

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KANNABİDİOLÜN (CBD) CACO-2 HÜCRE HATTINA ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ALİ FATİH YILTIRAK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI  
2023**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ali Fatih YILTIRAK tarafından hazırlanan **Kannabidiolün (Cbd) Caco-2 Hücre Hattına Etkilerinin Araştırılması** adlı tez çalışması 14/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Pınar ARSLAN

**Jüri Üyeleri** :

**Başkan** : Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL  
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı  
Gazi Üniversitesi

**Üye** : Doç. Dr. Pınar ARSLAN  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Çankırı Karatekin Üniversitesi

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çevre Sağlığı Anabilim Dalı  
Çankırı Karatekin Üniversitesi

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Hamit ALYAR**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **Kannabidiolün (Cbd) Caco-2 Hücre Hattına Etkilerinin Araştırılması** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu, çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallarına uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne uygun göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan Bilimsel İntihal Tespit Programı ile tarandığını, intihal içermediğini beyan ederim. Çalışmam ile ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (14/06/2023).

**Ali Fatih YILTIRAK**



*Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FF100522L08 numaralı proje ile desteklenmiştir*

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KANNABİDİOLÜN (CBD) CACO-2 HÜCRE HATTINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ali Fatih YILTIRAK

Çankırı Karatekin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Üyesi Pınar ARSLAN

Geçmişten günümüze kadar bitkiler tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır. İçeriğinde bulunan sekonder metabolitler bitkinin yaşamını doğrudan etkilemez fakat çevre koşullarına dayanıklılık sağlar ve savunma mekanizmalarında görev yapmaktadır. Bu metabolitler tedavi edici de özellik taşımaktadır. Sekonder metabolitlerden olan kannabidiolün (CBD) endokannaboid sistemi (EKS) doğrudan ya da dolaylı yollarla etkileyebilmektedir. EKS, CB-1 ve CB-2 reseptörlerini barındıran bir sistemdir. Bu reseptörler kanserli hücrelerde bulunmasıyla birlikte birçok araştırmanın konusu olmuştur. Bu tez çalışmasının amacı kolon kanseri CaCo-2 hücre hatlarında CBD etkisinin hücre canlılığı ve hücre apoptoz yollarında bulunan kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesinin incelenmesidir. Hücre canlılık yöntemlerinden biri olan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol 2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) testi ile inhibisyon konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) değeri 115,271 µM olarak tespit edilmiştir. Bu değer <sup>1</sup>/<sub>10</sub> ve <sup>1</sup>/<sub>100</sub> oranındaki konsantrasyonlarda CBD'ye 24 ve 48 saat süreyle maruz kalan hücrelerde kaspaz aktiviteleri için ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) testi uygulanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda kaspaz-3 ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Kaspaz-8 ve kaspaz-9'da kontrol grubuna göre bir değişim gözlenmemiştir. Bu tez çalışmasının sonucunda, yapılan literatür çalışmaları ve kaspaz-3'ün CaCo-2 hücre hatlarında ifadesinin artması CBD'nin potansiyel bir antikansorejen olabileceği hakkındaki görüşleri doğrular niteliktedir.

**2023, 57 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELER:** CBD, Kannabinoid, CaCo-2, Kanser, Kolon kanseri

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CANNABIDIOL (CBD) ON CACO-2 CELL LINE

Ali Fatih YILTIRAK

Çankırı Karatekin University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Pınar ARSLAN

From past to present, plants have been used for medicinal purposes. The secondary metabolites in its content do not directly affect the life of the plant, but serve in the defense mechanisms and provide resistance to environmental conditions. These metabolites also have therapeutic properties. Cannabidiol (CBD), one of the secondary metabolites, can affect the endocannabinoid system (ECS) directly or indirectly. ECS is a system that contains CB-1 and CB-2 receptors. These receptors have been the subject of many studies with their presence in cancerous cells. The aim of this thesis study is to investigate the effect of CBD on cell viability and caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity in cell apoptosis pathways in colon cancer CaCo-2 cell lines. Inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) value was determined as 115.271  $\mu$ M by MTT (3-(4,5-dimethylthiazole 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide) test, which is one of the cell viability methods. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test was applied for caspase activities in cells exposed to CBD at concentrations of  $1/10$  and  $1/100$  of this value for 24 and 48 hours. In line with these results, it was observed that caspase-3 expression increased significantly compared to the control group ( $P < 0.05$ ). No change was observed in caspase-8 and caspase-9 compared to the control group. As a result of this thesis, the literature studies and the increase in the expression of caspase-3 in CaCo-2 cell lines confirm the views that CBD can be a potential anticarcinogen.

