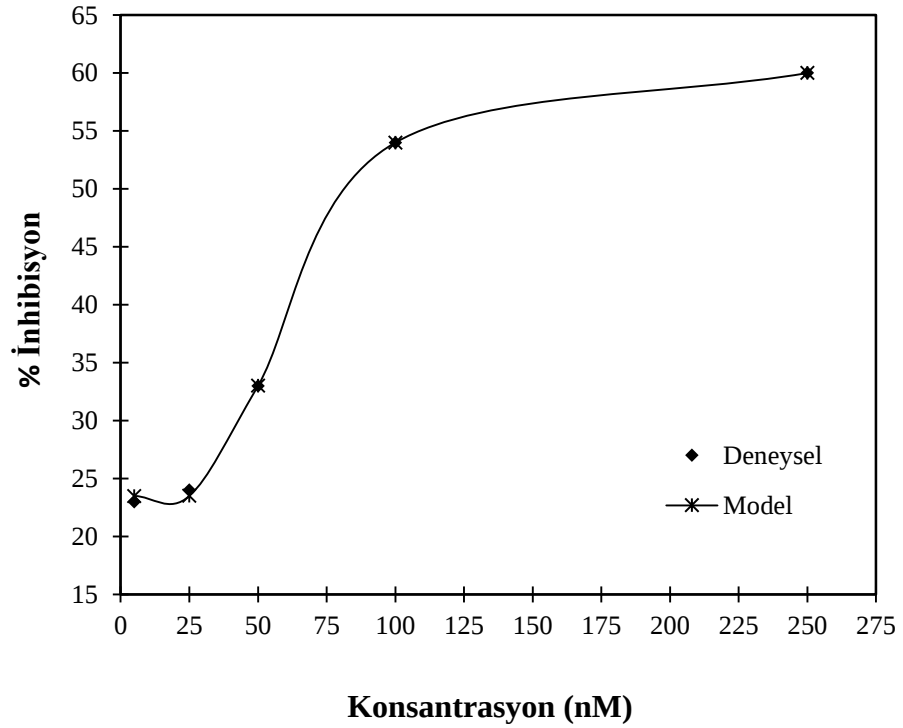
Şekil 4.56. Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)



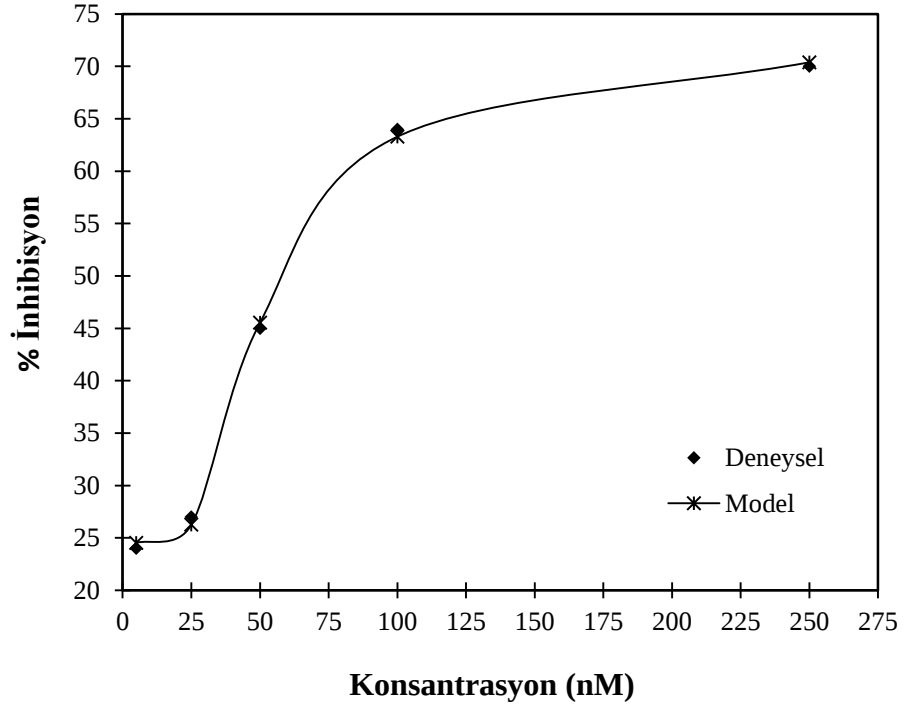
Şekil 4.57. Kukurbitasin D uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)



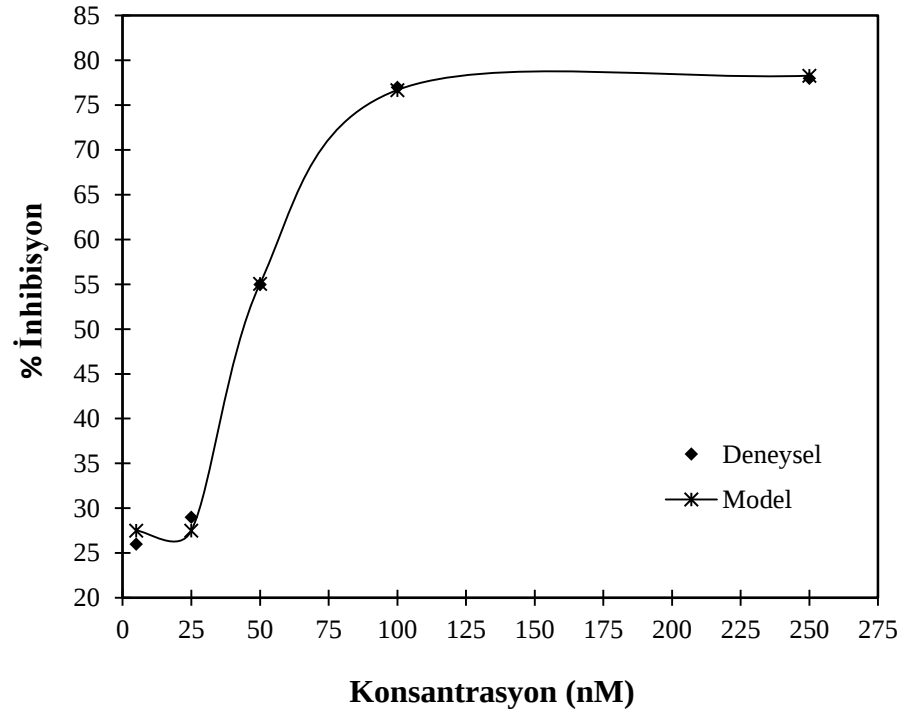
Şekil 4.58. Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 48 saat)



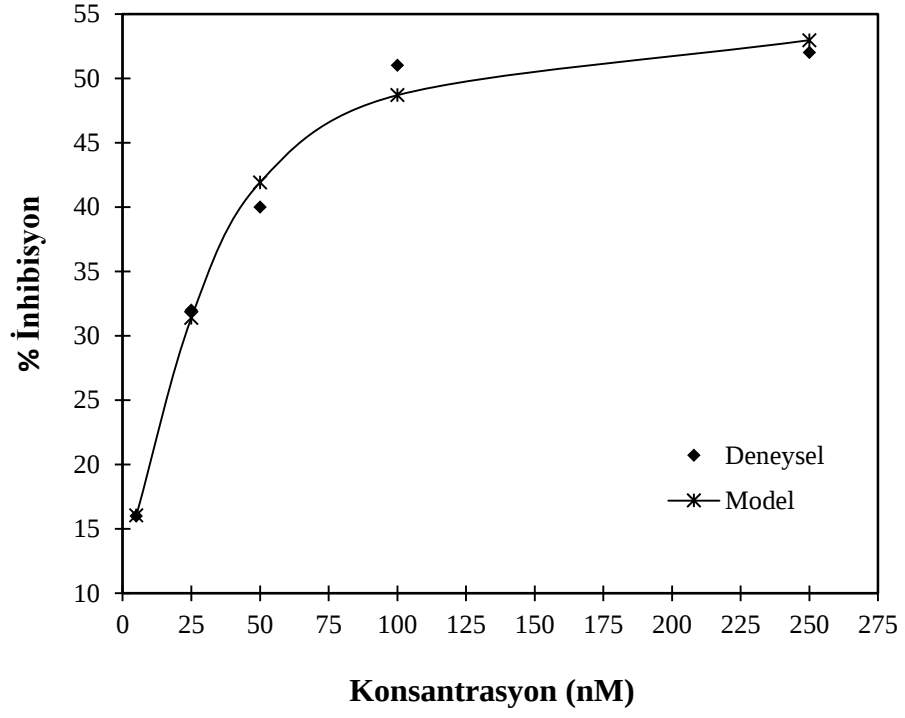
Şekil 4.59. Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)



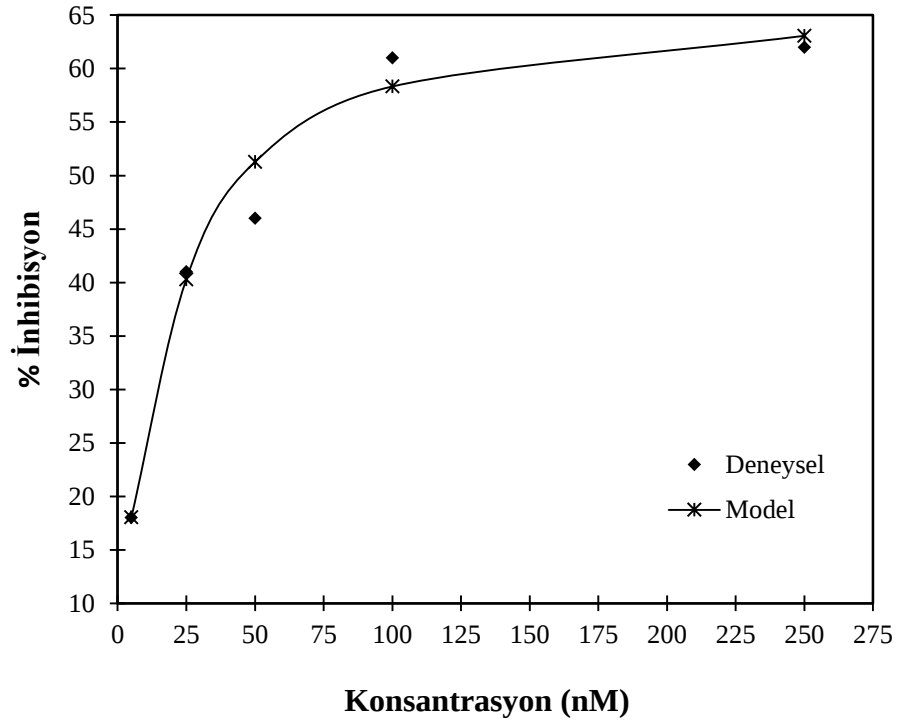
Şekil 4.60. Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)



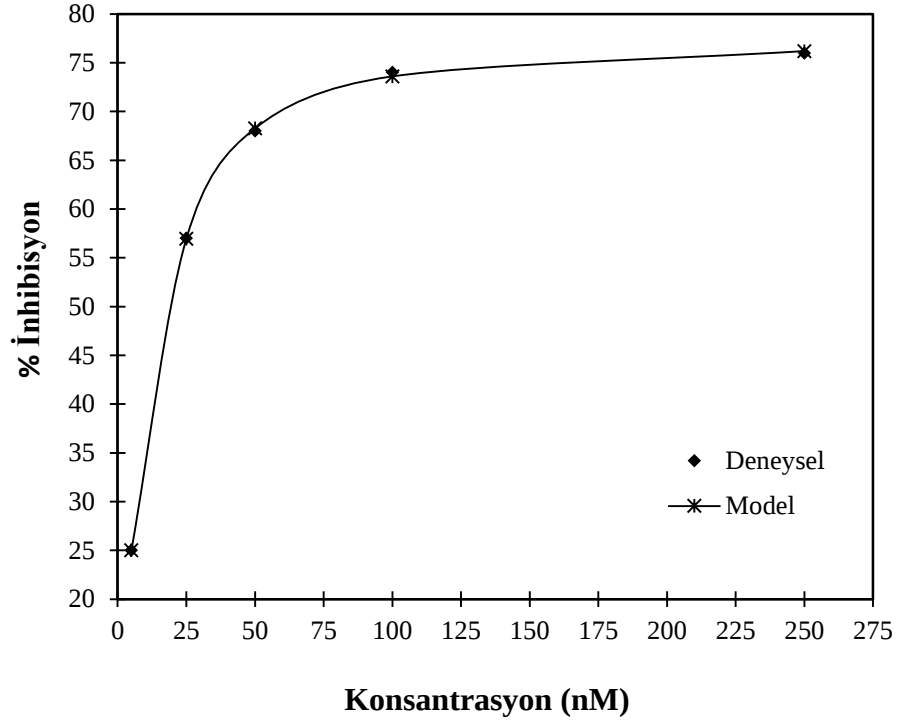
Şekil 4.61. Kukurbitasin D uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)



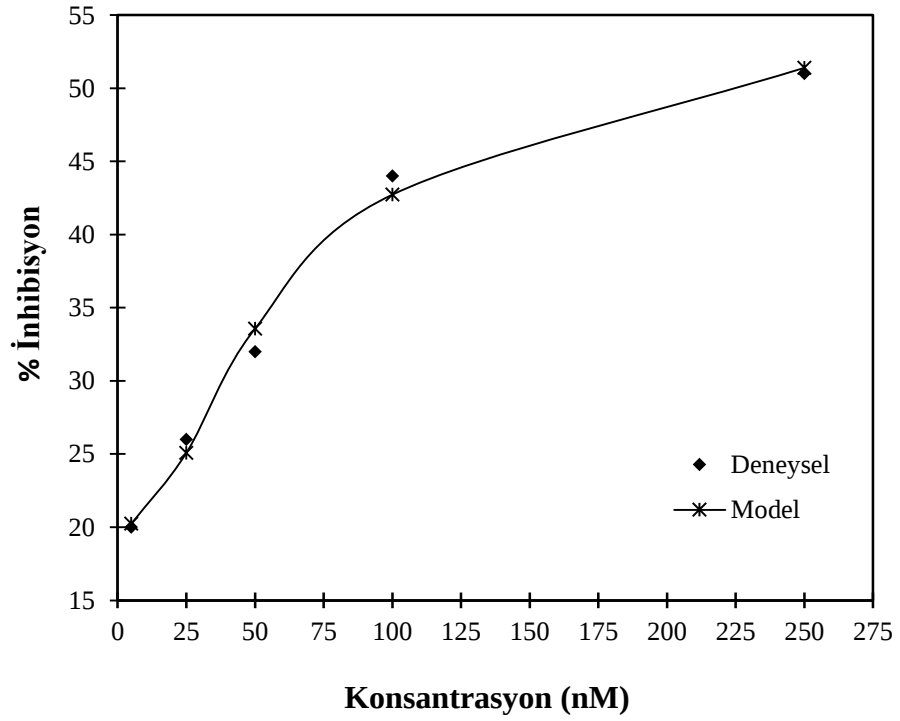
Şekil 4.62. Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)



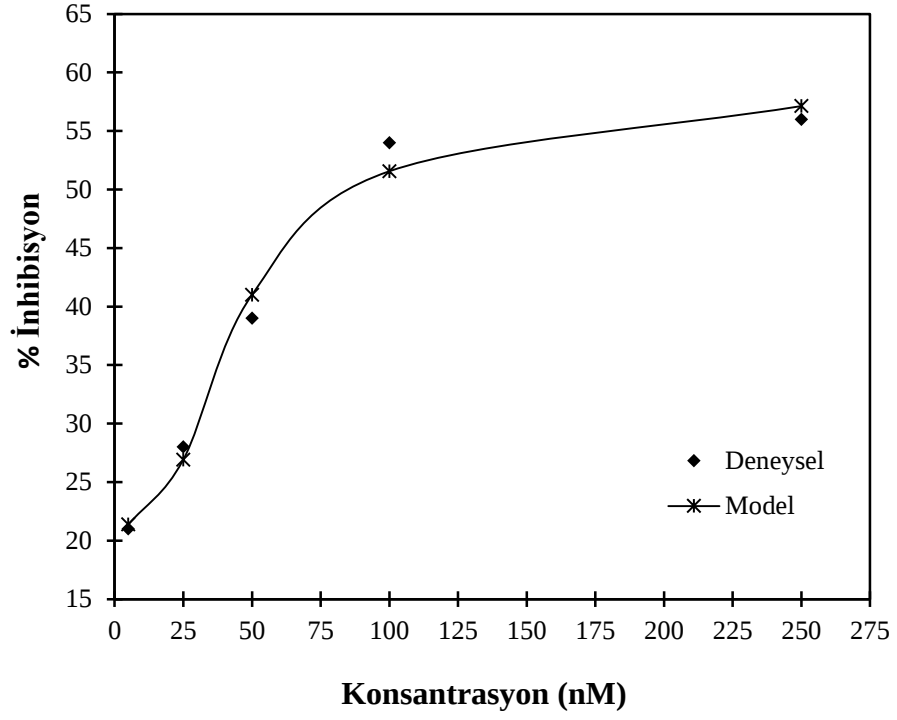
Şekil 4.63. Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)



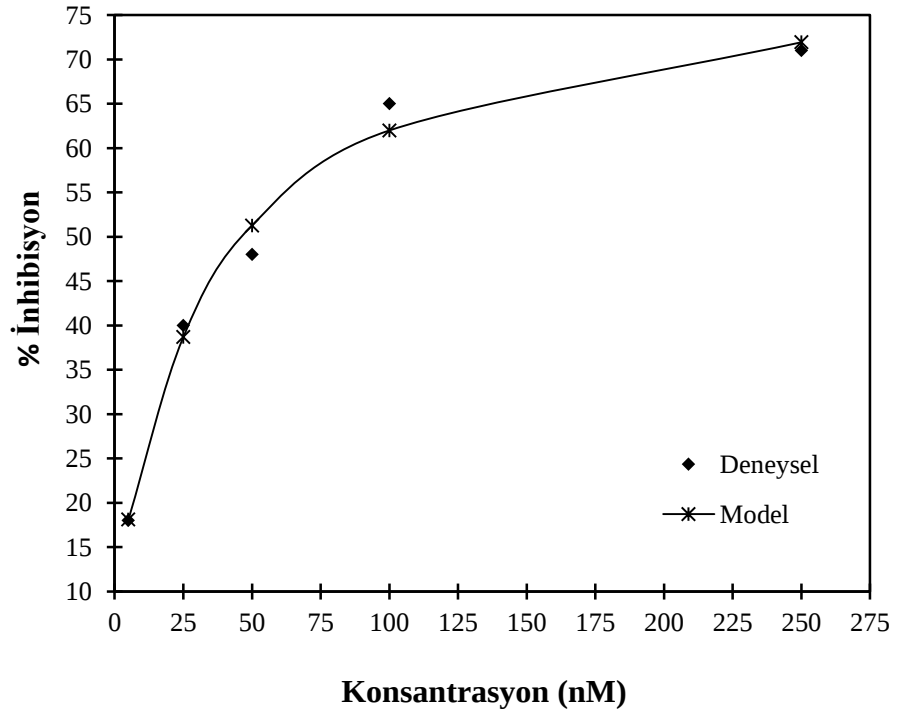
Şekil 4.64. Kukurbitasin I uygulamasından sonra LS174T hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)



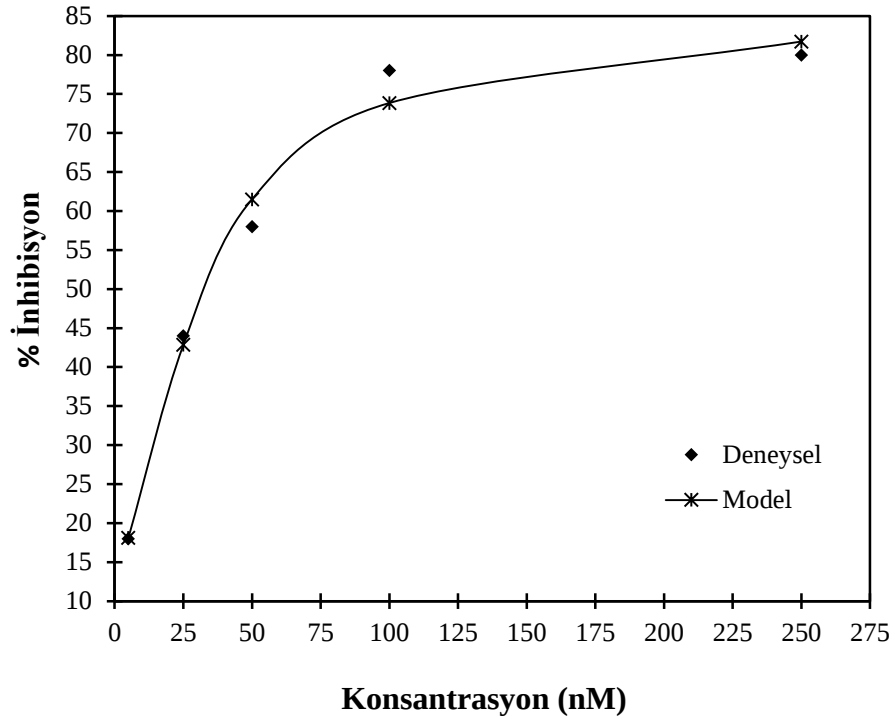
Şekil 4.65. Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 48 saat)



Şekil 4.66. Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 60 saat)



Şekil 4.67. Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 72 saat)



Şekil 4.68. Kukurbitasin I uygulamasından sonra SW620 hücrelerinin proliferasyon inhibisyonu grafiği (İnkübasyon süresi 96 saat)

Tablo 4.7. Doğrusal olmayan regresyonla hesaplanan IC₅₀ değerleri

Uygulama Maddesi	Hücre Türü	Uygulama Süresi (h)	Hesaplanan IC ₅₀ (nM)
Kukurbitasin D	LS174T	60	70
		72	50
		96	38
	SW620	48	194
		60	82
		72	57
		96	47
Kukurbitasin I	LS174T	60	122
		72	46
		96	19
	SW620	48	207
		60	87
		72	47
		96	32

4.6.3.2. Hücre proliferasyonu üzerine konsantrasyon etkisinin modellenmesi

Hücre proliferasyonu üzerine konsantrasyon etkisinin modellenmesi işlemi için Eşitlik 2.1 kullanılarak başlanmıştır. LS174T ve SW620 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) ve sürelerde Kukurbitasin D ve I uygulamasından sonra MTT testi sonucu canlı hücre sayısı absorbans olarak ölçülmüş ve kontrol grubundaki hücrelerin absorbans değerlerine oranlanarak % canlılık oranları hesaplanmıştır. % canlılık oranları (X) hücrelerin çoğalma hızındaki azalışı ifade etmektedir. Zamanla hücre sayısındaki % azalmadan dolayı logaritmik çoğalma fazını ifade eden (Eşitlik 2.1)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.1)$$

eşitliği yeniden düzenlenmiş ve

$$\frac{dX}{dt} = -\mu X \quad (4.4)$$

şeklinde ifade edilmiştir. Eşitlik 4.5'in integrasyonu yapıldığında

$$\ln X_0 - \ln X = \mu t \quad (4.5)$$

elde edilmiştir. t'ye karşı $-\ln X$ 'in $(\ln(1/X))$ grafiğe geçirilmesi ile özgül çoğalma hızı (μ) bulunur. Her bir Kukurbitasin D ve I konsantrasyonlarına ait LS174T ve SW620 hücreleri için hesaplanan μ değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi Kukurbitasin D ve I konsantrasyonunun artması ile özgül çoğalma hızları da artış göstermektedir. En yüksek özgül çoğalma hızı 250 nM konsantrasyonda Kukurbitasin I'nın SW620 hücrelerine uygulanması ile elde edilmiştir.