**2023, 57 pages**

**Keywords:** CBD, Cannabinoid, CaCo-2, Cancer, Colon cancer

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süreci boyunca yanımdan bilgi ve tecrübesini eksik etmeyen, zor zamanlarda umutlandıran, hayatta farklı kapılarında olabileceğine işaret eden ve bana tekrar mücadele etmeyi hatırlatan saygı değer tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN'a teşekkür ederim.

Bana tecrübesi, birikimi, enerjisiyle ilham olan ve laboratuvarında çalışma imkânı veren saygı değer Prof. Dr. Aysel Çağlan GÜNAL'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Hücre kültürü deneyleri için bana kapılarını açan ve tecrübesiyle yol gösteren saygı değer hocam Prof. Dr. Gülçin AKÇA'ya saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Tez deneylerimde kullanmam için CaCo-2 hücre hattını bana veren değerli hocam Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu zamana kadar yaptığım çoğu çalışma ve organizasyonda beni yalnız bırakmayan değerli 'ekürim' Eda AKDAĞ'a ve her koşulda güler yüzü ve tecrübesiyle beni yönlendiren Gülsüm BATMAZ'a teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Her zaman yanımda olan ve maddi manevi bana güç veren senelerin emekçileri canım aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunuyorum.

Yüksek Lisans tez çalışmamı FF100522L08 numaralı proje ile destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teşekkürlerimi sunarım.

**Ali Fatih YILTIRAK**

**Çankırı, Haziran 2023**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	v
KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
3. MATERYAL VE METOT .....	10
3.1 Materyal .....	10
3.2 Metot.....	11
3.2.1 Hücre kültürlerinin çözdürülmesi ve çoğaltılması.....	11
3.2.2 Hücrelerin MTT testine hazırlanması.....	12
3.2.3 Hücrelerin 96 kuyucuklu mikropalakalara ekimi .....	14
3.2.4 CBD dozlarının hazırlanması ve uygulanması.....	14
3.2.5 MTT analizi .....	15
3.2.6 ELISA testi.....	17
3.2.7. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	28
4.1 CBD'nin CaCo-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkileri.....	28
4.2 CBD'nin CaCo-2 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR .....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	53

## SİMGELER DİZİNİ

>	Büyüktür
g	Gram
kg	Kilogram
<	Küçüktür
lt/L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
ppm	Toplam madde miktarının milyonda birlik kısmı
vb.	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri
<i>et. al</i>	Ve diğerleri
%	Yüzde ifadesi

## KISALTMALAR DİZİNİ

CBD	Kannabidiol
CaCo-2	İnsan Kolon Epidermal Adenokarsinom Hücre Hattı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EBV	<i>Epstein-Barr</i> Virus
EKS	Endokannabinoid Sistem
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HUVEC	İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri
IC <sub>50</sub>	%50 canlılık gösteren inhibisyon konsantrasyon
M.Ö	Milattan Önce
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
THC	$\Delta$ 9-Tetrahidrokannabinol
UV	Ultraviyole