LS174T ve SW620 hücrelerinin özgül çoğalma hızlarının Kukurbitasin D ve I konsantrasyonuna değişimini belirlemek amacıyla literatürde yer alan Monod (Eşitlik 4.6) ve Tessier (Eşitlik 4.7) modellerinin gerçekleştirilen deneylerde elde edilen deney sonuçları ile uygunluğu denenmiştir.

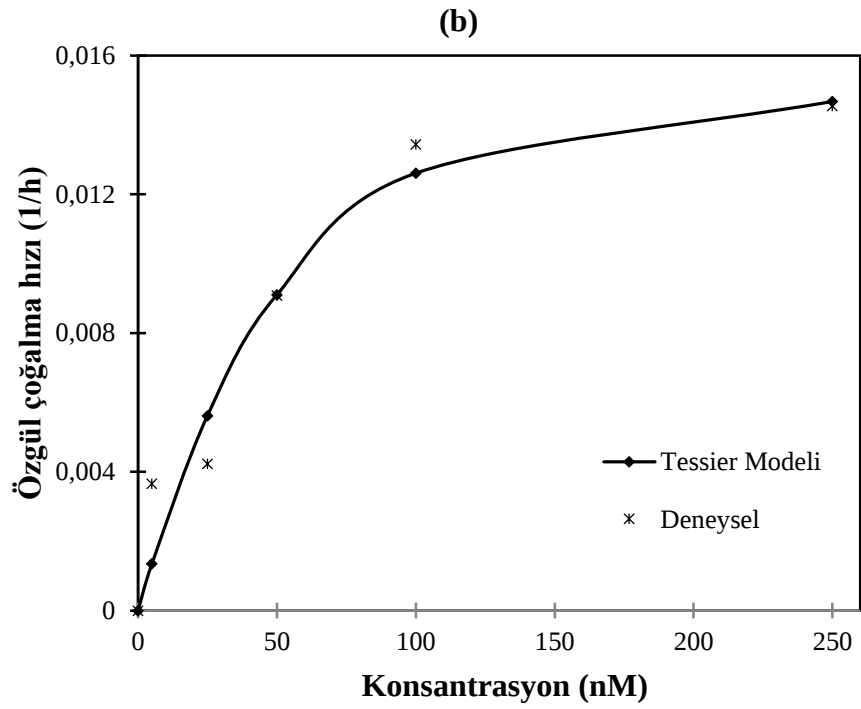
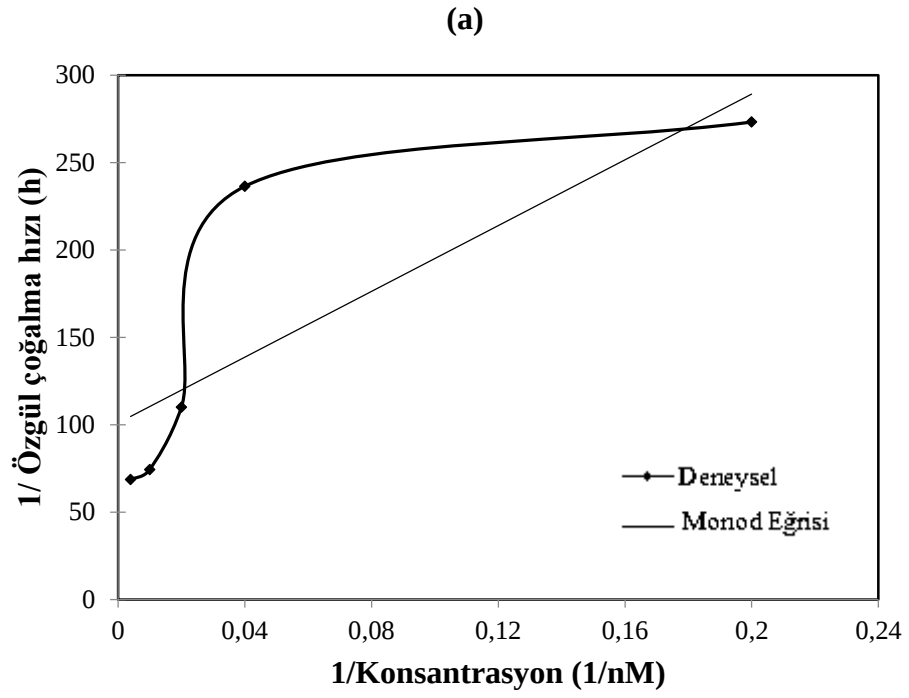
$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{C_k}{K_k + C_k} \right) \quad (4.6)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \exp\left(-\frac{C_k}{K_i}\right) \right) \quad (4.7)$$

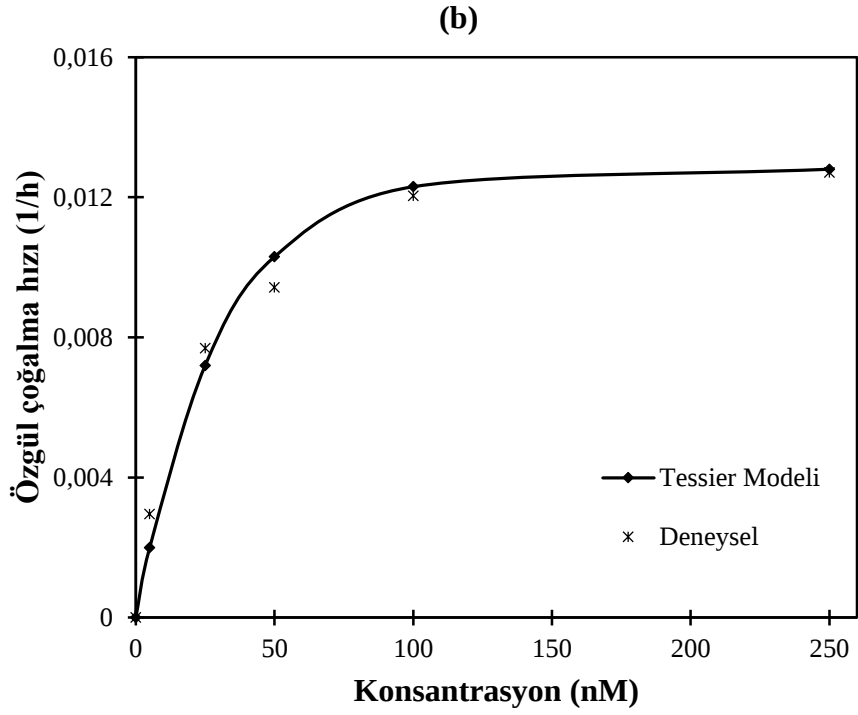
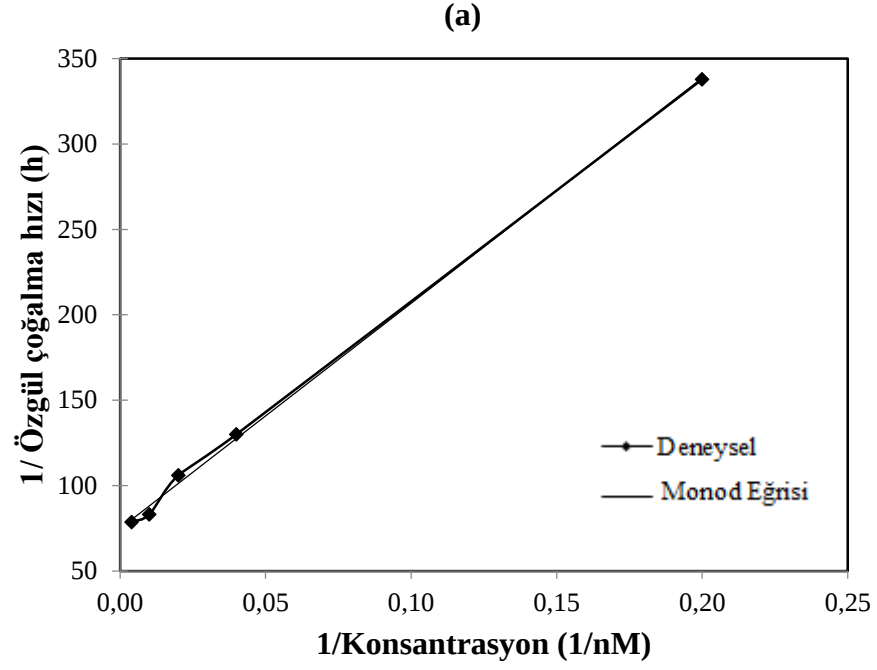
Deneysel verilerin modellere uygunluğu ve parametrelerin (maksimum özgül çoğalma hızı ($\mu_{\max}$), maksimum inhibisyonun %50 ve %63,2'sini sağlayan Kukurbitasin D ve I konsantrasyonu (K_k ve K_i)) değerleri, Monod modeli için Excel programı, Tessier modeli için ise MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi kullanılarak hesaplandı. Deneysel verilerin modellere uygunluğunu gösteren eğriler Şekil 4.69-72'de verilmiştir. Modellerin parametre değerleri ve performansını gösteren R değerleri de Tablo 4.9'da yer almaktadır. Özgül çoğalma hızı eğrileri incelendiğinde deneysel değerler ile model değerlerinin örtüştüğü görülmektedir. Özgül çoğalma hızının uygulama maddesi türü ve konsantrasyonuna göre değişimi Tessier modeli ile ifade edilebilmektedir.

Tablo 4.8. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin D ve I uygulaması sonrası LS174T ve SW620 hücrelerinin özgül çoğalma hızları

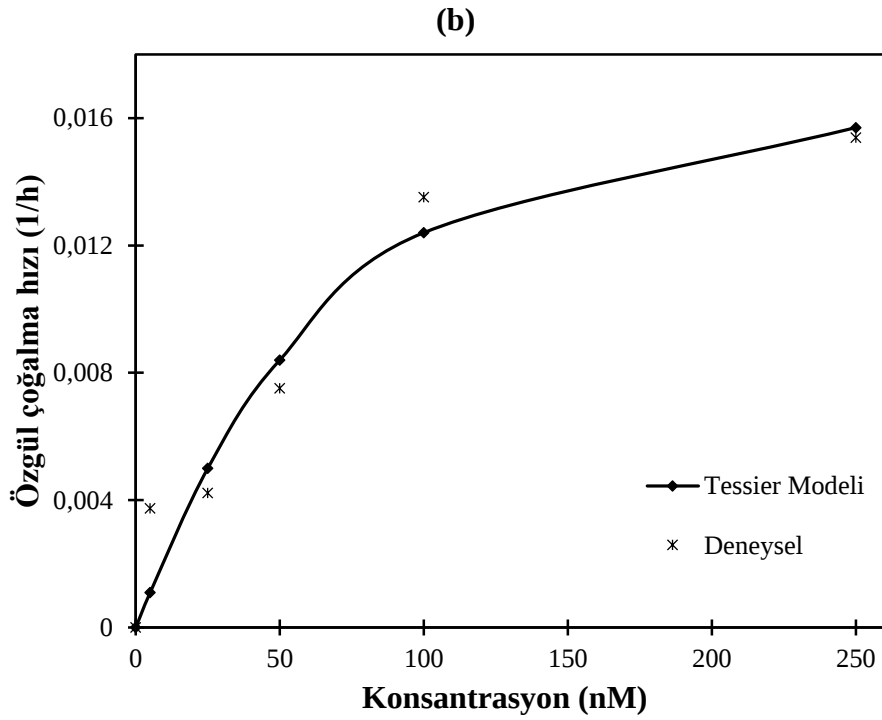
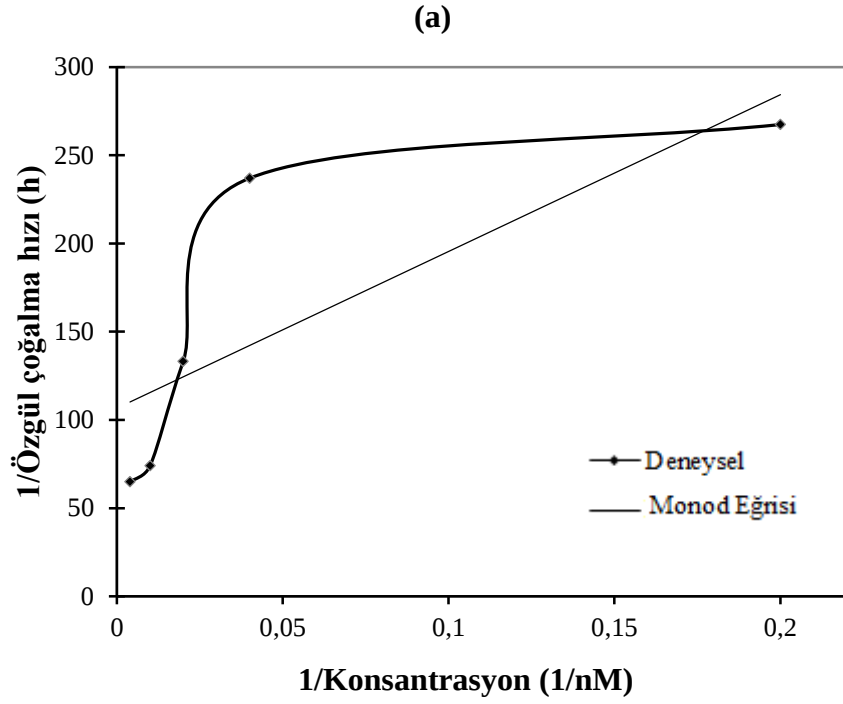
Hücre türü	Uygulama maddesi	Uygulama maddesi konsantrasyonu (nM)	Özgül çoğalma hızı (μ , h ⁻¹)
LS174T	Kukurbitasin D	5	0,0037
		25	0,0042
		50	0,0091
		100	0,0134
		250	0,0145
	Kukurbitasin I	5	0,0030
		25	0,0077
		50	0,0094
		100	0,0012
		250	0,0013
SW620	Kukurbitasin D	5	0,0037
		25	0,0042
		50	0,0075
		100	0,0135
		250	0,0154
	Kukurbitasin I	5	0,0031
		25	0,0063
		50	0,0082
		100	0,0138
		250	0,0155



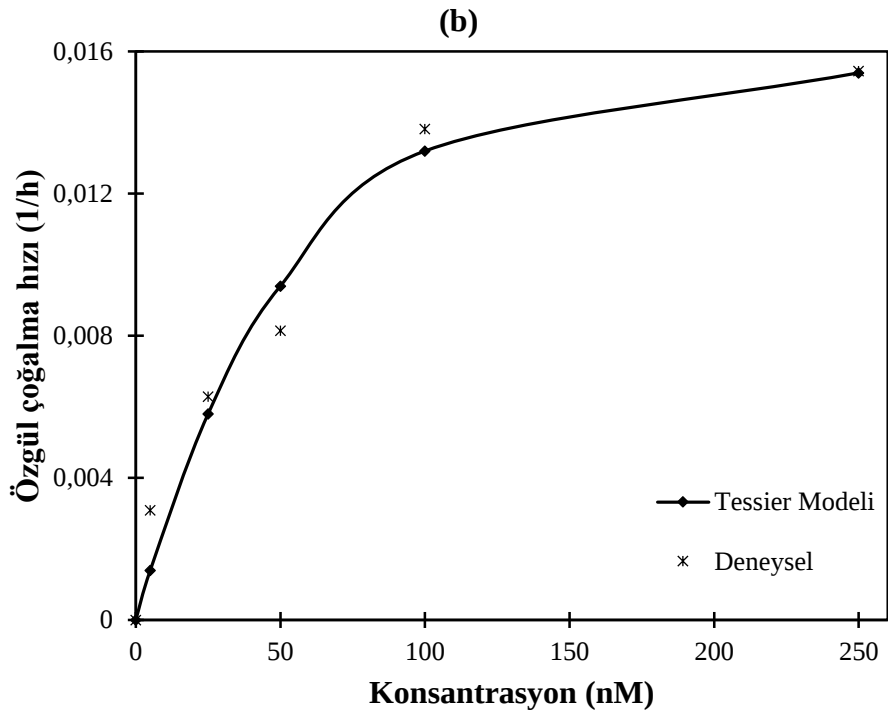
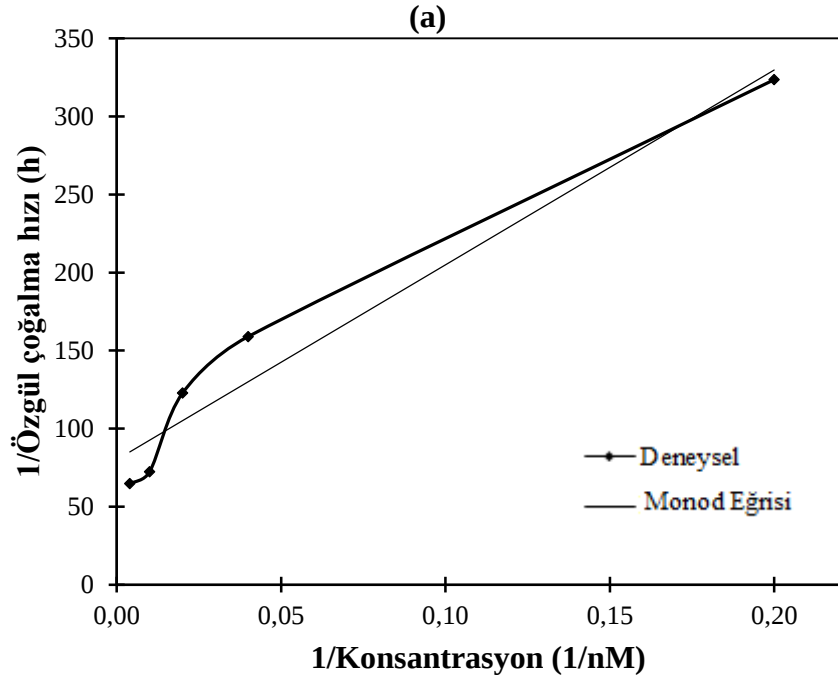
Şekil 4.69. Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



Şekil 4.70. Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



Şekil 4.71. Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



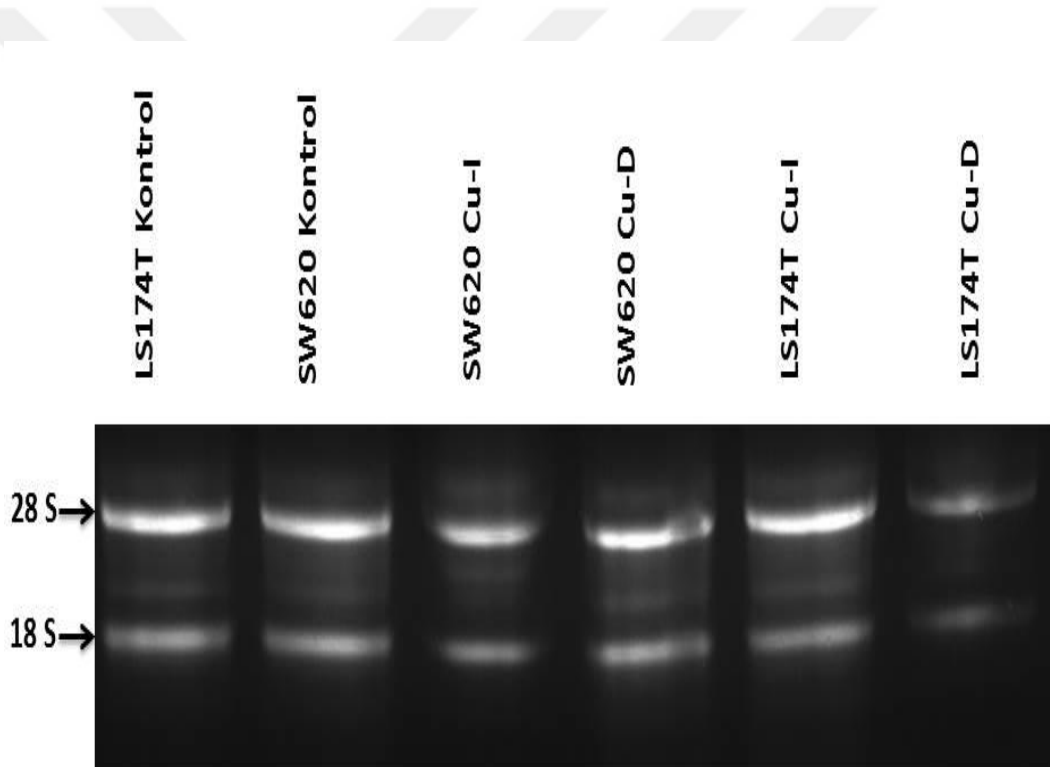
Şekil 4.72. Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinde özgül çoğalma hızının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli

Tablo 4.9. % Canlı hücre değişimini ifade eden Monod ve Tessier modellerinin parametre ve performans değerleri

Hücre Türü	Uygulama Maddesi	Model Parametre Değerleri				Model Performans Değerleri	
		Monod		Tessier		R_{Monod}	R_{Tessier}
		r_{imax} (h^{-1})	K_k (nM)	r_{imax} (h^{-1})	K_i (nM)		
LS174T	Kukurbitasin D	0,0099	9,3282	0,015	53,76	0,811	0,984
	Kukurbitasin I	0,0134	17,5982	0,0123	27,62	0,999	0,994
SW620	Kukurbitasin D	0,0094	8,3256	0,0161	67,57	0,787	0,983
	Kukurbitasin I	0,0125	15,5965	0,0157	54,35	0,977	0,991

4.7. Telomeraz Aktivitesinde hTERT Gen Ekspresyonu Bulgularının Değerlendirilmesi

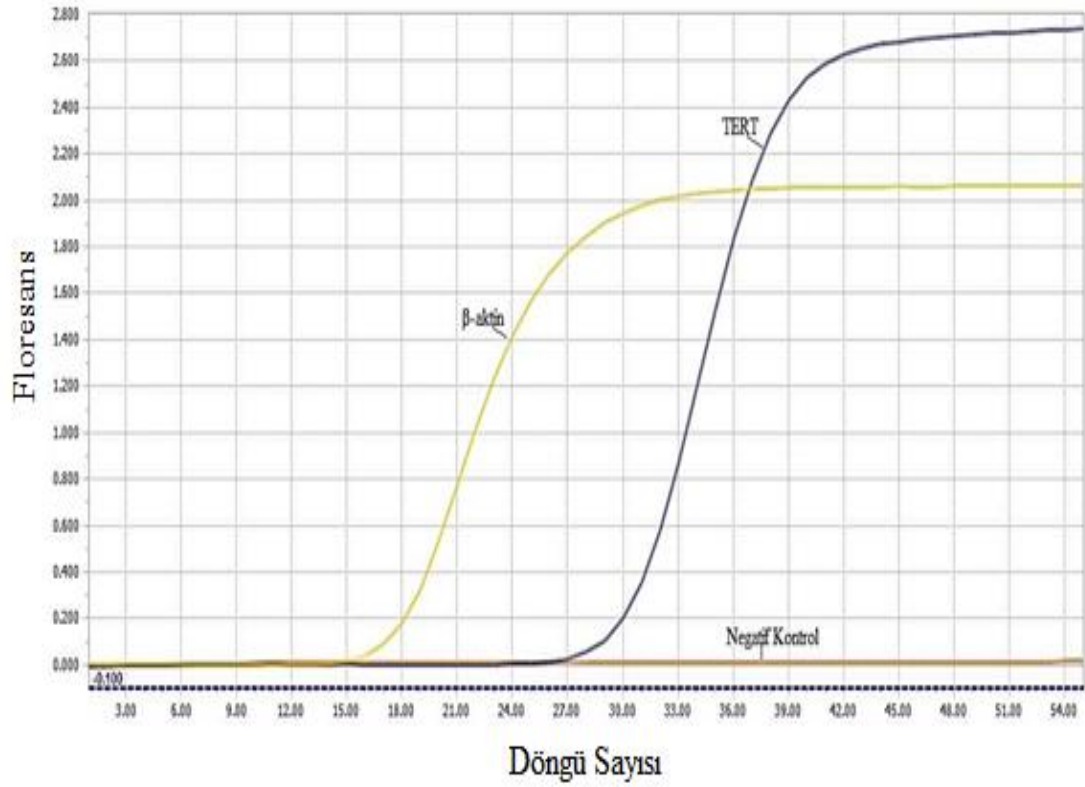
High Pure RNA Isolation Kiti ile Kukurbitasin D ve I uygulaması yapılan ve yapılmayan (kontrol) LS174T ve SW620 hücre hatları örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlendi. Bu jellerin görüntülenmesi, UVP marka ChemiDocIt² sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. Şekil 4.73'de her gruptan seçilen saflaştırılmış RNA'ların %1'lik agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü üzere saflaştırılan RNA'larda herhangi bir yıkılım olmadığı, 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı tespit edildi. Elde edilen RNA'ların saf olduğu belirlendi.



Şekil 4.73. LS174T ve SW620 hücre hatlarından saflaştırılan RNA'ların jel görüntüsü (Cu-D; Kukurbitasin D, Cu I; Kukurbitasin I)

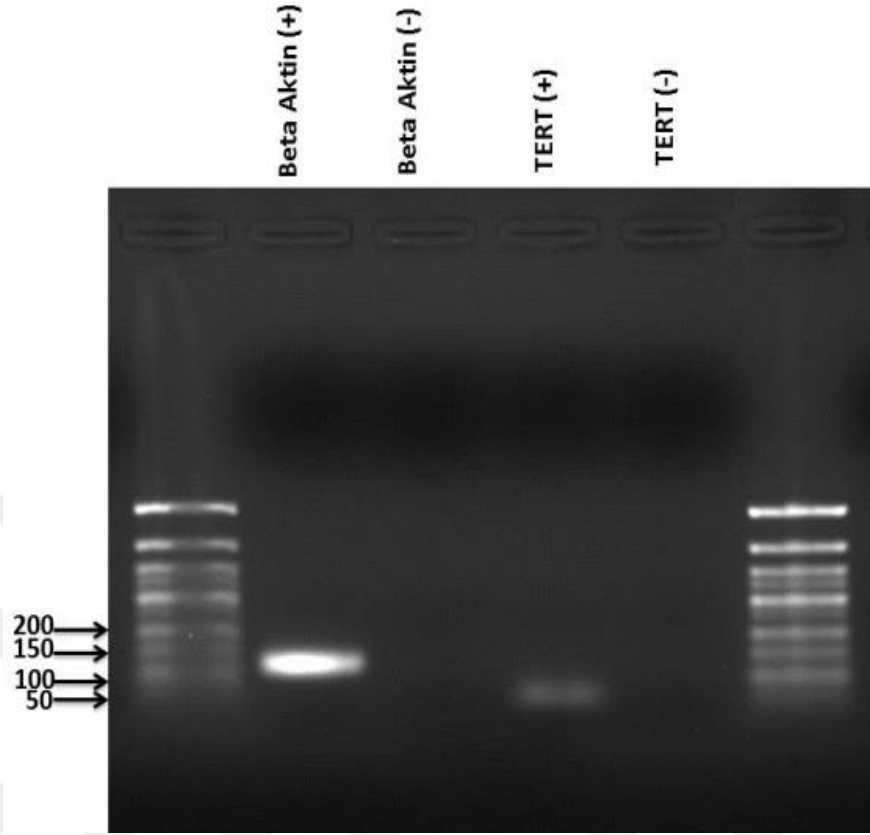
Örneklerin RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm UV spektrumda okundu. RNA miktar hesaplanmasında $260 \text{ nm deki OD} \times \text{Sulandırma faktörü} \times 40/1000$ formülü ile RNA miktarı ng/ μL cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı.

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lerden elde edilen cDNA'lar, β -aktin ve hTERT genlerine özgü primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltıldı ve çoğalım eğrileri Şekil 4.74'de gösterilmiştir.



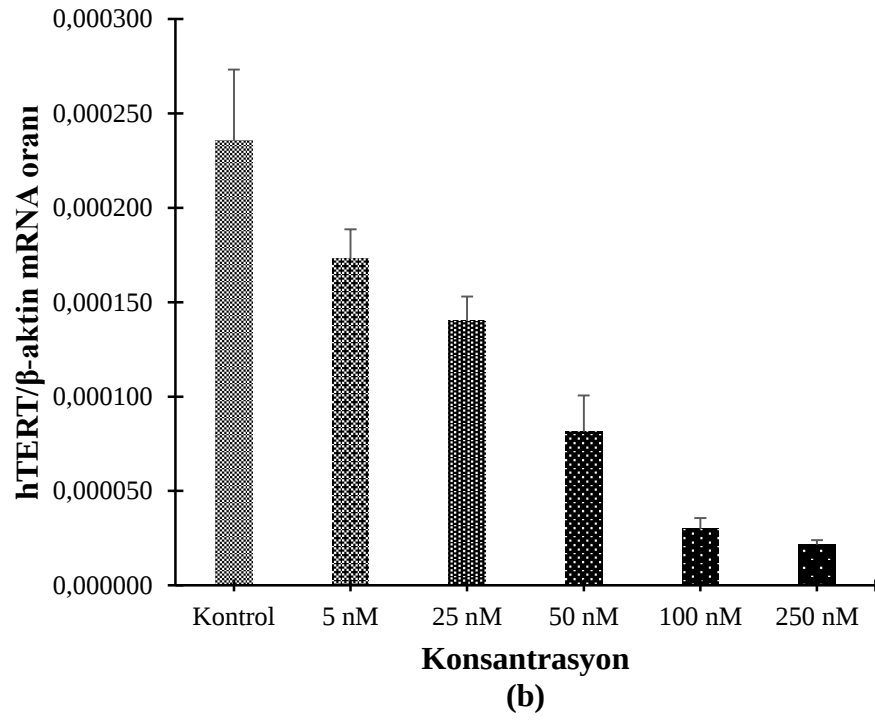
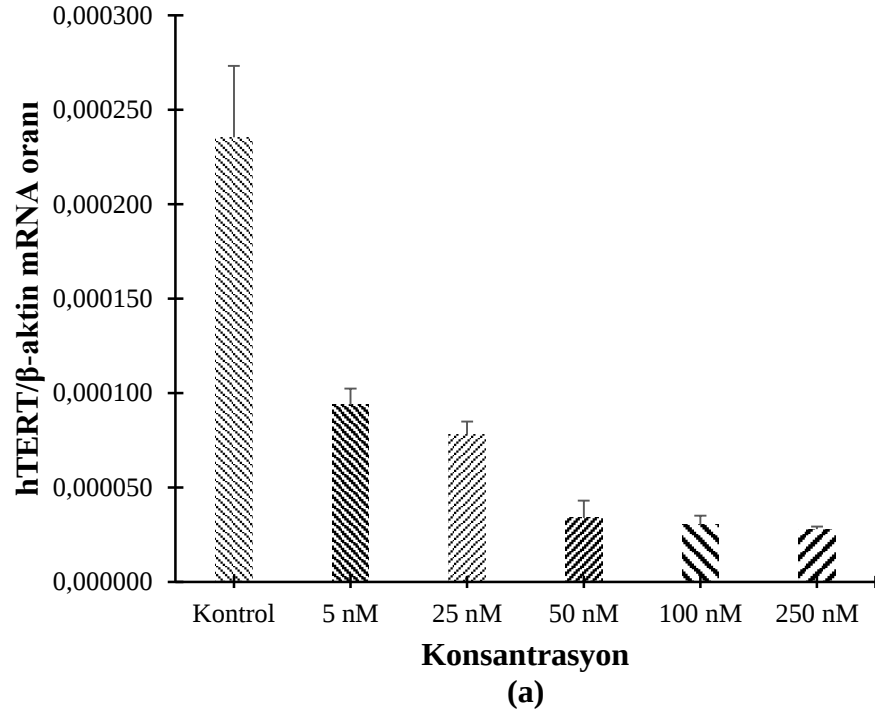
Şekil 4.74. Hidroliz prob kullanılarak β -aktin ve hTERT mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların RT-PCR ile çoğaltımı sırasında oluşan çoğalım eğrileri

β -aktin ve hTERT cDNA'ları kullanılarak yapılan RT-PCR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgüllüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda Şekil 4.75'de görüldüğü gibi her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü.

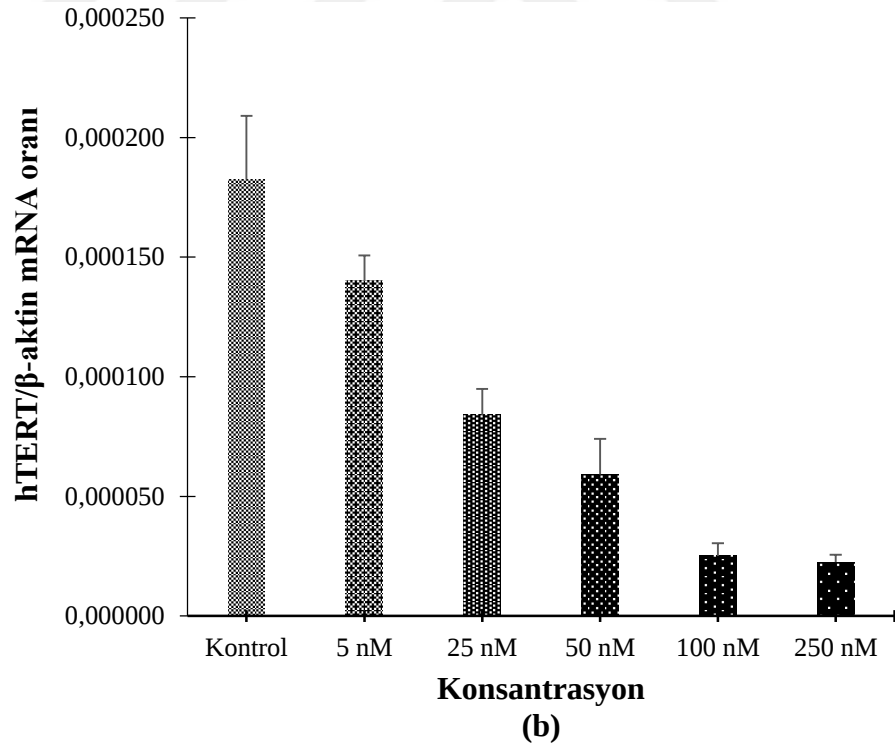
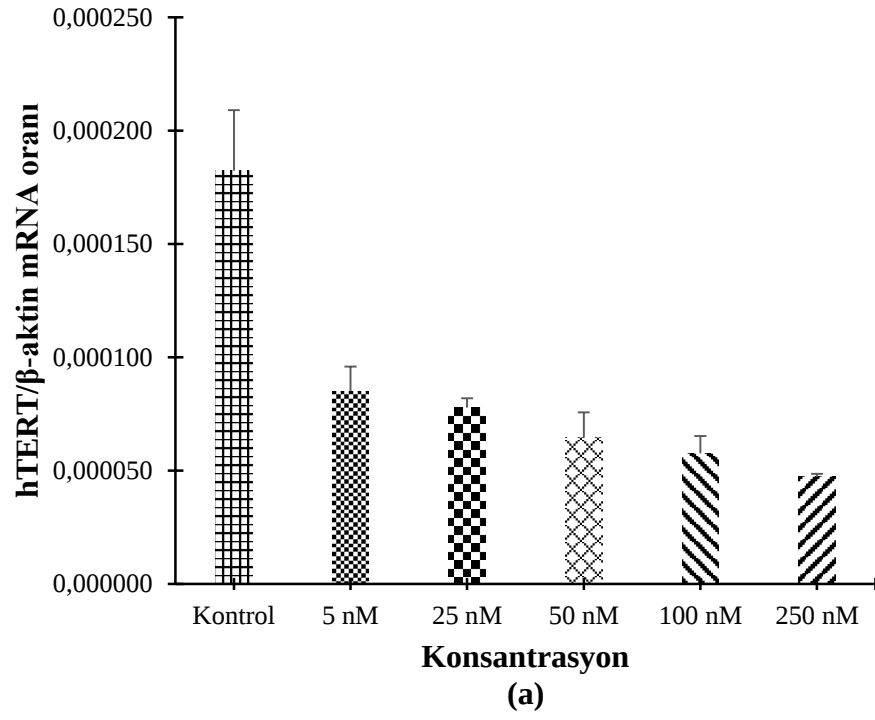


Şekil 4.75. β –aktin ve TERT cDNA’larının PCR’deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 50bp DNA Markeri’dir (Bioron, 50 bp, catalogno: 304007) (TERT; hTERT)

48 saat süreyle 5, 25, 50, 100 ve 250 nM Kukurbitasin D ve I uygulanan ve kontrol grubu LS174T ve SW620 hücrelerindeki hTERT gen ifadesindeki değişimler β –aktin genine oranla belirlendi. Elde edilen bulgular Şekil 4.76 ve 4.77’de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde LS174T ve SW620 hücrelerinin her ikisinde de hTERT mRNA gen ifade düzeyinin Kukurbitasin D ve I uygulama konsantrasyonlarına bağımlı olarak azaldığı görülmektedir. Kukurbitasin D uygulaması sonucunda, LS174T hücrelerinde %90’a, SW620 hücrelerinde ise %88’e varan oranda gen ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir. Kukurbitasin I uygulaması sonucunda ise, LS174T hücrelerinde %88’e, SW620 hücrelerinde ise %74’e varan oranda gen ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir. En fazla ve en az azalma Kukurbitasin D uygulaması sonrası LS174T hücrelerinde meydana gelmiştir. Kukurbitasin I uygulaması sonrası LS174T hücrelerinde SW620 hücrelerine nazaran hTERT mRNA oranında azalma daha fazla olmuştur.