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 (A) Kannabidiol (CBD) ve (B) $\Delta^9$ -Tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC/THC)kimyasal yapıları. National Center for Biotechnology Information (2023) uyarlanarak kullanılmıştır. ....	5
Şekil 2.2 Grandüler epitel hücreleri (Rehfeld et al. 2017). ....	7
Şekil 3.1 CaCo-2 hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü. ....	12
Şekil 3.2 Thoma lamında hücre sayımı. ....	13
Şekil 3.3 Etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakılan hücreler. ....	14
Şekil 3.4 Mikroplakalara ekilen CaCo-2 hücrelerinin inkübasyonu sonrasında CBD metabolitinin uygulanması. ....	15
Şekil 3.5 MTT testi sonucu 96'lık mikroplakada formazan tuzunun renk değişimi. ....	16
Şekil 3.6 MTT testi: Biotek marka mikroplaka okuyucuda örneklerin okunması. ....	17
Şekil 3.7 Kaspaz-3 kiti için dilüe yöntemi. ....	18
Şekil 3.8 Human CASP-3 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0017) ELISA kiti. ....	19
Şekil 3.9 Kaspaz-8 kiti için dilüe yöntemi. ....	21
Şekil 3.10 Human CASP-8 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0659) ELISA kiti. ....	21
Şekil 3.11 Kaspaz-9 kiti için dilüe yöntemi. ....	23
Şekil 3.12 Human CASP-9 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0663) ELISA kiti. ....	24
Şekil 3.13 Renk değişimi gözlenen Human Casp-3, Human Casp-8, ve Human Casp-9 ELISA mikroplakaları. ....	26
Şekil 4.1 Konsantrasyona bağlı hücre canlılık grafiği. ....	29
Şekil 4.2 Kontrol grubu 24 saatlik Caco-2 hücreleri. ....	31
Şekil 4.3 Kontrol grubu 48 saatlik Caco-2 hücreleri. ....	32
Şekil 4.4 1/10'luk CBD dozlanması 24 saat Caco-2 hücreleri. ....	33
Şekil 4.5 1/10'luk CBD dozlanması 48 saat Caco-2 hücreleri. ....	34
Şekil 4.6 1/100'luk CBD dozlanması 24 saat Caco-2 hücreleri. ....	35
Şekil 4.7 1/100'luk CBD dozlanması 48 saat Caco-2 hücreleri. ....	36
Şekil 4.8 Kaspaz-3 enzimin absorbands grafiği. ....	37
Şekil 4.9 Kaspas -3'ün CBD varlığında aktivitesi. ....	37
Şekil 4.10 Kaspaz-8 enzimin absorbands grafiği. ....	38
Şekil 4.11 Kaspas -8'in CBD varlığında aktivitesi. ....	38
Şekil 4.12 Kaspaz-9 enzimin absorbands grafiği. ....	39
Şekil 4.13 Kaspaz -9'un CBD varlığında aktivitesi. ....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan Malzeme Listesi.....	10
---	----



## 1. GİRİŞ

Dünyada yüksek ölüm oranlarına sahip olan kanser, Latince *cancer* kelimesinden türemiştir. Yapılan araştırmalarda M.Ö 3000 yılına kadar tarihlenebilen eski kayıtlarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Kanser terimi Antik Yunanistan'da *carcinus* şeklinde Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Yengeç anlamına gelen terim tümörlü dokuların yengeç benzeri yapılar meydana getirmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Kontrolsüz ve anormal bir büyümeye sahip olan hücrelerin vücuda yayılması şeklinde tanımlanabilecek olan kanser, kişi üzerinde sadece fiziksel değil aynı zamanda psikolojik bir etki yaratmaktadır (Baykara 2016, Ekinci 2016).

Kanser etiyojisi birçok faktörü içinde bulundurmakta olup sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda kanserin ana nedenleri arasında kimyasal, fiziksel ve biyolojik olmak üzere üç tip karsinogenezis olacağı düşünülmektedir. Bahsedilen kanser oluşum mekanizmalarından kimyasal karsinogenezler için, formaldehit, asbest ve arsenik; fiziksel karsinogenezler için Ultraviyole (UV) Işınları, Radyoaktif Radon Gazı ve İyonlaştırıcı Radyasyon; biyolojik karsinogenezler için *Epstein-Barr* Virus (EBV), *Schistosoma haematobium* ve Hepatit B ve C virüsü örnek olarak gösterilebilmektedir. Kanserli hücrelerin deoksiribonükleik asit (DNA) dizilerinde oluşan birtakım mutasyonlar hücrenin doğal döngüsünün bozulmasına neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamir genleri kanser oluşumunda önemlidir. Tümör baskılayıcı genler hücrelerin büyüme ve bölünme süreçlerini kontrol etmektedir. Kanser gelişimini önlemek ve hücrelerin normal döngüsünde düzenli olarak çalışmasını sağlamaktadır. Bu genlerden önemli olan *p53* geni DNA hasarı tespitinde hücrenin bölünme döngüsünü durdurarak DNA tamirini gerçekleştirir ya da hücreyi apoptoz durumuna sokar. Onkogenler tıpkı tümör baskılayıcı genler gibi hücre bölünmesini ve büyümesini kontrol ederler. Bu genlerde oluşabilecek mutasyon kanser gelişimini tetikler. DNA tamir genleri ise DNA'da oluşan hasarı onarır ve hücrenin genom bütünlüğünü sağlar. Programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz sürecinde büyük rol oynayan kaspaz-3 hücre döngüsünü düzenler anomali görülen hücrelerin kontrollü ölümünü sağlamaktadır. Kaspaz-8 ise apoptoz mekanizmasının başlangıcında tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) proteinin aktivasyonunu sağlamaktadır.

Kaspaz-9 ise mitokondride bulunmaktadır apoptoz mekanizmasının başlatıcılarından (Gülfidan ve Özgür 2011, Koçak 2011, Yokus ve Çakır 2012).

Kolon kanseri, kalın bağırsağın ya da rektumun epitel hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda moleküler ve genetik olarak hasarlı hücrelerin kötü huylu tümörler oluşturmasıdır. APC geninde görülen mutasyonlar ve onkogenlerin aktivite yoğunluğu kanser başlangıcında önemli rol oynamaktadır (Çefle 2003, Şık 2014).

Kanser için günümüzde yoğun olarak cerrahi eksizyon, kemoterapi, radyasyon ve bağışıklık tedavisi kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri sırasında hastalar kardiyovasküler toksisiteler, hematopoietik toksisiteler, pulmoner toksisiteler, gastrointestinal toksisiteler, muskuloskeletal toksisiteler, hepatik toksisitelere maruz kalmaktadır. Bu durum yapılan tedavilerin başarıya ulaşmasında bir direnç oluşturmaktadır (Ekinci 2016, Hodgkinson *et al.* 2017).

Bir biyolojik sistem olan endokannabinoid sistem (EKS) içinde endokannabinoid adı verilen lipid bileşiklerinin ve reseptörlerin bulunduğu bir sistemdir. Bu sistemin iki ana bileşiği anandamid (N-arachidonoyl ethanolamine) ve 2-arachidonoylglycerol (2-AG) bulunur. Hücre içi belli uyarıcıların yanıtları sonrasında sentezlenirler. Sinir iletişimi, hücre sinyalizasyonu, inflamasyon gibi fizyolojik süreçlerde rol almaktadır. EKS sistem reseptörleri CB-1 ve CB-2 olarak adlandırılır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda bu reseptörlerin kanser hücrelerinde bulunması kanser tedavisinde önemli bir potansiyelinin olduğunun düşünülmesine sebep olmuştur. Çeşitli çalışmalarda ortaya konan sonuçlar doğrultusunda CB-1 ve CB-2 reseptör agonistlerinin kanser hücrelerinde apoptoza yol açıp metastazı indükleyebileceğini göstermiştir (Dasram *et al.* 2022, Ye *et al.* 2019).

*Cannabis sativa* L bitkisinin iki ana molekülü olan,  $\Delta^9$ -Tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC/THC) ve kannabidiol (CBD) fitokannabinoidleri EKS'de bulunan CB-1 ve CB-2 reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Yapılan çalışmalarda endokannabinoidlerin parçalanmasını inhibe ederek ortamda bulunan endokannabinoidlerin seviyelerinde artışa neden olabileceğini göstermiştir (Guzmán *et al.* 2006, Jiang *et al.* 2013, Ligresti *et al.* 2006, McAllister *et al.* 2007, Taylor *et al.* 2021, Velasco *et al.* 2012). Yapılan literatür

alışmalarında sekonder metabolitlerden biri olan CBD'nin kolektrel kanser hücre hattı CaCo-2 hücre hattının apoptoz durumunu kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 üzerinden araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında insan kolon epidermal adenokarsinom hücresi olan CaCo-2 hücre hatlarında CBD'nin hücre canlılığı etkisi ile CBD muamelesinden sonra, hücrenin kendini yok etmek için fizyolojik, metabolik bir yola girdiği apoptoz durumunu, başlatıcı kaspaz olarak bilinen kaspaz -8, -9 ve efektör kaspaz olarak bilinen kaspaz -3 aktivitesi üzerinde bir etki yaratıp yaratmayacağı araştırmak amaçlanmaktadır.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