Şekil 4.76. LS174T hücrelerinin 48 saat süreyle 5, 25, 50, 100 ve 250 nM (a) Kukurbitasin D ve (b) I uygulaması sonrasında hTERT/β-aktin mRNA oranları



Şekil 4.77. SW620 hücrelerinin 48 saat süreyle 5, 25, 50, 100 ve 250 nM (a) Kukurbitasin D ve (b) I uygulaması sonrasında hTERT/β-aktin mRNA oranları

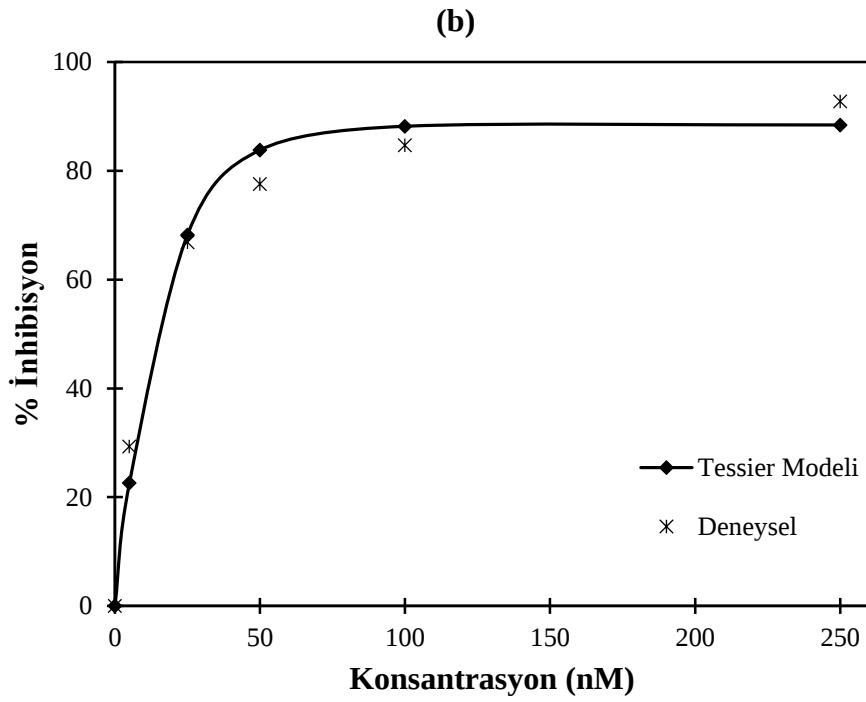
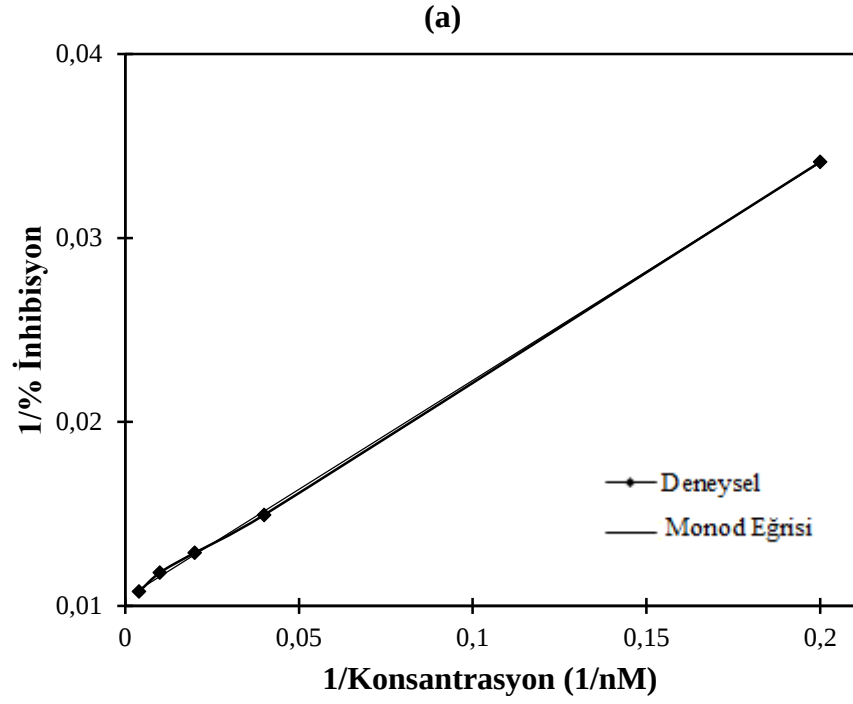
Her iki hücre hattında da 50 nM Kukurbitasin D ve I uygulamasından sonra gen ekspresyonu oranında anlamlı ve önemli ölçüde azalma olduğu istatistiksel olarak belirlendi ($p < 0,05$).

Uygulama maddesi (Kukurbitasin D ve I) konsantrasyonunun (C_k) telomeraz aktivitesi üzerine etkisi % inhibisyon hızına göre Monod (Eşitlik 4.8) ve Tessier (Eşitlik 4.9) modelleri ile test edildi. Bu amaçla öncelikle kontrole göre % inhibisyon hızları hesaplandı. % inhibisyon hızları (r_i), uygulama sonrası elde edilen gen ekspresyonunun kontrol grubunun gen ekspresyonuna oranlanması ile hesaplanmıştır.

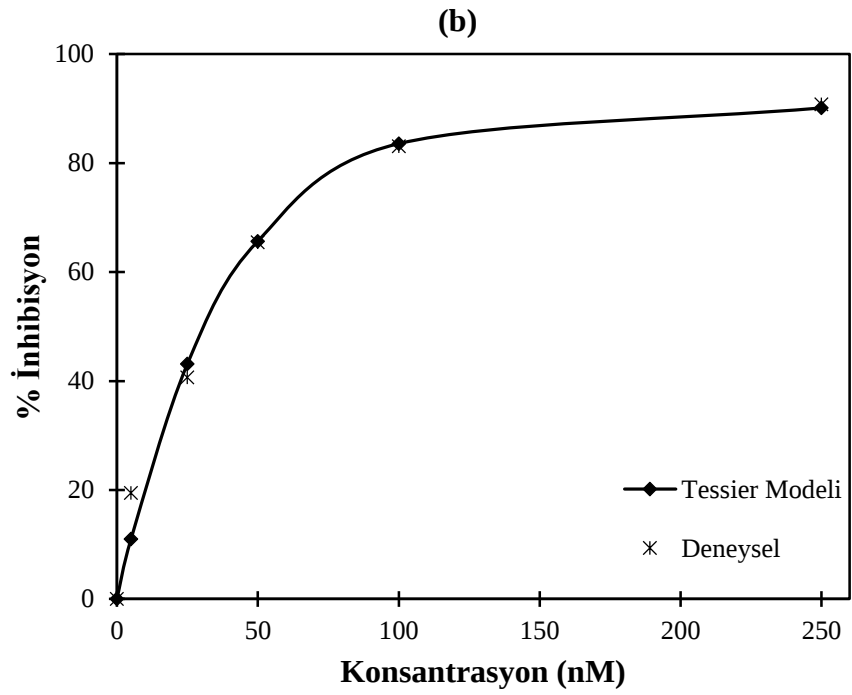
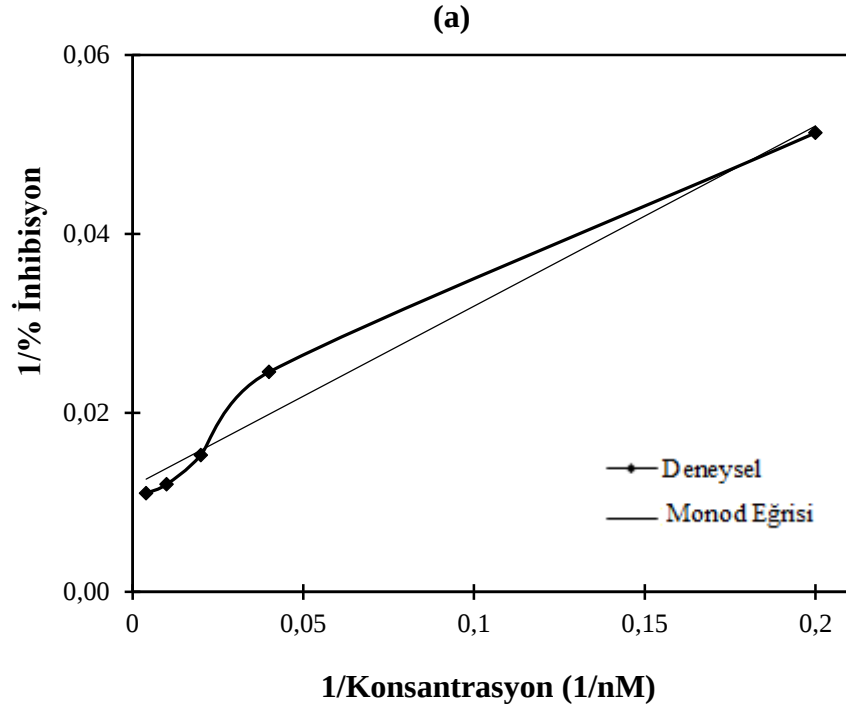
$$r_i = r_{i\max} \left(\frac{C_k}{K_k + C_k} \right) \quad (4.8)$$

$$r_i = r_{i\max} (1 - \exp(-C_k/K_i)) \quad (4.9)$$

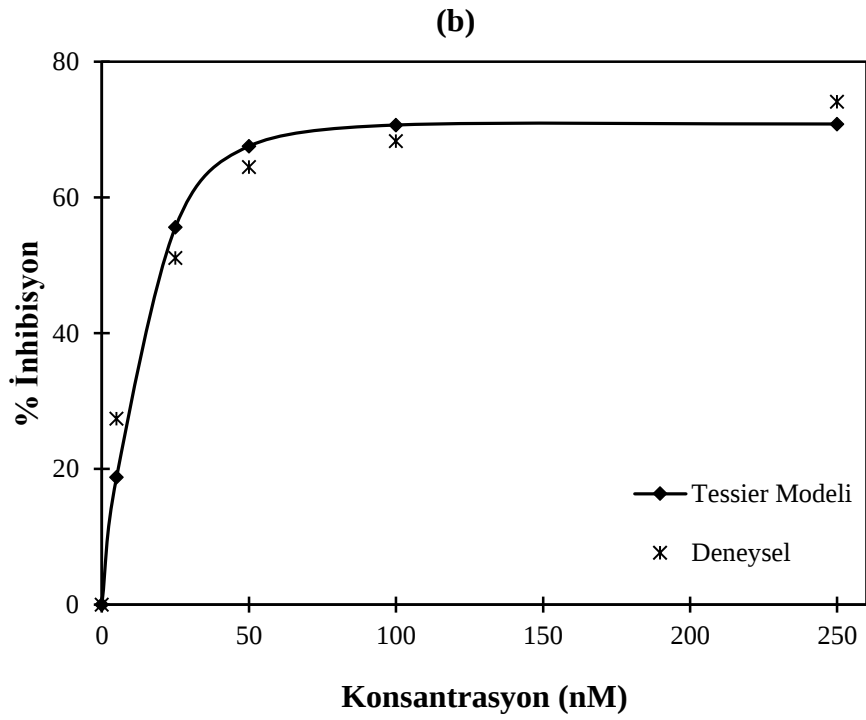
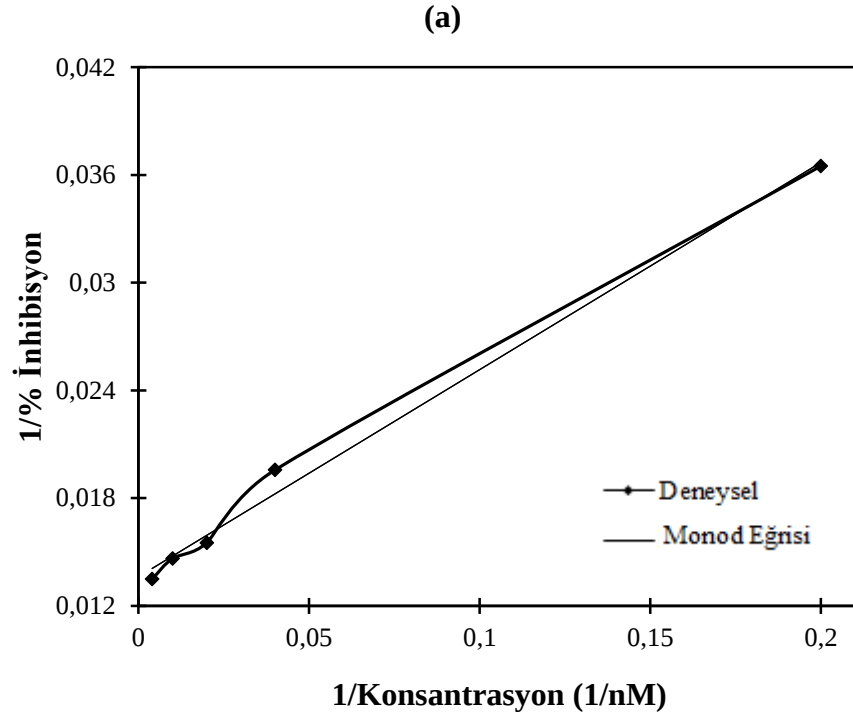
Deneyisel verilerin modellere uygunluğu ve parametrelerin (maksimum inhibisyon hızı ($r_{i\max}$), maksimum inhibisyonun %50 ve %63,2'sini sağlayan Kukurbitasin D ve I konsantrasyonu (K_k ve K_i)) değerleri, Monod modeli için Excel programı, Tessier modeli için ise MATLAB (R2009b) programındaki *fmincon* yöntemi kullanılarak hesaplandı. Deneyisel verilerin modellere uygunluğunu gösteren eğriler Şekil 4.78-81'de verilmiştir. Modellerin parametre değerleri ve performansını gösteren R değerleri de Tablo 4.10'da yer almaktadır. % inhibisyon hızı eğrileri incelendiğinde deneyisel değerler ile model değerlerinin örtüştüğü görülmektedir. hTERT mRNA gen ifade düzeyinin uygulama maddesi türü ve konsantrasyonuna göre değişimi her iki modelle de ifade edilebilmektedir.



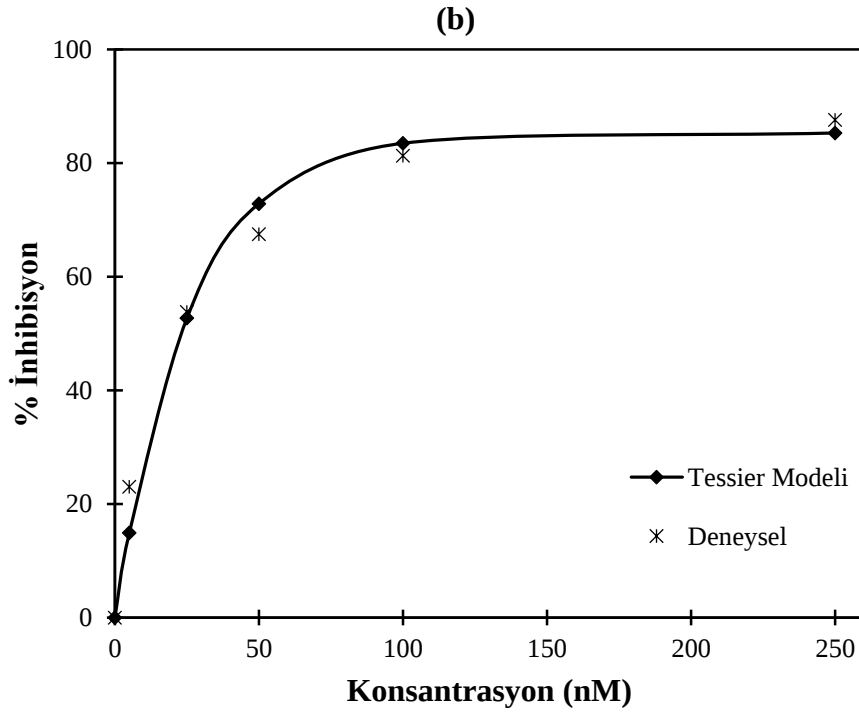
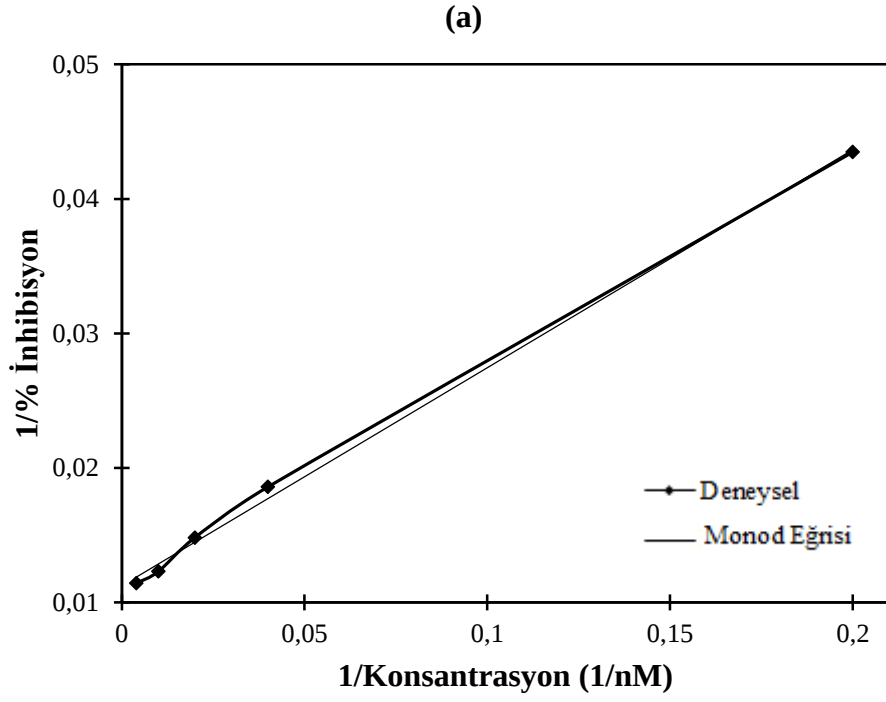
Şekil 4.78. Kukurbitasin D uygulanan LS174T hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



Şekil 4.79. Kukurbitasin I uygulanan LS174T hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



Şekil 4.80. Kukurbitasin D uygulanan SW620 hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli



Şekil 4.81. Kukurbitasin I uygulanan SW620 hücrelerinde hTERT mRNA düzeylerindeki inhibisyon miktarlarının konsantrasyona bağlı değişimi (a) Monod (b) Tessier Modeli

Tablo 4.10. hTERT mRNA gen ifade düzeyinin değişimini ifade eden Monod ve Tessier modellerinin parametre ve performans değerleri

Hücre Türü	Uygulama Maddesi	Model Parametre Değerleri				Model Performans Değereleri	
		Monod		Tessier			
		r _{imax} (%)	K _k (nM)	r _{imax} (%)	K _i (nM)	R _{Monod}	R _{Tessier}
LS174T	Kukurbitasin D	96,97	11,37	88,44	16,92	0,999	0,992
	Kukurbitasin I	84,67	17,04	90,26	38,46	0,987	0,995
SW620	Kukurbitasin D	73,48	8,48	70,83	16,26	0,997	0,988
	Kukurbitasin I	88,97	14,42	85,29	25,97	0,999	0,994

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, son yıllarda karşılaşılan en önemli hastalıklardan biridir. En basit ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan kanserin bir çok çeşidi bulunmaktadır. Kanser türlerinden kolon kanseri, dünyada kadın ve erkeklerde gözlenen en yaygın kanserlerden biridir. Kanser tedavisinde ölüm oranını azaltmak ve sağ kalım süresini ve yaşam kalitesini artırmak için farklı birçok tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Aktaş 2010). Bu yöntemler içinde ilerlemiş metastatik dönemdeki en önemli tedavi seçeneği kemoterapidir. Tedavide kullanılan kemoterapötik ajanlar, sitotoksik etkileri sayesinde tümör hücrelerinin apoptozuna neden olurken bu hücrelerin çevresindeki sağlıklı hücrelere de zarar vermekte ve öldürmektedirler (Vuorelaa vd., 2004; Lee, 2005). Bu nedenle, sağlıklı hücreler üzerinde en düşük sitotoksik etkiye sahip ajan arayışı, araştırmaları doğal bitkisel ürünlere yönlendirmiştir ve bu bitkisel ilaçlar yüzyıllardır anti-kanser ajan olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bitkilerde doğal olarak bulunan fitokimyasalların, kanser hücreleri üzerine önemli ölçüde etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Gullet vd., 2010; Karikas, 2010; Shu vd., 2010; Bishayee vd., 2011; Russo vd., 2010; Pan vd., 2011, El-Alfy vd., 2011, Wang vd., 2012). Bu çalışmada sözü edilen amaç doğrultusunda *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. bitkisinin olgun meyvelerinden elde edilen anti-kanser etkiye sahip olan fitokimyasal Kukurbitasin D ve I'nın ayrı ayrı (tek başlarına) kolon kanser hücreleri (LS174T ve SW620) üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırıldı.