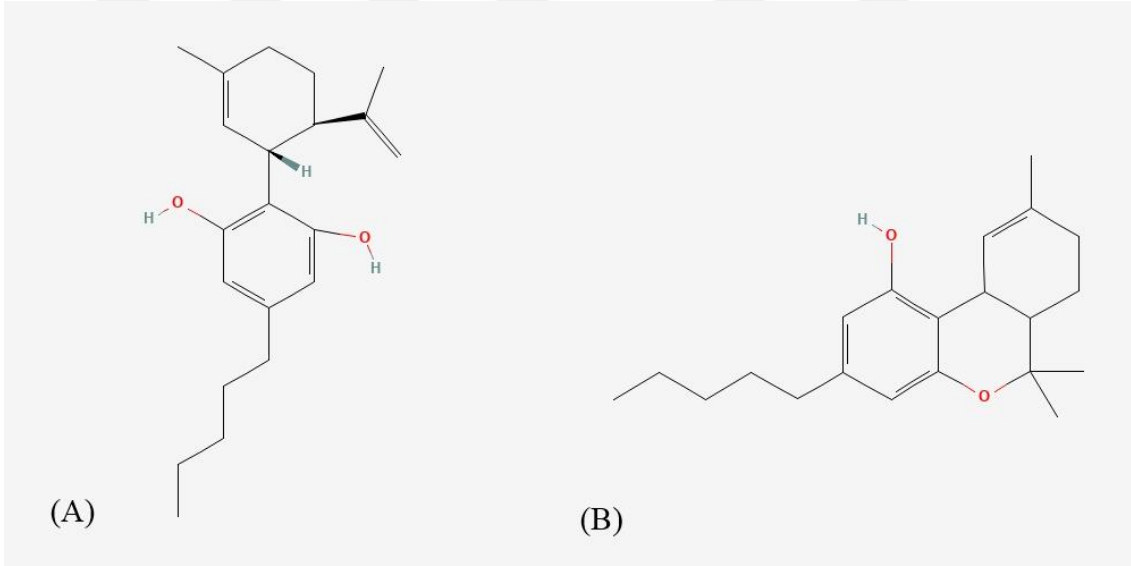
Dahili ya da harici olarak hastalık tedavisinde insanlık tarihi boyunca tıbbi bitkiler yer edinmiştir. Antik Mısır, Sümerler, Hititler gibi eski medeniyetler tarafından kullanılan tıbbi bitkilerin özellikleri içeriğinde bulunan bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011, Gökteş ve Gıdık 2019). Örneğin tıbbi bitkilerin anti kanser özellikleri yüzyıllardır bilinmektedir. *Podophyllum peltatum*'dan (Mayapple) izole edilen podofillotoksin akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır. Çeşitli çalışmalarda *Aleo vera* (Sarısabır) bitkisinin içerdiği aloe-emodin, aloin ve aloesin bileşenlerinin antitümör etki gösterdiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada *Panax ginseng*'in (Kore Ginseng) tümör hücrelerini apoptoz durumuna geçirdiği belirtilmiştir (Choi 2008, Desai *et al.* 2008, Pettit *et al.* 1995). *Curcuma longa* (Zencefil) bitkisinden elde edilen *Rhizoma Curcumae* apoptozu indüklediği yapılan çalışmada ortaya konmuştur (Wei *et al.* 2004).

Bitkilerin ürettiği bileşikler primer ve sekonder metabolitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler organik asitler, proteinler ve yağlar gibi hücre döngüsü, hücre çoğalması gibi bitkinin yaşamsal faaliyetlerini doğrudan etkileyen metabolitlerdir. Sekonder metabolitler ise hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde doğrudan ilişkisi bir ilişkisi yoktur. Bununla birlikte bitkilerin savunma mekanizmalarında rol aldığı, çevre koşullarına karşı dayanıklılık oluşturduğu göz önüne alınırsa en az primer metabolitler kadar önemlidir. Tıbbi bitkiler içerdikleri bu metabolitler ile tedavi edici özellik taşımaktadır. Geleneksel ilaç kaynağı olarak kabul edilen tıbbi bitkiler çoğu sentetik ilacın temelini oluşturmaktadır Tıbbi olarak kullanılan bitkilerin sayısı Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organisation, WHO) yaptığı araştırmada 20.000 olarak ifade edilmektedir (Gökteş ve Gıdık 2019, Ramakrishna and Ravishankar 2011, Top vd. 2019).

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen ve onları kendi ortamlarında rekabetçi kılan maddelerdir. Bitkinin kendisi ve diğer canlı organizmalar üzerinde çok çeşitli etkiler gösterir. Çiçeklenmeyi, meyve oluşumunu ve dökümünü tetiklerler, çok yıllık büyümeyi sürdürürler veya yaprak döken bitki davranışının oluşmasına neden olurlar (Teoh 2016).

Ayrıca antimikrobiyal olarak görev yapmaktadırlar. Sekonder metabolitler terpenler, alkaloidler, fenolik bileşikler, steroidler, saponinler, poliketidler ve fitokannabinoidleri örnek gösterilebilir (Alaca ve Arslan 2012, Tiring vd. 2020).

Sekonder metabolit olan fitokannabinoidler bazı çiçekli bitkilerde, ciğer otlarında ve kenevir de bulunmaktadır. Endokannabinoid sisteminin (EKS) temelini oluşturan CB-1 ve CB-2 reseptörleri bu bileşiklere yanıt vermektedir. Hayvan ve insan deneylerinde yapılan çalışmalarda EKS'nin hafıza, ruh hali, beyin ödüllendirme sistemleri ve uyuşturucu bağımlılığı gibi çok çeşitli biyolojik fonksiyonların yanı sıra lipoliz, glikoz metabolizması ve enerji dengesi gibi metabolik süreçleri düzenlediğini ortaya koymuştur (Chanda *et al.* 2019). *Cannabis sativa* L bitkisinin içerdiği fitokannabinoidler en yüksek yoğunlukta dışı çiçeklerde biriktirmektedir. Bunun temel sebebi genellikle bitkinin toprak üstü kısımlarında yer alan glandüler trikomlardır (Happyana *et al.* 2013). *Cannabis sativa* bitkisinin iki ana kannabinoidi bulunmaktadır. Bunlardan biri  $\Delta^9$ -Tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC/THC) fitokannabinoidi diğeri ise kannabinidioldür (CBD) (Kisková *et al.* 2019).



**Şekil 2.1** (A) Kannabinidiol (CBD) ve (B)  $\Delta^9$ -Tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ -THC/THC) kimyasal yapıları. National Center for Biotechnology Information (2023) uyarlanarak kullanılmıştır.

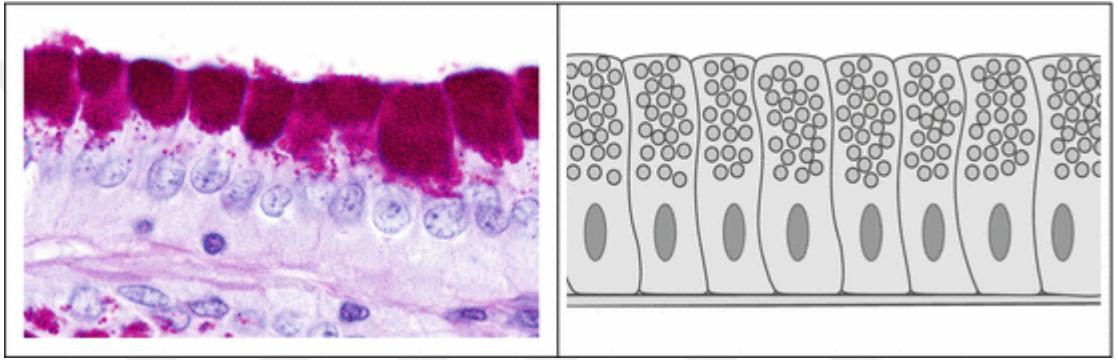
THC kannabinoidi beynin zamanı anlama yetisi düşünce ve konsantrasyonla ilgili reseptörler ile etkileşime girerek serebellumun normal çalışmasına engel olur. CBD'nin ise bilinen hiçbir psikoaktif etkisi yoktur ve bu nedenle son zamanlarda kanser dahil birçok terapötik alanda yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur (Mechoulam *et al.* 2007, M.G. Cascio *et al.* 2017).