Ecballium elaterium (L.) A. Rich. ülkemizde yaygın olarak yetişen bir bitkidir. Halk arasında daha çok sinüzit tedavisinde kullanılan bu bitkinin antienflamatuvar, antikanser, sitotoksik, hepatoprotektif gibi birçok faydaları bulunmaktadır. Genelde bitkinin meyve suyu üzerine çalışmalar yapılmıştır (Baytop, 1984; Atasü vd., 1985; Yeşilada vd., 1989; Sezik vd., 1995; Ekici vd., 1998; Attard vd., 2008; Razavi vd., 2009; Jaradat vd., 2012). *E.elaterium*'un temel maddesi olan birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu kabul edilen kukurbitasinler, son yıllarda yaygın olarak araştırılan fitokimyasallardandır (Gitter vd., 1961; Yeşilada vd., 1988; Yeşilada vd., 1989; Agıl vd., 1995; Miro, 1995, Blaskovich vd., 2003; Jayaprakasam vd., 2003;Bartalis, vd., 2005; Chen vd., 2005; Chen vd., 2008; Liu vd., 2008a; Liu vd., 2008b; Wakimoto vd., 2008; Bishayee vd., 2011). Kukurbitasinler içerisinde Kukurbitasin D ve I en çok bulunan kukurbitasin türlerindendir ve çeşitli insan kanser

hücre hatlarında apoptotik ve anti-proliferatif etki göstererek tümör büyümesini inhibe ettiğine yönelik çalışmalar mevcuttur (Blaskovich vd., 2003; Shi vd., 2006; Su vd., 2008; van Kester vd., 2008; Takahashi vd., 2009; Liu vd., 2009; Lee vd., 2010; Liu vd., 2010; Ding vd., 2011; Ishii vd., 2013; Kim vd., 2013) .

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, Adana'da toplanan *E.elaterium*'un meyve suyunun biyoaktif bileşenlerinden Kukurbitasin D ve I'nın ekstraksiyon ve izolasyonları için iki basamaklı bir ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminde ilk olarak meyve suyunda bulunan ve kukurbitasinlerin ekstraksiyon ve saflaştırma verimini olumsuz yönde etkileyeceği düşünülen apolar yağ asitleri, waks gibi türlerin uzaklaştırılması için 40 °C sıcaklıkta, 1:1 meyve suyu/çözücü oranında hekzanla ekstrakte edilmiş, bu işlem aynı örnek için aynı şartlarda 2 defa daha tekrarlanmıştır. Yapılan HPLC analizinde hekzan ekstraktında çok düşük miktarda Kukurbitasin D ve I tespit edilmesi bu ekstraksiyon işleminin kukurbitasinlerin izolasyon ve saflaştırılmasında etkili bir ön işlem olduğu söylenebilir.

Kloroformla gerçekleştirilen ikinci ekstraksiyon basamağında kukurbitasinlerin izolasyonları hedeflenmiştir. Literatürde kloroformun kukurbitasinler için yüksek seçiciliğe sahip olduğuna dair bilgiler yer almaktadır (Subbiah, 1999; Gry vd., 2006; Alshamsan, 2014). Ekstraksiyon işlemi oda sıcaklığında 1:1 meyve suyu/çözücü oranında 6 saat süreyle yapılmıştır. Oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında kloroformun hekzanla yapılan da olduğu gibi düz soğutucuda yoğunlaşarak ekstraksiyon ortamına dönmediği yani uzaklaştığı görülmüştür. Dolayısıyla, daha yüksek sıcaklıklarda kloroformla ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilememiştir. Meyve suyu/çözücü oranı için 1:2, 1:3 gibi denemeler yapılmıştır. Tüm bu deney sonuçlarında 6 saat süre sonunda aynı oranda kloroform tarafına kütle aktarımı olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çözücü sarfiyatını önlemek dolayısıyla daha ekonomik olmasından tüm ekstraktların hazırlanmasında meyve suyu/çözücü 1:1 oranı kullanılmış ve bu işlem aynı örnek için aynı şartlarda 2 defa daha tekrarlanmıştır. Ekstraksiyonlar sonrasında suda çözünür kısımlar uzaklaştırıldıktan sonra kloroform 40 °C'de vakum altında rotary evaporatörde son hacim 10 mL olana kadar uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon çalışmaları sonucunda kloroformda çözünen bileşenler (kukurbitasinler) kolon ve flaş kromatografileri için iki alt gruba ayrılmıştır.

Kolon ve flaş kromatografisi uygulamalarında uygun çözücü sistemini bulmak için Kukurbitasin D ve I standartları kullanılarak TLC çalışmaları yapılmıştır. Bu deneylerde birçok çözücü sistemi kullanılmış en iyi ayırım kloroform:aseton:metanol (77:10:13;v/v/v) ile elde edilmiştir. Bu çözücü sistemi kullanılarak yapılan çalışmalarda Kukurbitasin D ve I 'nın Rf değerleri sırası ile 0,61 ve 0,69 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürdeki değerlerle örtüşmektedir (Rios vd., 2005).

Kolon ve flaş kromatografisi uygulamaları sonucu elde edilen fraksiyonlarda Kukurbitasin D ve I varlığı HPLC ile tayin edilmiştir. Tablo 2.3'deki bilgiler ışığında HPLC ile tayin yöntemi geliştirilmiştir. Kolon kromatografisinde elde edilen 17 fraksiyonun üçünde, flaş kromatografisinde ise elde edilen 42 fraksiyonun on birinde Kukurbitasin D ve I varlığı tespit edilmiştir. Bütün fraksiyonlarda Kukurbitasin D ve I birlikte bulunmaktadır. İkisinin ayrı ayrı olduğu hiç bir fraksiyonun bulunmaması hem işlem kolaylığı hem de ayırım için ekstra zaman gerektirmediğinden avantaj olarak kabul edilebilir. Ayrıca, TLC çalışmalarında Kukurbitasin D ve I beneklerinin birbirine yakın olması fraksiyonlarda her ikisinin birlikte göstermektedir. Flaş kromatografisinde ise cihaz UV spektrometresi sayesinde fraksiyon toplamayı 254 nm dalga boyunda otomatik olarak yapmıştır. 254 nm dalga boyunda Kukurbitasin D ve I için piklerin düzgün olmaması, absorbanlarının düşük olması, piklerin kuyruklanması ve pik yarılmaları gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden flaş kromatografisinde kukurbitasin türlerini ayrı ayrı içeren fraksiyonlar elde edilememiştir. Bu da izolasyon çalışmalarını olumsuz yönde etkilemiştir. Bu olumsuzluğu ortadan kaldırmak için farklı dalga boyunda (Kukurbitasin D ve I 'nın maksimum absorban verdiği dalga boylarında) çalışma gerekliliği doğmuştur. Bunun için en iyi yöntem, DAD dedektöre sahip bir HPLC cihazının kullanılması olabilirdi. Tam da bu amaçla DAD dedektöre ve fraksiyon toplama sistemine sahip HPLC kullanılmıştır. HPLC kullanılmasıyla, her iki maddenin de aynı fraksiyonda olması nedeniyle flaş kromatografisindeki olumsuz durum olumlu ve avantajlı hale dönüştürülmüş oldu.

Literatürde kolon kromatografisi ve preperatif/yarı-preperatif HPLC kullanılarak Kukurbitasin türlerinin izolasyonuna yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Halaweish vd., 1993a; Subbiah, 1999; Dinan vd., 2001; Attard, 2002; Oleszek, 2002; Bartalis, 2005; Rios vd., 2005; Feng, vd., 2007; Kaya vd., 2008; Krepsky vd., 2009; Sindhu vd., 2011; Çitoğlu vd., 2012; Saker vd., 2012; Chawech vd., 2015). Fakat flaş

kromatografisi ile izolasyonuna yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Bunun da nedeninin yukarıda bahsedilen durumun olabileceği düşünülebilir. Analitik HPLC kullanılarak izolasyon çalışmalarının yapılması literatürde pek de rastlanmayan bir konudur. Bunun temel sebepleri arasında preparatif veya yarı-preparatif HPLC sistemlerinin bu amaçla kullanılıyor olmaları gösterilebilir. Bu HPLC sistemlerinde izolasyon ve saflaştırma işlemi yapabilmek için örnek miktarının ve örnekteki izole edilecek bileşenin konsantrasyonunun yüksek olması gerekliliğidir. Kolon ve flaş kromatografisi uygulamaları sonucunda elde edilen fraksiyonlarda Kukurbitasin D ve I miktarının düşük olması izolasyon ve saflaştırma işleminin analitik kolonda yapılması gerekliliğini doğurmuştur. Bu amaçla Kukurbitasin D ve I'nın analitik kolonda izolasyonu için yöntem geliştirilmiştir.

Analiz yöntemi geliştirme çalışmalarımızda tezin temelini oluşturan Kukurbitasin D ve I'nın en iyi şekilde ayrımının yapılabilmesi için akış hızı, kolon sıcaklığı, çözücü sistemi (mobil faz) gibi birçok parametre üzerinde denemeler yapılmıştır. Kukurbitasin D ve I'nın molekül özellikleri dikkate alınarak ters faz sıvı kromatografisi yöntemi ve C₁₈ kolon (5µm, 4,6x250mm) kullanılmıştır. Kromatografik saflaştırma işlemi, uygun ve doğru bir mobil faz seçimiyle sağlanabilir. Ayrıca, kromatografik çalışmalarda çözücü sarfiyatı ve kolon ömrünün uzatılması gibi nedenlerden dolayı analiz süresinin kısa olması istenmektedir. Bu denemelerde çözücü sisteminin değiştirilmesiyle analiz süresinin de değiştiği görülmüştür. Mobil faz olarak değişik oranlarda trifloroasetikasitin (TFA) kullanıldığı çözücü sistemleri dışında %2'lik asetik asit ve asetonitrilin (%100) kullandığı denemelerde en kısa analiz süresi elde edilmiştir. Burada TFA, piklerin keskinliğini arttırmak amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda; analiz süresinin daha uzun olmasına rağmen saflaştırma sonrası liyofilizasyonla çözücünün uzaklaştırılabilmesi ve safsızlık yaratmaması durumları göz önüne alındığından sadece asetonitril ve su kullanılmıştır. Kullanılan mobil fazlar; A- Asetonitril:Su (20:80; v/v) ve B- Asetonitril:Su (45:55; v/v) olarak kararlaştırılmıştır. Burada analiz süresinin uzamasına mobil faz içerisindeki asetonitril oranının artması neden olmuştur. Bu kanıya farklı oranlarda ve farklı gradient analizlerde elde edilen deneysel bulgulara göre varılmıştır. Yani, mobil fazın polaritesinin azalmasıyla alıkonma zamanının arttığı söylenebilir. Bu da literatür bilgileri ile örtüşmektedir (Krstulovic vd., 1982). Mobil faz akış hızı; 0,5; 0,75 ve 1,0

mL dak⁻¹ olarak değiştirilerek alıkonma zamanları, pik ayrılmaları ve piklerin simetrik durumları gibi parametrelere göre uygun akış hızı 0,75 mL dak⁻¹ seçilmiştir.

Kolon sıcaklığı için ise oda sıcaklığı, 30 °C ve 40 °C sıcaklıklarda çalışmalar yapılmıştır. Kolon sıcaklığı değiştiğinde alıkonma zamanlarında da değişim olmuştur. Sıcaklık arttıkça alıkonma zamanı düşmüştür. Böylelikle daha fazla çözücü israfı önlenmiş ve kolon ömründen tasarruf sağlanmıştır. Bu nedenden ötürü çalışma sıcaklığı 40°C olarak seçilmiştir. Enjeksiyon hacmi için 10, 20 ve 50 µL hacimlerde denemeler yapılmış ve enjeksiyon hacminin analiz koşullarını etkilemediği sonucuna varılmıştır.

Yapılan analiz çalışmalarında Kukurbitasin D ve I'nın UV spektrumlarından maksimum absorbans dalga boyları sırasıyla 230 ve 235 nm olarak belirlenmiş ve kantitatif tayin çalışmaları bu dalga boylarında yapılmıştır. DAD dedektörün özelliği itibariyle Kukurbitasin D için 230 nm ve Kukurbitasin I için 235 nm dalga boylarında değerlendirmeler yapılmıştır. İzolasyon işlemleri, her iki kukurbitasin türü için literatürde ve ürün bilgi formlarında belirtilen 229 nm dalga boyunda yapılmıştır (Attard, 2002; Rios vd., 2005; Saker vd., 2012; Anonim, 2013a; Anonim, 2013b).

HPLC yönteminde standart Kukurbitasin D pik alanlarının konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin 25-500 mg L⁻¹ aralığında (Şekil 3.16), standart Kukurbitasin I pik alanlarının konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin ise 5,5-110 mg L⁻¹ aralığında doğrusal olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.17). Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon denklemi, korelasyon analizi sonucunda R ve R² katsayıları elde edilmiştir (Tablo 3.2-3). Kukurbitasin D ve I için elde edilen korrelasyon katsayıları sırasıyla 0,9924 ve 0,9980 olarak bulunmuştur.

Böylelikle, Tablo 3.1'de belirtilen kromatografik koşullarda çalışma gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, Kukurbitasin D kolonu daha önce terk etmiştir. Kullanılan çözücü sistemi ve kolona göre değerlendirme yapıldığında, Kukurbitasin D, Kukurbitasin I'ya göre daha apolardır.

HPLC yöntemi oluşturulduktan sonra kolon ve flaş kromatografilerinde elde edilen tüm fraksiyonlar HPLC ile analiz edilmiş ve Kukurbitasin D ve I içeren fraksiyonlar belirlenmiştir. Kolon kromatografisinde 9-11. fraksiyonlarda, flaş kromatografisinde ise 21-31. fraksiyonlarda hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I varlığına rastlanmıştır. Bu fraksiyonlardaki Kukurbitasin D ve I tekrar eden 50 µL'lik

enjeksiyonlarda HPLC cihazında fraksiyonlanarak toplanmıştır. HPLC uygulamasında Kukurbitasin D ve I'nın en saf hallerinin toplanabilmesi için elde edilen kromatogramda bu bileşenlerin en saf olduğu pik aralığının toplanması gerekmektedir. DAD dedektör sayesinde elüe edilen kromatogramdaki Kukurbitasin D ve I piklerinin spektrumu, farklı dalga boylarındaki görüntüleri ve pik saflıkları tespit edilmiştir. Bu işlem, her 3 enjeksiyonda bir yapılarak fraksiyon toplayıcısı için valf açma kapama süreleri gibi kontrol edilmiş ve gerekli düzeltmeler yapılmıştır. Daha sonra izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın kalitatif tayinleri saf standartları bulunduğundan direk aynı şartlarda kromatografik analizle yapılmıştır. İzole edilen Kukurbitasin D ve I'nın saflık analizleri yukarıda bahsedilen şekilde yapılmıştır (Şekil 4.28 ve 4.35). Saflık değerleri (Pik Purity Index) Kukurbitasin D ve I için sırasıyla 0,9990 ve 1,0000 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler, izole edilen her iki bileşenin de yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. İzole edilen ve standart kukurbitasin türlerinin aynı kromatografik koşullarda yapılan analizleri sonucu elde edilen kromatogramları karşılaştırılarak izole edilen bileşenlerin Kukurbitasin D ve I olduğu ispatlanmıştır (Şekil 4.31 ve 4.38). Sonrasında izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın kalibrasyon grafikleri kullanılarak kantitatif tayinleri yapılmıştır. Kukurbitasin D konsantrasyonunun 418 µM ve Kukurbitasin I konsantrasyonunun ise 296 µM olduğu belirlenmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları, kanser tedavisi için yeni ajanların araştırılmasında ilk basamağı oluşturmaktadır. Öncelikle hücre kültürlerindeki etkinliklerinin ortaya konması gerekmektedir (Doyle vd.,1998). JAK-STAT sinyal yolağının kuvvetli bir inhibitörleri olan kukurbitasinler, çeşitli kanser hücre hatlarında, JAK-STAT fosforilasyonunu inhibe ederek apoptozu uyarmakta ve hücre proliferasyonunu baskılayarak tümör gelişimini inhibe etmektedir (Lee vd., 2010; Alghasham, 2013; Kim vd., 2013; Manayi, 2015). Yapılan literatür araştırmalarında; kolon kanseri konusunda yapılan çalışmalarda daha çok HT-29 ve HCT-116 kolon hücre hatlarının tercih edildiği gözlenmiştir. Kukurbitasinlerin kolon kanser hücreleri üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, literatürde lenfoma, lösemi, meme kanseri, akciğer kanseri, hepatom, gırtlak kanseri, osteosarkom, glioblastom ve melanom gibi çeşitli kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalar da mevcuttur (Wakimoto vd., 2008; Yin vd. 2008; Liu vd., 2008b, Duangmano vd., 2010; Ouyang vd., 2011; Lee vd., 2011). Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, SW480 kolon

kanser hücrelerine Kukurbitasin I uygulandığında hücre proliferasyonunun inhibe edildiği izlenmiş ve bu maddenin yeni antikanser ajan olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Kim vd., 2014). LS174T ve SW620 insan kolon karsinoma hücre kültürlerinde çalışmalara pek rastlanılmamakla birlikte bu hücre kültürlerinde kukurbitasinlerin etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda LS174T ve SW620 kolon kanser hücre kültürlerine farklı konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda Kukurbitasin D ve I uygulamasının bu hücreler üzerine sitoksisite sağlayacağı ve proliferasyon hızlarını düşüreceği veya durduracağı hipotezi ile çalışmanın bu kısmı yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında, LS174T ve SW620 hücre hatlarında Kukurbitasin D ve I'nın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılıkları MTT yöntemiyle belirlenmiştir.

Kukurbitasin D ve I'nın LS174T ve SW620 hücreleri üzerine antiproliferatif etkisini tespit etmek için her iki hücre hattı da çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan Kukurbitasin D (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) ve Kukurbitasin I (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) ile 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 ve 96 saat inkübe edilip bu süreler sonunda hücre proliferasyonu MTT testi ile belirlenmiştir.

MTT testleri sonucu elde deneysel veriler kullanılarak oluşturulan eğrilere bakıldığında (Şekil 4.40-41) besiyer ortamında ve deney koşullarda sadece kukurbitasinlerin konsantrasyonlarını değiştirilip diğer tüm özellikler sabit tutulduğunda hücre sayısındaki/absorbansdaki azalmaların hücrelerin çoğalma hızlarının konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak yavaşladığı (antiproliferatif etki) görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda (5 ve 25 nM) hücre çoğalma hızının sadece yavaşladığı fakat daha yüksek konsantrasyonlarda (50, 100 ve 250 nM) çoğalma hızının ilerleyen sürelerde önce yavaşladığı sonra kısa bir süre sabit kaldığı ve sonrasında ise ölüm hızının arttığı görülmüştür. Bu çalışmada, en yüksek inhibisyon miktarı ve ölüm oranının beklenildiği gibi en yüksek konsantrasyon olan 250 nM 'lık uygulamalarda görülmüştür. Farklı konsantrasyon uygulamaları ile yapılan denemelerde canlı hücre sayısını ifade eden absorbans miktarları ile uygulama süresi (zaman) arasındaki ilişki Şekil 4.40-41'deki grafiklerde gösterilmiştir. Bu grafiklerde de görüldüğü gibi, hücre sayısındaki azalmanın uygulama süresine bağımlılığı oldukça belirgindir. Bu nedenle başlangıç için düşük konsantrasyonlarda çoğalma hızının 1. mertebeden, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre çoğalma hızının yine 1. mertebeden

ayrıca hücre ölüm hızının da 1. mertebeden olabileceği düşünülmüştür. Fakat veri analizleri sonucunda grafiklerdeki eğrilerin hem çoğalma hem ölüm kısmının lineer olmadığı görüldüğü için 1. mertebe yaklaşımından vazgeçilmiştir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda elde edilen eğrilerin kanser hücrelerinin de çoğalmasını ifade eden sigmoidal eğriler olduğu görülmüştür. Bu sigmoidal eğrileri temsil edecek model denklemleri yine literatürde oldukça yer bulmaktadır (Norton, 1988; Marusic, 1996; Stock vd., 2003; Kozusko vd., 2007).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen matematiksel modelleme çalışmaları ile, Bölüm 4.6’da hücre sayısındaki değişim için zamana karşı elde edilen tüm deneysel veriler analiz edilmiş ve bu deneysel veri setleri kullanılarak hücre sayısının zamanla değişiminin (hücre çoğalım kinetiğinin) aşağıda verilen exponensiyal denklemlerle (uygulama yapılmayan kontrol grupları için Eşitlik 2.5, düşük uygulama konsantrasyonları (5-25 nM) için Eşitlik 4.1 ve yüksek uygulama konsantrasyonları (50-250 nM) için Eşitlik 4.2 ile ifade edilebileceği bulunmuştur.

$$N(t) = N(0) * \exp(k * [1 - \exp(-b * t)]) \quad (2.5)$$

$$k = \log_e \left[\frac{N^{(\infty)}}{N(0)} \right]$$

$$N(t) = a * \exp(-b * t^n) + c * \exp(d * t) \quad (4.1)$$

$$N(t) = a * \exp(-b * t^{-n}) + (1 + a) * \exp(-c * a * t^m) \quad (4.2)$$

$N(t)$; zamanla hücre sayısındaki değişimi, $N(0)$ ise başlangıç hücre sayısını ifade etmektedir. a , b , c , d , n ve m değerleri farklı deneyler için farklı değerlere sahip denklem sabitleridir. Hem literatürde yer alan eşitliğin (Eşitlik 2.5) hem de yeni oluşturulan model eşitliklerinin (Eşitlik 4.1 ve 4.2) model parametreleri ve değerleri de bulunmuştur. Parametre belirlemede, hal değişkenlerinin öngörülen değerleri dinamik verilere en iyi şekilde uydurmaya çalışılmaktadır. Cebirsel denklem sistemlerinin parametrelerinin belirlenmesinde özel geliştirilmiş SQP (*‘Sequential Quadratic Programming’*) ile dikey teknikleri birlikte kullanıldığı, ayrıca parametre tahmini için genel bir SQP algoritması geliştirildiği literatürde yer almaktadır (Tjoa vd., 1991; Liebman vd., 1992; Esposito vd., 2000). Parametre belirleme işlemi, her noktada; hal değişkenleri için bulunan tahmin değerleri ile deneysel değerler arasındaki farkın kareleri toplamı

olarak tanımlanan bir amaç fonksiyonunun minimum yapılmasını gerektirmektedir ki bu optimizasyon işlemi için de SQP yöntemini temel alan Matlab programındaki *fmincon* optimizasyon yöntemi kullanılmıştır. Tanımlanan amaç fonksiyonunun (Eşitlik 2.6) değeri minimum olduğunda parametre değerleri belirlenmiştir. Belirlenen parametrelerle model çalıştırılmış ve modelden elde edilen değerlerle deneysel verilerin oldukça uyumlu olduğu görülmüştür.

Her iki hücre hattında da hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I uygulama konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Böylece çalışmada LS174T ve SW620 hücrelerine Kukurbitasin D ve I'nın tek başlarına uygulanmaları sonucunda konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılık oranlarında azalmaya neden oldukları belirlenmiştir. Her iki uygulama maddesi de düşük dozlarda bile her iki hücrenin de canlılık oranlarında azalma meydana getirdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I'nın SW620 hücrelerinin canlılığını daha fazla etkilediği gözlenmiştir.

Uygulama maddelerinin konsantrasyonlarının hücreler üzerine etkisini daha iyi anlatabilmek için IC_{50} değerlerine bakılmıştır. IC_{50} değerleri, Weibull eşitliği kullanılarak doğrusal olmayan regresyon yöntemi ile hesaplanmıştır. Literatürde daha çok IC_{50} değerlerini hesaplamak için lineer veya logaritmik regresyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun yanında doğrusal olmayan regresyonla hesaplandığını gösteren literatür bilgileri de bulunmaktadır (Parellada vd., 1995; Lyles vd., 2008; Kaleağasıoğlu vd., 2014). Çalışmada lineer veya logaritmik regresyon yöntemleri ile IC_{50} değerleri hesaplamak için oluşturulan doğruların R^2 değerleri düşüktür. Böylece hesaplan IC_{50} değerleri deneysel olarak tahmin edilen IC_{50} değerlerinden oldukça farklı çıkmaktadır. Bu nedenle deneysel değerlere daha yakın sonuç bulmak için doğrusal olmayan regresyon analizi yapılmıştır. Bu amaçla doğrusal olmayan Weibull eşitliği (Eşitlik 4.3) kullanılmıştır. IC_{50} değerlerinin bulunması için yapılan modellemede modelde mevcut parametreleri hesaplamak için eğri uydurma (curve fitting) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem Matlab programındaki *fmincon* yöntemi ile yapılarak model parametreleri ve model performansını gösteren MAE, MAPE, RMSE ve R değerleri bulunmuştur (Tablo 4.6). Hem model performans değerleri incelendiğinde hem de model parametreleri kullanılarak oluşturulan grafiklere (Şekil 4.55-68) bakıldığında

doğrusal olmayan regresyon analizinin IC_{50} değerlerini hesaplamak için daha uygun olduğu görülmektedir.

Her iki hücre hattında da kukurbitasin türlerinin (Kukurbitasin D ve I) hücrelerin yarısını öldürmek için gerekli olan IC_{50} konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak azaldığı bulunmuştur (Tablo 4.7). Buna göre, LS174T hücrelerinde Kukurbitasin D'nin IC_{50} konsantrasyonu 60. saatte 70 nM iken Kukurbitasin I'nın IC_{50} konsantrasyonu 122 nM dir. Bu değerler 60. saatte LS174T hücreleri üzerinde Kukurbitasin D'nin daha etkili olduğunu göstermektedir. Fakat ilerleyen inkübasyon sürelerinde bu durum tersine dönmüş ve Kukurbitasin I daha etkili olmuştur. Bu durumun uygulama maddelerinin hücre çoğalmasını farklı şekillerde inhibe ettiklerini göstermektedir. Aynı durum SW620 hücreleri için de geçerli olduğu sonuçlardan anlaşılmaktadır. 72. saatte en az etki, SW620 hücrelerine Kukurbitasin D uygulanmasında gerçekleşmiştir. Diğer uygulamalarda yaklaşık aynı IC_{50} konsantrasyonları (yaklaşık 45 nM) bulunmuştur. 48. saatte hem Kukurbitasin D hem de Kukurbitasin I uygulamasında yalnızca SW620 hücrelerinde IC_{50} konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu da kukurbitasinlerin daha çok SW620 hücreleri üzerine etkili olduğunu göstermektedir. En düşük IC_{50} konsantrasyon değeri (19 nM), 96. saatte Kukurbitasin I'nın LS174T hücrelerine uygulanmasında elde edilmiştir.

Hücre çoğalması üzerine çoğalmayı etkileyen uygulama maddelerinin konsantrasyonlarının etkisini ifade etmek için kullanılan çok sayıda kinetik model mevcuttur (Bailey vd., 1986; Shuler vd., 2002; Türker, 2005). LS174T ve SW620 hücre sayıları Kukurbitasin D ve I konsantrasyonları ile orantılı bir şekilde azalmaktadır. Bu ilişki Eşitlik 4.6 ile verilmiştir. Deneysel veri setleri kullanılarak bu eşitlikten elde edilen özgül çoğalma hızları (μ) (Tablo 4.8) kullanılarak Monod ve Tessier modelleri (Eşitlik 4.6-7) ile konsantrasyon etkisi araştırılmıştır. Monod modeli en çok kullanılan yapısal olmayan çoğalma modellerinden biridir. Genellikle çoğalma hızının yavaş ve hücre yoğunluğunun düşük olduğu zaman deneysel verilerle oldukça iyi uyumaktadır. Yapılan çalışmanın, Monod modeline Şekil 4.69-72'deki grafiklere ve Tablo 4.9'daki model performans değeri R^2 'ye bakıldığında LS174T hücrelerine Kukurbitasin I uygulaması dışında uymadığı görülmektedir. Kukurbitasin D ve I'nın hücre çoğalmasını yavaş bir şekilde azalttığı anlaşılmaktadır. Monod modeli deneysel verilerle uyummayınca diğer bir çoğalma hız modeli olan Tessier modeli kullanılmıştır. Tessier modeli uygulama maddesi besiyer ortamına verildiğinde difüzyon kontrollü

çoğalmayı modellemek için kullanılmıştır. Yine şekillerdeki grafiklere ve tablodaki R değerlerine bakıldığında deneysel verilerin bu modele uyduğu açıkça görülmüştür. Bu durumda hücre çoğalması üzerine etki difüzyon kontrollü olarak gerçekleşmektedir. Ne kadar uygulama maddesi hücre içerisine difüze olursa o kadar etki görülmektedir. Model parametreleri yine Matlab programındaki *fmincon* yöntemi ile belirlenmiştir. Düşük K_s ve K_i değerleri uygulama maddelerinin daha etkin olduğunu göstermektedir. Genel olarak değerlendirme yapıldığında Monod modeline göre hücre çoğalmasına en çok etkiyi Kukurbitasin D, SW620 hücreleri üzerine etki ederek, Tessier modeline göre ise Kukurbitasin I LS174T hücreleri üzerine etki ederek göstermiştir.

Çalışmada ayrıca LS174T ve SW620 hücrelerine 48 saat süreyle ayrı ayrı Kukurbitasin D ve I uygulaması sonrası hTERT mRNA düzeyleri ölçülerek telomeraz aktivitesi araştırılmıştır. Kukurbitasin D ve I'nın telomeraz aktivitesi üzerine etkisine dair literatürde çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle yapılan çalışma bu kapsamda ilk olma niteliğindedir. Literatürde bir kukurbitasin türü olan Kukurbitasin B'nin telomeraz aktivitesini azalttığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Duangmano vd., 2010) Bu bilgidan yola çıkarak telomeraz aktivitesi üzerine deneysel çalışma yaparak Kukurbitasin D ve I'nın hücre çoğalması üzerine inhibe edici etkisinin mekanizmasının açıklanması amaçlanmıştır. Kanser hücreleri çoğalabilmeleri için telomeraz aktivitesine ihtiyaç duymaktadırlar ve insan kanser hücrelerinin %90'ının üzerinde telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir (Kim vd., 1994; Masutumi vd., 2003; Huang vd., 2005; Güzelgül vd., 2010). Telomerazın diğer bileşenleri her yerde eksprese edilirken hTERT mRNA 'sının telomeraz aktivitesi ile eksprese olması nedeniyle telomeraz aktivitesi, bu genin ekspresyonuna bağımlı olmaktadır (Engelhardt vd., 1997; Boldrini vd., 2002; Caine vd., 2008). Kolorektal kanserlerde %93 oranında telomeraz aktivitesi saptanmıştır (Dikmen vd., 2003). Yapılan çalışmada kontrol gruplarında hTERT mRNA ifade düzeyinin β -aktin genine oranla artması bu hücre türlerinde telomeraz aktivitesinin arttığını göstermektedir. hTERT mRNA gen ifade düzeyleri, hidroliz problu RT-PCR cihazı ile tayin edilmiştir. Literatürde telomeraz aktivitesinin RT-PCR ile analizine yönelik farklı yöntemler bulunmaktadır (Durusoy, 2003; Ohuchida vd., 2005; Kong vd., 2007; Shabani vd., 2014). Kullanılan yöntem yeni bir yöntem olmakla birlikte hızlı, güvenilir sonuç vermektedir. 50 nM Kukurbitasin D ve I uygulaması sonrası 48. saatte LS174T ve SW620 hücrelerinin her ikisinde de anlamlı düzeyde azalma göstermiştir ($p < 0,05$).

Uygulama yapılmayan kontrol gruplarına göre %50 oranında inhibisyon gösteren konsantrasyon sitotoksik konsantrasyon kabul edildiğinden istatistiksel değerlendirme bu konsantrasyonda yapılmıştır. hTERT mRNA ifade düzeyi (telomeraz aktivitesi) artan uygulama konsantrasyonuna (5, 25, 50, 100 ve 250 nM) bağlı olarak azalma göstermiştir (Şekil 4.76-77). Her iki kükurbitasin türü de en çok LS174T hücrelerinde hTERT mRNA ifade düzeyini azaltmıştır. Kükurbitasin D; LS174T hücrelerindeki hTERT mRNA düzeyini SW620 hücrelerindeki yaklaşık olarak 1,5 kat daha fazla azaltmıştır. Kükurbitasin I ise her iki hücre türündeki hTERT mRNA düzeyini yaklaşık olarak aynı oranda azaltmıştır. Kükurbitasin I uygulamasındaki hTERT mRNA düzeyi Kükurbitasin D uygulamasındaki ile karşılaştırıldığında her iki hücre türünde de önemli ölçüde inhibe ettiğinden hTERT gen ekspresyonunu dolayısıyla telomeraz aktivitesini düşürmede daha etkindir.

Monod ve Tessier modelleri yapılan modifikasyonla (Eşitlik 4.8-9) Kükurbitasin D ve I'nın telomeraz aktivitesi üzerine etkisini modellemek için kullanılmıştır. Deneysel verilerle her iki modelden elde edilen veriler uyum göstermiştir (Şekil 4.78-81). Tablo 4.10'daki performans değerleri (R) her iki model için de 1'e yakın bulunmuştur. Bu modellerle %50 ve %63,2 inhibisyonun gerçekleştiği (K_k ve K_i) konsantrasyon değerleri bulunmuştur. K_k ve K_i değerlerine göre, en fazla etki SW620 hücrelerine Kükurbitasin D uygulamasıyla en az etki ise LS174T hücrelerine Kükurbitasin I uygulaması ile elde edilmiştir. Kükurbitasin D ve I'nın hTERT mRNA ifade düzeylerini farklı oranlarda etkilemeleri inhibisyon mekanizmalarının farklı olabileceği yönünde fikir vermektedir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada, *E.elaterium* bitkisinin olgun meyvelerinden analitik HPLC sistemi yardımıyla izole edilen Kukurbitasin D ve I'nın konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak kolon kanser hücre hatları LS174T ve SW620 hücreleri üzerine olan antiproliferatif etkileri araştırıldı. Bu etkiler kurulan matematiksel modellerle de ifade edildi. Ayrıca 48. saatte Kukurbitasin D ve I'nın LS174T ve SW620 hücrelerinde hücre çoğalması ile ilişkili olan hTERT mRNA ifade düzeyleri üzerine etkisi RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, bu iki bitkisel doğal bileşik (Kukurbitasin D ve I) kolon kanserinin tedavisi için potansiyel bir aday olabilir. Kontrol gruplarındaki hTERT'in kantitatif tayini kanser teşhisi, uygulama gruplarındaki ise kanserin takibi ve tedavisi hususundaki düşünceleri destekler niteliktedir.

Yapılan çalışmanın geliştirilerek literatüre katkı sağlaması için öneriler;

- 1- Daha kısa zamanda ve daha yüksek miktarda kukurbitasin türlerinin ayrı ayrı elde edilmesi için geliştirilen HPLC yönteminin preperatif HPLC sistemine uyarlanması yapılabilir.
- 2- Hücrelerin kültür ortamında ve organizmada ait oldukları dokuda farklı davranış gösterdiklerinden Kukurbitasin D ve I'nın etkilerinin daha net bulunması için hayvan modelleri ile çalışmalar yapılmalıdır. *In vivo* çalışmalar ile Kukurbitasin D ve I'nın antikanser ajanlar olarak LS174T, SW620 ve diğer kolon kanser hücre hatları üzerine olan potansiyel kanser önleyici etkisinin ortaya çıkarılması, daha etkin tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlayacak bu moleküllerin uyardığı ya da baskıladığı sinyal yolları tanımlanmalı ve böylelikle kolon kanseri tedavisinde daha başarılı yaklaşımların ortaya çıkmasına olanak sağlanmalıdır.
- 3- Oluşturulan matematiksel model eşitliğindeki parameterelerin biyolojik anlamlarını belirleyebilmek veya bu parametere değerlerinden biyolojik parametreleri hesaplayabilmek için farklı uygulama maddeleri, farklı hücre türleri ile daha fazla deneyle yapılmalıdır. Böylece kanser hücrelerinin çoğalma eğrilerini ifade edecek standartlaşmış yeni model literatüre kazandırılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Abbas, S., Vincourt, J.B., Habib, L., Netter, P., Greige-Gerges, H., Magdalou, J. (2013). The cucurbitacins E,D and I: Investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver, *Toxicology Letters*, **216**, 189-199.
- Afifi, M.S., Ross, S.A., Elsohly, M.A., Naeem, Z.E., Halaweish, F.T. (1999). Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *Journal of Chemical Ecology*, **25** (4), 847-859.
- Agıl, M.A., Risco, S., Miro, M., Navarro, M.C., Ocete, M.A., Jimenez, J. (1995). Analgesic and antipyretic effects of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. extract in rodent. *Phytother. Res.* **9**, 135-138.
- Agıl, A., Miro, M., Jimenez, J., Aneiros, J., Caracuel, M.D., Garcia-Granados, A., Navarro, M.C. (1999). Isolation of an anti-hepatotoxic principle from the juice of *Ecballium elaterium*. *Planta Med.* **65**, 673-675.
- Akpınar, G. (2006). *Kolon kanserinde apolipoprotein E (APO E) gen polimorfizminin araştırılması*. Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, İzmit.
- Aksu, A. (2012). *Kanser Tanısı Konmuş Çocuk Yakınlarının Bakım Yüklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Haliç Üniversitesi, İstanbul.
- Aktaş, S.H. (2010). *Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin in vivo ve in vitro incelemesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Alghasham, A.A. (2013). Cucurbitacins - A Promising Target for Cancer Theraphy, *International Journal of Health Sciences*, **7(11)**, 68-79.
- Algshamsan, A. (2014). Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal* ,**22(3)**, 219-222.
- Anonim. (2012). http://www.hakaynasi.com/nazan_basogul,35/495_aci_kavunun_faydalari_ve_kullanimi/hakaynasi.aspx (Erişim 10.01.2012).
- Anonim. (2013a). <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/triterpene/cucurbitacin-d-p4837760-c0023-s.html> (Erişim: 10.01.2013).
- Anonim. (2013b). <http://www.extrasynthese.com/products-catalog/triterpene/cucurbitacin-i-p4836905-c0021-s.html> (Erişim: 10.01.2013).
- Anonim. (2014a). <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-dunya-kanser-istatistikleri-yayinlandi.html> (Erişim: 25.05.2014).

- Anonim. (2014b). http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_shE.elateriumts_cancer.aspx (Erişim: 25.05.2014).
- Anonim.(2014c).http://en.wikipedia.org/wiki/Colorectal_cancer#Signsandsymptoms Colorectal Cancer. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2014d). <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CL-188.aspx#characteristics> LS174T Hücre Hattı. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2014e). <http://www.ntrc.nl/wp-content/uploads/2015/01/Oncolines-LS-174T-data-sheet.pdf>LS174T Hücre Hattı. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2014f). <http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/3/5/E/1/33197.ashx> LS174T Hücre Hattı. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2014g). http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=tr#characteristics SW620 Hücre Hattı. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2014h). http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/colorectal/NCI-PBCF-CCL227_SW620_v1.0_SOP-508.pdf SW620 Hücre Hattı. (Erişim: 03.07.2014).
- Anonim. (2015a). <https://www.facebook.com/tipnotlari/posts/377530902365957> Kanser hücresi büyüme kinetiği. (Erişim: 10.09.2015).
- Anonim. (2015b). <http://194.27.49.11/makine/ikaymaz/optimizasyon/dosyalar/MatlabOptim.pdf>*fmincon* (Erişim: 10.09.2015).
- Atas, E., Cihangir, V. (1985). *Ecballium elaterium* L. Bitkisinin Farmakognozide Yeri. *Pharmacia – JTPA*. **25:55**, 391 – 395.
- Attard, E. (2002). Rapid Detection of Cucurbitacins in Tissues and *in vitro* Cultures of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*. **25**, 71-75.
- Attard, E., Attard, H. (2008). Antitrypsin Activity of Extracts from *Ecballium elaterium* Seeds. *Fitoterapia*, **79**, 226 – 228.
- Attard, E., Brincat, M. P., Cuschieri, A. (2005). Immunomodulatory activity of cucurbitacin E isolated from *Ecballium elaterium*, *Fitoterapia*, **76**, 439 – 441.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill,Inc., USA. 373-454.
- Balbaa, S.I., Zaki, A.Y., El-Zalabani, S.M. (1979). Cucurbitacin content in the different organs of *Ecballium elaterium* (A. Rich) cultivated in Egypt. *Egypt J. Pharm. Sci.* **20** 81-4), 221-228.

- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, **78**, 431-441.
- Barbercheck, M.E., Wang, J. (1996). Effect of Cucurbitacin D on in Vitro Growth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. *Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes*, **68**, 141-145.
- Bartalis, J., Halaweish, F.T. (2005). Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Journal of Chromatography B*. **818(2)**, 159-166.
- Bayramoğlu, A. (2006). Mesane kanserli hastaların idrar örneklerinde telomeraz enzim aktivitesi. *FU Sağ Bil Tıp Derg*; **20(6)**, 423-426.
- Baytop, T. (1984). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, İst. Üni. yayını No. 3255, Ecz. Fakültesi No:40, Sanal Matbaacılık, İstanbul, syf.173.
- Bilgin, Ö.C., Esenbuğa, N. (2003). Doğrusal-olmayan büyüme modellerinde parametre tahmini. *Hayvansal Üretim*, **44(2)**, 81-89.
- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N., Perloff, M. (2011). Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci*. **16**, 980–996.
- Blackburn, E.H. (2005). Telomeres and telomerase: Their mechanism of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.*, **579**, 859-862.
- Blaskovich, M.A., J. Sun, A. Cantor, J. Turkson, R. Jove, and S.M. Sebti. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.*, **63**, 1270-1279.
- Boldrini, L., Faviana, P., Gisfredi, S., Zucconi, Y., Di Quirico, D., Donati, V., Berti, P., Spisni, R., Galleri, D., Materazzi, G., Basolo, F., Miccoli, P., Pingitore, R., Fontanini, G. (2002). Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in colon cancer. *Int. J. Oncol.*, **21**, 493-497.
- Buğra, D. (2004). Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Kolorektal Özel Sayısı*. **9(1)**, 1-9.
- Burger, A.M., Double, J.A., Newell, D.R. (1997). Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *European Journal of Cancer*, **4**, 638-644.
- Cairney, C.J, Keith, W.N.(2008). Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*; **90**, 13-23.

- Chaweche, R., Jarraya, R., Girardi, C., Vansteelandt, M., Marti, G., Nasri, I., Racaud-Sultan, C., Fabre, N. (2015). Cucurbitacins from the leaves of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Molecules*, **20**, 18001-18015.
- Chen, C., Qiang, S., Lou, L., Zhao, W., (2009). Cucurbitane- Type Triterpenoids from the Stems of *Cucumis melo*, *J. Nat. Prod.*, **72**, 824-829.
- Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R.L., Cordell G. A., Qiu, S. X. (2005). Cucurbitacins And Cucurbitane Glycosides: Structures And Biological Activities. *Nat. Prod. Rep.*, **22**, 386 – 399.
- Chen, J.-C., Zhang, G.H., Zhang, Z.Q., Qui, M.H., Zheng, Y.T., Yang, L.M., Yu, K.B. (2008). Octanorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the tubers of *Hemsleya endecaphylla* with HIV-1 inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **71**, 153-155.
- Christine, A., Lacobuzio-D., Elizabeth, M. (2005). Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrointestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 367-394.
- Chu, K.H., Xing, H. (2008). *Method of inducing apoptosis cancer treatment by using cucurbitacins*, US 2008/0207578 A1, Aug. 28, 2008.
- Cong, Y.S., Wright, W.E., Shay, J.W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**, 407-425.
- Çitoğlu, G.S. and Acıkara, Ö. B. (2012). Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids (pp: 13-50). In: Dhanarasu, S. (Ed.), *Chromatography and Its Applications*, Intech.
- Dikmen, G., Doğan, P. (2003). Kanser ve telomeraz. *Türk Klin Tıp Bilim.* **23**.
- Dikmen, Z.G., Dikmen, E., Doğan, P. (2006). Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **37**, 49-55.
- Dinan, L., Harmatha, J., Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*. **935**, 105–123.
- Ding, N., Yamashita U. ve arkadaşları. (2011). Apoptosis Induction Through Proteasome Inhibitory Activity Cucurbitacin D in Human T-Cell Leukemia. *Cancer*, **117**, 2735-46.
- Doyle, A., Griffiths., J.B. (1998). *Cell and tissue culture laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Duangmano, S., Dakeng, S., Jiratchariyakul, W., Suksamrarn, A., Smith, D. R., Patmasiriwat, P. (2010). Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Down-Regulation of the c-Myc/HhTERT/Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle, *Int. J. Molecular Sciences*, **11(12)**, 5323 – 5338.

- Durhan, E. (2006). *Kolon kanser tanılı olgularda PCR RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar.
- Duursma, A.M., Agami, R. (2003). Ras interference as cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, **13**, 267-273.
- Durusoy, M. (2003). Telomeraz aktivitesini değerlendirmede kullanılan yöntemler ve dayandıkları esaslar. *Turk j Biochem*, **28(1)**, 25-29.
- Ekici, M., Satılmış, A., Ay, Y. D., Dülger, B., Yer, H.M. (1998). *Ecballium elaterium* L. Meyvelerinin Sinüzite Karşı Kullanımı. *Çev Kor*, **7(27)**, 24 - 25.
- El-Alfy, T.S., Ezzat, S.M., Hegazy, A.K., Amer, A.M., Kamel, G.M. (2011). Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. (family: Moringaceae) growing in Egypt. *Pharmacogn Mag*. **7(26)**, 109–115.
- El Sayed, Z. I., Badr, W. H. (2012). Cucurbitacin glucosides and biological activities of the ethyl acetate fraction from ethanolic extract of Egyptian *Ecballium elaterium*. *Journal of Applied Sciences Research*. **8** (2), 1252-1258.
- El-Hacı, I.A., Atık-Bekkara, F. (2011). Antioxidant activity of stems and leaves organic fractions of *Ecballium elaterium* L. *Annals of Biological Research*. **2** (3), 327-332.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., Moore, M.A.S. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, **3**, 1931-1941.
- Erdal, H. (2015). Makine öğrenmesi yöntemlerinin inşaat sektörüne katkısı: basınç dayanımı tahminlemesi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **21(3)**, 109-114.
- Erden, E. (1991). *Kolon kanserlerinde transizyonel mukoza değişikliklerinin morfolojisi ve müsin histokimyası üzerine araştırma*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemir, A., Pekel, T. (2007). *Denel Organik Kimya*, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Esposito, W. R. and Floudas, C.A. (2000). Global optimization for the parameter estimation of differential algebraic systems, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **39**, 1291–1310.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-1241.

- Feng, X.S., Wang, D.C., Cai, H., Deng, X.M., Liu, Y.R. (2007). Determination of the cucurbitacins from Cucubita pepo cv dayangua by HPLC. *Zhong Yao Cai*. **30** (4), 418-420.
- Frei, B., Orjala, J.E., Sticher, O., Heinrich, M., Herrmann, D., Schmitt, J. (1998). [Phytochemical and biological investigation of Begonia heracleifolia](#). *Planta Medica*, **64** (4), 385 - 386.
- Fuggetta, M.P., Lanzilli, G., Tricarico, M., Cottarelli, A., Falchetti, R., Ravagnan, G., Bonmassar, E. (2006). Effect of Resveratrol on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells *in vitro*. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **25** (2), 189-193.
- Fuller, R. W., Cardellina II, J. H., Cragg, G. M., Boyd, M. R. (1994). Cucurbitacins: Differential cytotoxicity, dereplication and first isolation from *Gonystylus keithii*. *Journal of Natural Products*. **57** (10), 1442-1445.
- Genç, N. (2009). *Taflan çekirdeğinde (Laurocerasus officinalis Roem.) fonksiyonel bileşik analizi ve antioksidan kapasitesinin araştırılması*. Yüksek Lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- Gerges, H. G., Khalil, R. A., Mansour, E. A., Magdalou, J., Chahine, R., Ouaini, N. (2007). Cucurbitacins from Ecballium elaterium juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions*, **169**, 53-62.
- Gitter, S., Gallily, R., Shohat B., Lavie, D. (1961). Studies on the Antitumor Effect of Cucurbitacins, *Canser Research*, **21**, 516-521.
- Gonzalez, B.R., Panizo, F.M. (1967). Compositon of *Ecballium elaterium* II. Seperation of free cucurbitacins. *An Real. Soc. Espan. Fis. Qu,m.*, **63**, 959-964.
- Greige-Gerges, H., Khalil, R.A., Chahine, R., Haddad, C., Harb, W., Quaini, N. (2007). Effect of cucurbitacins on bilirubin-albumin binding in human plasma, *Life Sciences*, **80**, 579-585.
- Grenle, R.T., Hill, Harmon,B., Murray,T., Thun, M. (2001). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, **51**, 15.
- Gry, J., Soberg I., Andersson, H.C. (2006). *Cucurbitacins in Plant Food*, Print: Ekspressen Tryk &Kopicenter, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, 556.
- Gullett, N.P., Ruhul Amin, A.R., Bayraktar, S., Pezzuto, J.M., Shin, D.M., Khuri, F.R., Aggarwal, B.B., Surh, Y.J., Kucuk, O. (2010). Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol*. **37**(3), 258–281.
- Güzelgül, F., Aksoy, K. (2010). Telomeraz enziminin tanı ve tedavide kullanım alanı. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **16**, 69-88.
- Hahn, W. C. (2005). Telomere and telomerase dynamics in human cells. *Curr. Mol. ed.*; **5**, 227-31.

- Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H., Meyerson, M., Weinberg, R.A. (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.*, **5**, 1164-1170.
- Halaweish, F.T., Tallamy, D.W. (1993a). Quantitative determination of cucurbitacins by high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography. *J Liq Chromatogr.* **16**, 497-511.
- Halaweish, F. T. ve Tallamy, D. W. (1993b) A New Cucurbitacin Profile for Cucurbita Andreana: A Candidate for Cucurbitacin Tissue Culture. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 1135 – 1141.
- Halaweish, F. T., Bartalis, J. (2007). *Cucurbitacin Compounds*, US Patent Appl. Pub. US 2007/0099852 A1, May 2007.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S. Longo, G. ve Rakesh, D.D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, ICS-UNIDO, Trieste, Italy.
- Helene, G.G., Khalil, R. A., Mansour, E. A., Magdalou, J., Chahine, R., Ouaini, N. (2007). Cucurbitacins from Ecballium elaterium juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chemico-Biological Interactions.* **169**, 53 – 62.
- Huang, P-R., Yeh, Y-M., Wang, T-C. V. (2005). Potent inhibition of human telomerase by helenalin. *Cancer Letters*, **227**, 169-174.
- Ishdorj, G, Johnston, JB, Gibson, SB. (2010). Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcurbitacin-I (JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, **9** (12).
- Ishdorj, G., Johnston, J.B., Gibson, S.B., (2011). Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B Leukemic Cells, *BMC Cancer*, **11**, 268.
- Ishii, T., Kira, N., Yoshida, T., Narahara, H. (2013). Cucurbitacin D growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Tumor Biol.*, **34**, 285-291.
- Ito, H., Kyo, S., Kanaya, T., Takakura, M., Koshida, K., Namiki, M., Inoue, M. (1998). Cancer Research Detection of Human Telomerase Reverse Transcriptase Messenger RNA in Voided Urine Samples as A Useful Diagnostic Tool for Bladder Cancer. *Clin Canc Resear.* **4(11)**, 2807-2810.
- Jacobs, H., Singh, T., Reynolds, W.F., McLean, S. (1990). Isolation and ¹³C-NMR assignments of cucurbitacins from *Cayaponia angustiloba*, *Cayaponia racemosa*, and *Gurania subumbellata*. *Journal of Natural Products.* **53** (6), 1600-1605.
- Jansohn, M., Rothheemel, S. (2012). *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 365.

- Jaradat, N., Jodeh, S., Rinno, T. Kharoof, M., Zaid, A.N., Hannon, M. (2012). Determination the presence of phytomelin in *Ecballium elaterium* to approve its folk uses. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4(2)**, 233-237.
- Jayaprakasam, B., SE.elateriumram, N.P., Nair, M. G. (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andrena*, *Cancer Letters*, **189**, 11 – 16.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y. (2008). Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* **58 (2)**, 71-96.
- Kaleağasıoğlu, F., Berger, M. (2014). Differential effects of erufosine on proliferation, wound healing and apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Oncology Reports*, **31(3)**, 1407-16.
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Yamasaki, K. (2002). Cucurbitane, hexanorcucurbitane and octanorcucurbitane glycosides from fruits of *Trichosanthes tricuspidata*. *Phytochemistry*. **59**, 215-228.
- Karikas, G.A. (2010). Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J Buon*. **15(4)**, 627–638.
- Kaya, G.I., Melzig, M.F. (2008). Quantitative determination of cucurbitacin E and cucurbitacin I in homoeopathic mother tincture of *Gratiola officinalis* L. by HPLC. *Pharmazie*. **63**, 851-853.
- Kim, H.J., Park, J.H.Y., Kim J. (2014). Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. *Chemico-Biological interactions*, **219**, 1-8.
- Kim, H. J., Kim J-K., (2015). Antiangiogenic effects of cucurbitacin-I, *Arch. Pharm. Res.*, **38**, 290-298.
- Kim, N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **23**: **266**, 2011-2015.
- Kim, S. R., Seo, H.S., Choi, H., Cho, S., Kim, Y.K., Hong, E.H., Shin, Y.C., Ko S. (2013). *Trichosanthes kirilowii* Ethanol Extract and Cucurbitacin D Inhibit Cell Growth and Induce Apoptosis through Inhibition of STAT3 Activity in Breast Cancer Cells. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume*, 2013.
- Kokkun, M. (2014). *Malatya il merkezinde bulunan aile sağlığı merkezlerinde çalışan sağlık personelinin ulusal kanser tarama programlarındaki taramalar konusunda bilgi tutum ve davranışlarının incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

- Kong, D., Jin Y., Yin, Y., Mi, H., Shen, H. (2007). Real-time of telomerase activity using specific molecular beacon probes. *Anal Bioanal Chem*, **388**, 699-709.
- Kozusko, F, Bourdeau, M. (2007). A unified model of sigmoid tumour growth based on cell proliferation and quiescence. *Cell Prolif.*, **40**, 824–834.
- Krepesky, P.B., Cervelin, M.O., Porath, D., Peters, R.R., Ribeiro-do-Valle, R., Farias, M.R. (2009). High performance liquid chromatography determination of cucurbitacins in the roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **19** (3), 715-719.
- Krstulovic, A.M., Brown, P.R. (1982). *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, USA.
- Kummalue, T., Jiratchariyakul, W., Srisapoomi, T., S., S., Hara, T., Tani, K. (2009). Antiproliferative effect of Cucurbitacin B extracted from *Trichosanthes cucumerina* L. on human cancer cell lines. *Siriraj Med. J.* **61** (2), 75-77.
- Lavie, D., Szinai, S. (1958). The constituents of *Ecballium elaterium* II. α -Elaterin, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 707-710.
- Lee, C.C., Houghton, P. (2005). Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacology*, **100**, 237-243.
- Lee, D. H., Iwanski, G. B., Thoennissen, N. H. (2010). Cucurbitacin: Ancient Compound Shedding New Light on Cancer Treatment. *The Scientific World JOURNAL*, **10**, 413 – 418.
- Lee, D. H., Thoennissen N. H., Thoninissen, N.H., Golf, C., Iwanski, G.B., Froscher, C., Doan, N.B., Said, J.W., Koeffler, H.P. (2011). Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma. *Cancer Letters*, **306**, 161–170.
- Lewis, C.D. (1982). *Industrial and Business Forecasting Methods*. Butterworths Publishing: London, s. 40.
- Liebman, M. C., Edgar, T. F. and Lasdon, L.S. (1992). Efficient data reconciliation and estimation for dynamic processes using nonlinear programming techniques, *Computers and Chemical Engineering*, **16**(10/11), 963–986.
- Liu, V.W.Y., Yau, D.M.S., Wong, E.Y.L., Ng, Y. Lau, P., Ho, Y., Chan, J.P.L., Hong, B., Ho, K., Cheung, C.S., Tsang, C., Tsao, S., Chan, A.T. (2009). Cucurbitacin I elicits anoikis-sensitization, inhibits cellular invasion and *in vivo* tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **30**(12), 2085-2094.
- Liu, K., Xing, H., Zhang, S., Liu, S. M., Fung, M.C. (2010). Cucurbitacin D induces fetal hemoglobin synthesis in K562 cells and human hepatopoietic progenitors through activation of p38 pathway and stabilization of the γ -globin mRNA. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, **45**, 269-275.

- Liu, T., Zhang, M., Zhang H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y., Ji, W. (2008a). Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *European Journal of Pharmacology*, **587**, 78 – 84.
- Liu, T., Zhang, M., Zhang H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y. (2008b). Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol*, **265(10)**, 1225-1232.
- Lyles, R.H., Poindexter, C., Evans, A., Brown, M., Cooper, C.R. (2008). Nonlinear model-based estimates of ic_{50} for studies involving continuous therapeutic dose-response data. *Contemp Clin Trials*. **29(6)**, 878-886.
- Manayi, A. (2015). Anticancer terpenoids (syf: 67-92). In: Saeidnia, S. (Ed.), *New Approaches to Natural Anticancer Drugs*. SpringerBriefs in Pharmaceutical Science & Drug Development, London.
- Marusic, M. (1996). Mathematical models of tumor growth. *Mathematical Colloquium in Osijek*. 175-192.
- Masutumi, K., Hahn, W.C. (2003). Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Letters*, **194**, 163-172.
- Memişoğlu, M. (2005). *Ecballium elaterium* bitkisinde hücre süspansiyon kültürü tekniği ile sekonder metabolit (Kukurbitasin B) üretimi. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Miro, M. (1995). Cucurbitacins and their pharmacological effects, *Phytother. Res.*, **9**, 159-168.
- Molavi, O., Shayeganpour A., Somayaji, V., Hamdy, S., Brocks, D.R., Lavasanifar, A., Kwon, G.S., Samuel, J. (2006). Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the quantification of cucurbitacin I (JSI-124) in rat plasma. *J Pharm Pharmaceut Sci*. **9**, 158-164.
- Musza, L. L., Speight, P., McElhiney, S., Barrow, C.J., Gillum, A.M., Cooper, R., Killar, L.M. (1994). Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 1498-1502.
- Norton, L. (1988). A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Research*, **48**, 7067-7071.
- Oleszek, W.A. (2002). Chromatographic determination of plant saponins. *J Chromatogr A*, **967**, 147-162.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Ogura, Y., Ishikawa, N., Nagai, E., Yamaguchi, K., Tanaka, M. (2005). Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in Pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, **11**, 2285-2292.

- Ouyang, D., Zhang, Y., Xu, L., Li, J., Zha Q, He X. (2011). Histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes B16F10 melanoma cells to cucurbitacin B treatment. *Acta BiochimBiophys Sin (Shanghai)*, **43(6)**, 487-95.
- Öztürk, S.S. (2006). *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies*. CRC press., Boca Raton.
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wu, J.C., Ho, C.T. (2011). Molecular mechanisms for chemoprevention of colorectal cancer by natural dietary compounds. *Mol Nutr Food Res*. **55(1)**, 32–45.
- Pascolo, E., Wenz, C., Lingner, J., Huel, N., Priepke, H., Kauffmann, I., Garin-Chesa, P., Rettig, W.J., Damm, K., Schnapp, A. (2002). Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *The Journal of Biological Chemistry*, **277 (18)**, 155566-15572.
- Parellada, J., Guinea, M. (1995). Flavonoid inhibitors of trypsin and leucine aminopeptidase: a proposed mathematical model for IC₅₀ estimation. *J. Nat. Prod.*, **58 (6)**, 823–829.
- Peters, R.R., Farias, M.R., Ribeiro-do-Valle, R.M. (1997). Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*, *Planta Med.*, **63**, 525-528.
- Rao, M.M., Meshulam, H.A., Lavie, D. (1974). Constituents of *Ecballium elaterium* L. XXIII. Cucurbitacins and Hexanocucurbitacins, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **22**, 2552-2556.
- Razavi, S. M., Ebrahimi, S. N. (2009). Phytochemical Analysis and Allelopathic Activity of Essential Oils of *Ecballium elaterium* A. Richard Growing in Iran. *Natural Product Research*, **1**, 1-6.
- Recio, M.C., Prieto, M., Bonucelli, M., Orsi, C., Máñez, S., Giner, R.M., Cerdá-Nicolás, M., Ríos, J.L. (2004). Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Med.* **70**, 414-420.
- Rios, J. L., Escandell, J.M., Recio, M.C. (2005). New Insights into the bioactivity of Cucurbitacins. *Studies in Natural Products Chemistry*. **32**, 429-469.
- Roig, A.I, Wright, W.E., Shay, J. W. (2009). Is telomerase a novel target for metastatic colon cancer ? *Current Colorectal Cancer Reports*, **5**, 203-208.
- Rugero, M.T., Mata, R., Bye, R., Linares, E., Delgado, G. (1987). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, II: Cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **50 (2)**, 315-316.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Russ, G.L. (2010). Phytochemicals in cancer prevention and therapy: truth or dare? *Toxins*, **2**, 517-551.