CBD'nin CB-1 ve CB-2 reseptörlerine karşı düşük afiniteye sahip olduğu bununla birlikte kanser hücrelerinin metastaz yapmasını engelleyebileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Piomelli 2003, Thomas *et al.* 2007). CBD'nin tek başına veya diğer antikanserojenlerle birlikte apoptozu indüklediği, hücre migrasyonunu, *in vitro* metastası inhibe ettiğini, tümör boyutunu, vaskülarizasyonu ve birlikte büyümesini azalttığı ve *in vivo* olarak tümör gerilemesini indüklediği gösterilmiştir (Massi *et al.* 2004, Scott *et al.* 2014, Thomas *et al.* 2007). CBD'nin agresif gelişen meme kanserinde *in vivo* ve *in vitro* hücre migrasyonu, invazyonu ve metastazı da engellediği gözlemlenmiştir (McAllister *et al.* 2011, Murase *et al.* 2014). 24, 48 ve 72 saat boyunca SW480 kolon kanseri hücre hattı ile yapılan deneylerde CBD maruziyeti sonrası hücrelerin fosfataza bağlı apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir (Safe *et al.* 2011).

G proteinleri heterodimerik yapıda olup hücre membranında bulunurlar ve dışarıdan gelen sinyalleri hücre içine iletirler. EKS sistemin bir parçasını oluşturan CB-1 ve CB-2 reseptörleri G proteine bağlıdır.  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  şeklinde ifade edilen 3 birimden oluşmaktadır. (Wess 1997, Wettschureck and Offermanns 2005). EKS'nin sinyal iletimi, CB-1 ve CB-2 reseptörleri aracılığı ile Gi/O protein aktivasyonunu, adenilil siklaz inhibisyonunu, MAPK aktivasyonunu Ca (Kalsiyum) kanal blokajı, K (Potasyum) kanal blokajı ve K (Potasyum) kanallarının aktivasyonunu gerçekleştirir. EKS'nin endokannabinoidleri: anandamid (N-arachidonoyl ethanolamine) ve 2-arachidonoylglycerol (2-AG) çoklu doymamış yağ asitleri yapısında olup arachidonik asit türevleridir ve hücre zarında bulunan gliserofosfolipidlerin yıkımı ile oluşur. FAAH geni tarafından kodlanan serin amino asit enzimlerinden olan FAAH (Yağ Asidi Amid Hidrolaz) ve MGLL geni tarafından kodlanan MAGL (Monoasilgliserol Lipaz) enzimleri tarafından parçalanır. AEA ve 2-AG nörotransmitterleri, immun, kardiyovasküler, üreme, solunum ve iskelet sisteminde

rol almaktadır (Howlett and Abood 2017, Lauckner *et al.* 2005, Lu *et al.* 2019, Roland *et al.* 2014, Saroz *et al.* 2019).

Kolorektal kanser dünyada en yaygın görülen üçüncü en büyük kanser türüdür. Kolorektal kanser rektum ve kolonda oluşmaktadır. Kolon da glandüler epitel hücrelerinin (Şekil 2.2) anormal proliferasyonundan kaynaklanan bir hastalıktır. Kolit tipli, sporadik tipli ve kalıtsal tipli olmak üzere üç çeşit kolorektal kanser türünden bahsedilebilir (Triantafillidis *et al.* 2009).



**Şekil 2.2** Grandüler epitel hücreleri (Rehfeld *et al.* 2017).

Çoğu kanser türü gibi kolon kolorektal kanserde bir polipten kaynaklanmaktadır. Kolonda oluşan mutasyon geçirmiş bir kriptin polip oluşturması ardından yaklaşık 10 yıllık bir süreçte kolorektal kanser ilerlemektedir. Yapılan araştırmalarda kolorektal kanser başlangıcının temel sebebinin bir kök hücre olduğu varsayılmaktadır (De Sousa E Melo *et al.* 2017, Nassar and Blanpain 2016). Tümör baskılayıcı genlerin (*TP53*, *Rb*, *APC*, *CD95* vb.) etkisiz hale gelmesi ve hücre bölünmesinde rol oynayan proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesiyle ilerleyen sürecin epigenetik değişiklikler yaratması kanser kök hücrelerinin oluşmasının temel nedenini oluşturmaktadır (Nassar and Blanpain 2016).