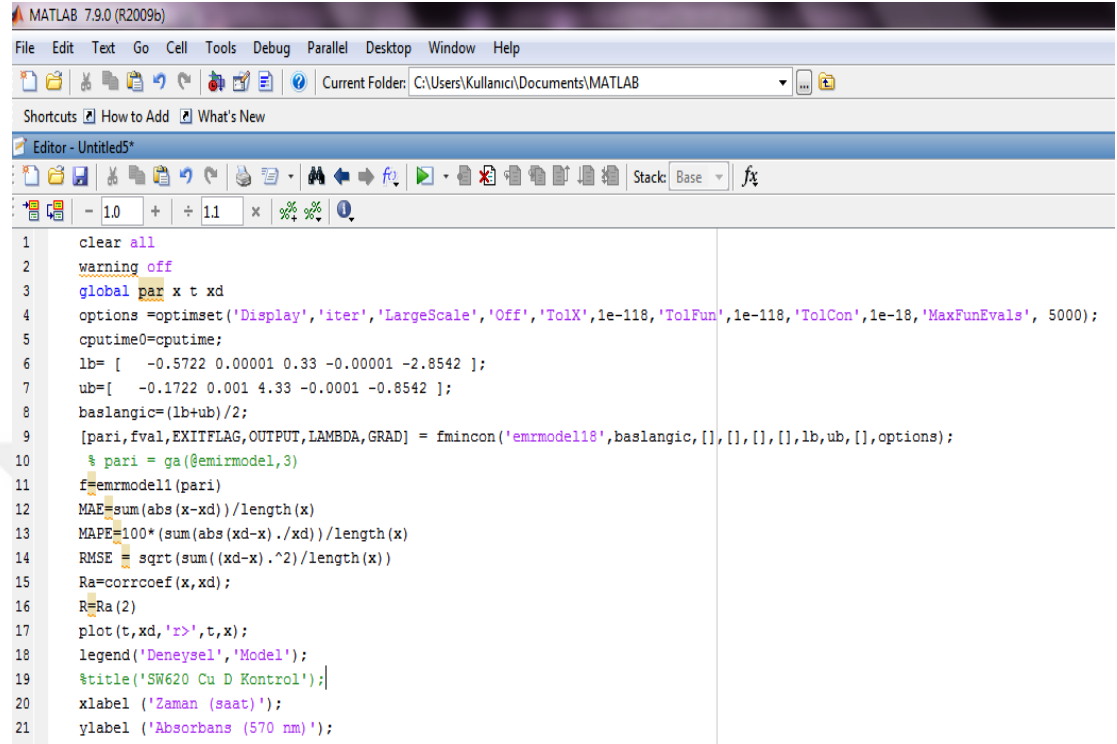
- Saker, M.M., Farid, M.M., Fahmi, A.A., El-Mekkawy, S.A., Taha, H.S., Amin, A.I. (2012). Large scale production of antitumor cucurbitacins from *Ecballium Elaterium* using bioreactor. *African Journal of Biotechnology*. **11** (66), 12974-12982.
- Saleh, S., Lam A.K., Ho, Y.H. (2008). Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer. *Pathology*, **40**, 25-30.
- Scholzova, E., Malik, R., Sevcik, J. and Kleibl, Z. (2007). RNA regulation and cancer development, *Cancer Letters*, **246**, 12-23.
- Seger, C., Sturm, S., Haslinger, E., Stuppner, H. (2004). A New Cucurbitacin D Related 16,23-Epoxy Derivative and Its Isomerization Products, *Organic Letters*, **6:4**, 633-636.
- Sezik, E., Yeşilada, E. (1995). Clinical effects of the fruit juice of *Ecballium elaterium* in the treatment of sinusitis. *Clinical Toxicology*, **33(4)**, 381-382.
- Sezik, E. (1997). Research on the Turkish Medicinal Plant. *Chemistry of Natural Compounds*. **33** (5), 541-542.
- Shabani, S., Mahjoubi, F., Mahjoubi, B., Mirzaee, R. (2014). Investigation of HTERT expression level and its relation with clinicopathological and resistance to chemotherapy in colorectal cancer patients. *J Mol Biomark Diagn*, **5:176**.
- Shaw, I. (2005). *Is it Safe to Eat ? Enjoy Eating and Minimize Food Risks*, Springer, New Zealand, 126.
- Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., Wright, W. E. (2001). Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet*, **10**, 677-685.
- Shi, X., Franko, B., Frantz, C., Amin, H.M., Lai, R. (2006). JSI-124 (Cucurbitacin I) inhibits Januskinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. *Br. J. Haematol.*, **135**, 26-32.
- Shu, L., Cheung, K.L., Khor, T.O., Chen, C., Kong, A.N. (2010). Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **29(3)**, 483–502.
- Shuler, M.L., Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, 155-216.
- Sırma, E. (2013). *Bitkisel Flavonoid Silimarin Ve Fenolik Asit Stilbenoid Resveratrolün Karaciğer Kanseri Hücrelerindeki Antikanser Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri teknoloji Enstitüsü, Kocaeli.
- Sidorov, I.A., Hirsch, K.S., Harley, C.B., Dimitrov, D.S. (2003). Cancer treatment by telomerase inhibitors: predictions by a kinetic model. *Mathematical Biosciences*, **181**, 209-221.

- Sindhu, N., Partima, T., Ashwini, W. (2011). Isolation of a cucurbitacin from *Picrorhiza Kurroa* by column chromatography and its characterization. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. **2** (3), 149-156.
- Stock, R.P., Bialy, H. (2003). The sigmoidal curve of cancer. *Nature Biotechnology*. **21**, 13-14.
- Sturm, S., Stuppner, H. (2000). Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*. **11**, 121-127.
- Su, Y., Li, G., Zhang, X., Gu, J., Zhang, C., Tian, Z., Zhang, J. (2008). JSI-124 inhibits glioblastomamultiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1243-1249.
- Subbiah, V., (1999). *Method of Isolating Cucurbitacin*, US005925356A.
- Şen, O. (2008). *Kolorektal Kanserlerde Tarama (Pilot Çalışma)*. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Takahashi, N., Yoshida, Y., Sugiura, T., Matsuno, K., Fujino, A., Yamashita, U. (2009). Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *International Immunopharmacology*. **9**, 508-513.
- The Mathworks, Inc. 2009. www.mathworks.com
- Tjoa, T. B. and Biegler, L. T. (1991). Simultaneous solution an optimization strategies for parameter estimation of differential–algebraic equation systems, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 376–385.
- Topal, Sarıkaya, A. (2014). Kanser Genetiği. 4. *Bilim Günleri*, YeniYüzyıl Üniversitesi, 8-9 Mayıs 2014, İstanbul.
- Topal, Ş.R. (2004). *Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar*. Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul.
- Topal, H. (2014). *Kolorektal Kanserli Hastalarda pre-miR-423 ve pre-miR-608 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Toprak, S. (2011). *Çok değişkenli uyarlamalı regresyon eğrileri ve konik programlama ile zaman serilerinin modellenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Türker, M. (2005). *Biyoreaksiyon Mühendisliği: Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellenmesi*. Su Vakfı Yayınları, Kocaeli, 65-81.

- van Kester, M.S., Out-Luiting, J.J., von dem Borne, P.A., Willemze, R., Tensen, C.P. and VermE.elateriumr, M.H. (2008). Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sezary cells. *J Invest Dermatol*, **128**, 1691-5.
- Vuorelaa, P., Leinonenb, M., Saikkuc, P., Tammela, P., Rauhad, J.P., Wennberge, T., Vuorela, H. (2004). New products in the process of finding new drug candidates. *Curr. Med. Chem.* **11(11)**, 1375-1389.
- Wakimoto, N., Yin, D., O'Kelly, J., Haritunians, T., Karlan, B., Said, J., Xing, H., Koeffler, H.P. (2008). Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effects on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* **99(9)**, 1793-1997.
- Wang, C-C., Chen, L-G., Chang, T-L., Hsieh, C-T. (2011). Extracts of aquilaria hulls and use thereof in the treatment of cancer. US20110160152 A1.
- Wang, H., Khor, T.O, Shu, L., Su, Z., Fuentes, F., Lee, J., Kong, A.T. (2012). Plants against cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anticancer Agents Med Chem.* **12(10)**, 1281-1305.
- Yeşilada, E., Tanaka, S., Sezik, E., Tabata, M. (1989). Isolation of an anti-inflammatory principle from the fruit juice of *Ecballium elaterium*. *J. Nat. Prod.*, **51(3)**, 504-508.
- Yeşilada, E., Tanaka, S., Tabata, M., Sezik, E. (1989). Anti inflammatory Effects of the Fruit Juice of *Ecballium elaterium* on Edemas in Mice. *Phytotherapy Research*, **3(2)** 75-76.
- Yıldız, M.G., Aras, S., Duman, D.C. (2009). Telomerlerin yaşlanma ve kanser ilişkisindeki rolü. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, **66 (4)**, 187-195.
- Yılmazlar, T., Öztürk, E. (2004). *Kolon ve Rektal Cerrahinin El Kitabı*. Nobel Tıp Kitabevleri, Adana, 423-474.
- Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu D, Huynh T, W ang X, Black KL, Koeffler HP. (2008).Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma a multiforme. *Int J Cacer*, **123**, 1364-75.
- Yüceer, M. (2005). *Akarsularda su kalitesinin belirlenmesine yönelik yeni bir dinamik benzetim yazılımı*. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, **56 (6)**, 1875-1881.

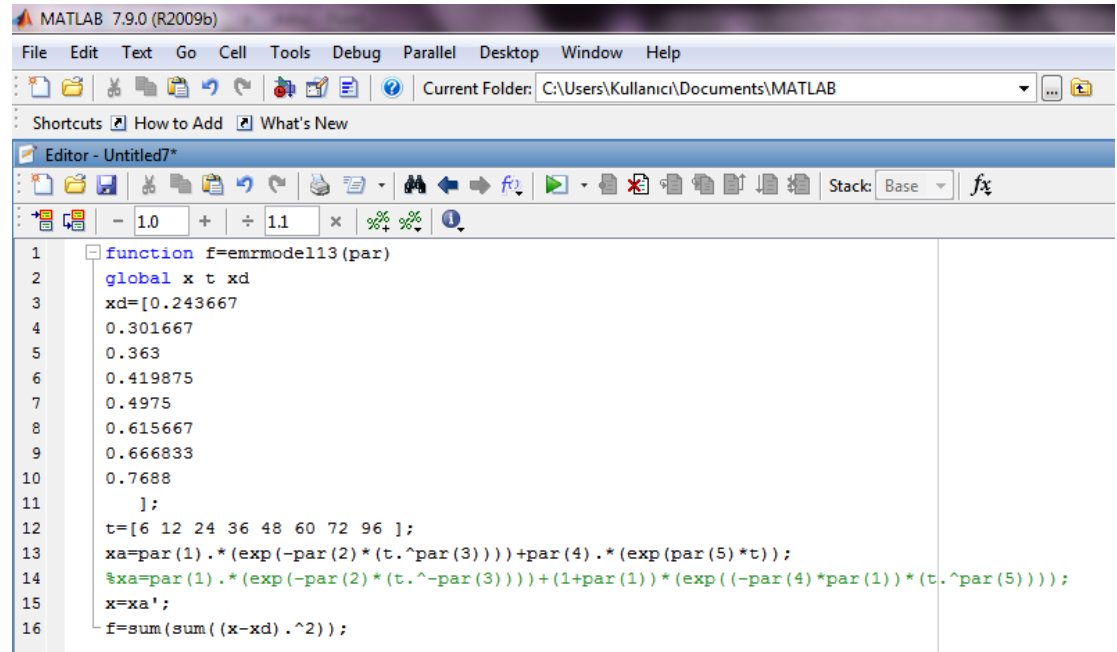
EKLER

Ek. 1. *fmincon* ileçözüm için MATLAB kodlaması



```
1 clear all
2 warning off
3 global par x t xd
4 options = optimset('Display','iter','LargeScale','Off','TolX',1e-118,'TolFun',1e-118,'TolCon',1e-18,'MaxFunEvals', 5000);
5 cputime0=cputime;
6 lb= [ -0.5722 0.00001 0.33 -0.00001 -2.8542 ];
7 ub=[ -0.1722 0.001 4.33 -0.0001 -0.8542 ];
8 baslangic=(lb+ub)/2;
9 [pari,fval,EXITFLAG,OUTPUT,LAMBDA,GRAD] = fmincon('emrmodel18',baslangic,[],[],[],[],lb,ub,[],options);
10 % pari = ga(@emrmodel1,3)
11 f=emrmodel1(pari)
12 MAE=sum(abs(x-xd))/length(x)
13 MAPE=100*(sum(abs(xd-x)./xd))/length(x)
14 RMSE = sqrt(sum((xd-x).^2)/length(x))
15 Ra=corrcoef(x,xd);
16 R=Ra(2)
17 plot(t,xd,'r>',t,x);
18 legend('Deneysel','Model');
19 %title('SW620 Cu D Kontrol');
20 xlabel ('Zaman (saat)');
21 ylabel ('Absorbans (570 nm)');
```

Ek. 2. *fmincon* ileçözüm için MATLAB kodlamasındaki fonksiyon kodlaması



```
1 function f=emrmodel13(par)
2 global x t xd
3 xd=[0.243667
4 0.301667
5 0.363
6 0.419875
7 0.4975
8 0.615667
9 0.666833
10 0.7688
11 ];
12 t=[6 12 24 36 48 60 72 96 ];
13 xa=par(1).*(exp(-par(2)*(t.^par(3))))+par(4).*(exp(par(5)*t));
14 %xa=par(1).*(exp(-par(2)*(t.^par(3))))+(1+par(1)).*(exp((-par(4)*par(1))*(t.^par(5))));
15 x=xa';
16 f=sum(sum((x-xd).^2));
```

Ek 3:β-aktinGen Dizilimi

İnsan β -aktingenin 1852 baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_001101.3

[illegible]

1021 atgcagaaggagatcactgccctggcaccagcacaatgaagatcaagatcattgctcct
1081 cctgagcgcaagtactccgtgtggatcggcggctccatcctggcctcgctgccaccttc
1141 cagcagatgtggatcagcaagcaggagatgacgagtcggccctccatcgccaccgc
1201 aaatgctttaggcggactatgacttagttgcgttacacccttcttgacaaacctaac
1261 ttgcgcagaaaacaagatgagattggcatggctttattgtttttgtttgttttgg
1321 ttttttttttttggcttgactcaggatttaaaaactggaacgggtgaagggtgacagc
1381 agtcgggtggagcgagcatcccccagttcacaatgtggccgaggactttgattgcaca
1441 ttgtgttttttaatagtcattccaaatatgagatgcgttggttacaggaagtccttgc
1501 catcctaaaagccacccttctcttaaggagaatggccagtcctctccaagtcca
1561 cacaggggaggtgatagcattgcttcgtgtaattatgtaatgcaaaatttttaac
1621 ttcgccttaactttttttttttttttttgaatgatgagccttcgtgccccccct
1681 tccccctttttgtccccaacttgagatgtatgaaggcttttggtctccctgggagtg
1741 gtggaggcagccagggttacctgtacactgacttgagaccagttgaataaaagtgcaca
1801 ccttaaaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

>>>>> İleri primer
<<<<<Geri primer

Ek 4: hTERTGen Dizilimi

İnsan hTERTGeninin 4018baz çiftinden oluşan mRNA dizilimi ve primerlerin dizilimdeki yerleri gösterilmiştir. Gen Bankası Kayıt No: NM_198253.2

1 caggcagcgtcgtcctgctgcgcacgtgggaagccctggccccggcaccgccgcat
61 gccgcgcgtccccgctgccgagccgtgcgctccctgctgcgcagccactaccgcgaggt
121 gctgccgctggccacgttcgtgcggcgctggggccccagggtggcggtggtgcagcg
181 cggggacccggcggctttccgcgcgtggggccagtgccctggtgcgtgccctggga
241 cgcacggccgcccccccgccccctcttcgccaggtgtcctgcctgaaggagctggt
301 ggcccagtgctgcagaggctgtgcgagcgcggcgcaagaacgtgctggccttcggctt
361 cgcgctgctggacggggcccgggggccccccgaggccttcaccaccagcgtgcgcag
421 ctacctgccaacacggtgaccgacgcactcgggggagcggggcgctgggggctgctgct
481 gcgccgcgtgggcgacgacgtgtggtcacctgctggcacgctgcgcgcttttgct
541 ggtggctccagctgcgcctaccaggtgtgcgggcccgcgctgtaccagctcggcgctgc
601 cactcaggccccggccccgccacacgctagtggaccccgaaggcgtctgggatgcgaacg
661 ggcctggaaccatagcgtcagggaggccgggggtccccctgggcctgccagccccgggtgc
721 gaggagcgcgggggcagtgccagccgaagtctgccgttgccaagaggcccaggcgtgg
781 cgctccccctgagccggagcggacgcccgttgggcaggggctcctgggcccaccgggcag
841 gacgcgtggaccgagtgaccgtggtttctgtgtggtgtcacctgccagaccgcggaaga
901 agccacctctttgagggtgcgctctctggcacgcgccactcccacccatccgtgggccg
961 ccagcaccacgcgggccccccatccacatcgcgccaccacgtccctgggacacgccttg

1021 tccccgggtgtacgccgagaccaagcacttctctactctcagggcacaaggagcagct
1081 gcggccctcttctactcagctctctgaggccagcctgactggcgctcggaggctcgt
1141 ggagaccatctttctgggttcaggccctggatgccagggactccccgcaggtgccccg
1201 cctgccccagcgctactggcaaatgcggcccctgtttctggagctgcttgggaaccacgc
1261 gcagtgtcccctacgggggtgctcctcaagacgcactgcccgtgcgagctgcggtcacccc
1321 agcagccgggtgtctgtgtcccgaggagaagccccagggtctgtggcggccccgaggagga
1381 ggacacagacccccgtcgcctgggtgcagctgctccgccagcacagcagcccctggcaggt
1441 gtacggcttcgtgcgggcctgcctgcgccggctgggtgccccaggcctctggggctccag
1501 gcacaacgaaccccgttctcaggaacaccaagaagtcatctccctggggaagcatgc
1561 caagctctcgctgcaggagctgacgtggaagatgagcgtgcgggactgcgcttggctgcg
1621 caggagcccaggggttgctgtgtccggccgcagagcaccgtctgcgtgaggagatcct
1681 ggccaagttctctgactggctgatgagtgtgtacgtcgtcagctgctcaggtctttctt
1741 ttatgtcacggagaccacgtttcaaaagaacaggctcttttctaccggaagagtgtctg
1801 gagcaagttgcaaagcattggaatcagacagcacttgaagagggtgcagctgcgggagct
1861 gtcggaagcagaggtcaggcagcatcggaagccaggccccccctgctgacgtccagact
1921 ccgttcatccccaagcctgacgggctgcggccgattgtgaacatggactacgtcgtggg
1981 agccagaacgttccgcagagaaaagaggccgagcgtctcacctcgagggtgaaggcact
2041 gttcagctgtctcaactacgagcgggcgcggcgccccggcctctgggcgcctctgtgct
2101 gggcctggacgatatccacagggcctggcgcaccttcgtgctgcgtgtgcgggcccagga

2581 ctgcagcctgtgctacggcgacatggagaacaagctgtttgcggggattcggcgggacgg
2641 gctgctcctgcgtttggatgatttctgttggtgacacctcacctcaccacgcgaa
2701 aaccttctcaggacctggtccgaggtgtccctgagtatggctgcgtggtgaactcgcg
2761 gaagacagtggatgaacttcctgtagaagacgaggccctgggtggcacggctttgttca

3361 gcagctgagtcggaagctccccggggacgacgctgactgccctggaggccgcagccaaccc

3421 ggcaactgccctcagacttcaagaccatcctggactgatggccacccgccacagccaggc

3481 cgagagcagacaccagcagccctgtcacgccgggctctacgtcccaggaggaggaggcg

3541 gccacacccaggcccgaccgctgggagtctgaggcctgagtgagtgtttggccgaggc

3601 ctgcatgtccggctgaaggctgagtgtccggctgaggcctgagcgagtgtccagccaagg

3661 gctgagtgtccagcacacctgccgtcttcacttccccacaggctggcgctcggctccacc

3721 ccagggccagcttttctcaccaggagcccggttccactccccacataggaatagtcca

3781 tccccagattgccattgttaccacctgcacctgccctctttgccttccacccccacca

3841 tccaggtggagaccctgagaaggaccctgggagctctgggaatttgagtgaccaaaggt

3901 gtgccctgtacacaggcgaggaccctgcacctggatgggggtccctgtgggtcaaattgg

3961 ggggagggtgctgtgggagtaaaatactgaatatatgagttttcagttttgaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Emir TOSUN
2. **Doğum Tarihi:** 25/07/1981
3. **Doğum Yeri:** Malatya
4. **Öğrenim Durumu:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Mühendisliği	İnönü Üniversitesi	2000-2004
Y. Lisans	Analitik Kimya (Eczacılık Fakültesi)	İnönü Üniversitesi	2006-2009
Doktora	Kimya Mühendisliği	İnönü Üniversitesi	2009-

5. **Akademik Unvanlar:**

Araştırma Görevlisi : 2007-

6. **Yüksek Lisans Tezi**

Hastalık Tedavisinde Kullanılan Bazı Meyve ve Sebzelerin Dokularında Eser Element ve Mineral Tayini