Hızla gelişen hücreler, kansere ilerleyebilen ve mikrosatelit instabilitesi (Microsatellite instability, MSI), kromozomal dengesizlik (Chromosomal instability, CIN) gibi farklı yolla metastaz yapabilen iyi huylu bir adenom oluşturmaktadır (Malki *et al.* 2020, Nguyen and Duong 2018). Kanser, dev bir adenoma ve sonunda kansere dönüşen küçük

bir adenom olarak başlar. Bu adenomun kromozomal dengesizlik (CIN) ile ilişkisi bulunmaktadır. Ulusal Kanser Enstitüsüne (National Cancer Institute, NIH) göre, bu model sporadik korektal kanserin %10-15'ini oluşturmaktadır. Normal hücrelerden metaplastik polipe, metaplastik polipeten, sapsız tırtıklı adenomlara ve bu adenomların kansere dönüşmesi ile tanımlanır (Keum and Giovannucci 2019).

Apoptoz zinciri, çeşitli yollar izleyerek hücre ölümünü gerçekleştirir. Bu aşamaların düzenlenmesinde çeşitli düzenleyici moleküller bulunmaktadır. Bu moleküller: bcl-2 ailesi, p53, Fas (Cd95 -Apo-1) ve kaspaz ailesidir (Kam and Ferch 2000).

Bcl-2 ailesi hücrenin apoptoz durumuna geçmesinde kritik bir rol oynar. Bu yapıda birbirlerine proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere zıt iki fonksiyonel grup bulunmaktadır. Proapoptotik proteinlerin hücre içerisindeki yoğunluğu hücreyi apoptoza meyilli yapmaktadır. Bu durumun tersinde ise yani antiapoptotikler fazla ise hücre apoptoz durumuna daha az meyillidir (Dağdeviren 2021, Gülfidan ve Özgür 2011, Jerry M and Cory 2001).

P53, bu protein yapısında transkripsiyon faktörleri bulunduran hücre içerisinde DNA hasarı durumunda hücre döngüsünü durdurabilen bir fosfoproteindir (Sabapathy and Lane 2019) Hücrede meydana gelen DNA hasarı tamir olamaz durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas üretimini artırarak Bcl-2'nin baskılanması sonucu apoptozu uyarır (Vousden and Lu 2002).

Fas (Cd95 -Apo-1), CD95 (ya da Fas), tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) üst ailesinin bir üyesidir. Bağışıklık sisteminde T hücreleri ve naturel killer hücrelerinin membranında bulunmaktadır ve hücre ölümünü kontrol eder (Guégan ve Legembre 2018). En bilinen ölüm ligandları: TNF-a, Fas ligandı (Fas/Cd95/Apo-1) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL/Apo2L) bulunur. Sırasıyla hücre yüzeyi ölüm reseptörlerini, TNFR1, Fas ve TRAIL-R1/TRAIL-R2'yi aktive ederek apoptozu indüklerler TNF- $\alpha$  ve Fas ligandlarının apoptozu indükleme başarısı olsa dahi insan bağışıklık sisteminde septik şoka benzeyen bir uyarı meydana getirmektedir (Shigekazu 1997, Spierings *et al.* 2004).

Kaspazlar, (Cysteine Dependent aspartate Specific proteases) hücre içerisinde inaktif durumda bulunmaktadır. Kaspazlar başlıca üç ana başlığa ayrılırlar bunlar: (a) Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2,8,9,10, (b) Efektör kaspazlar: Kaspaz 3,6,7, (c) İnflamatuar kaspazlar: Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14. Bir endoproteaz olan kaspazlar aktif bölgelerinde bulunan sistein ile (Cys, C), hücre içerisinde belirli aspartik asit (Asp, D) kalıntısıyla karşılaştığında peptit bağlarını hidrolize eder. Bu durum kaspazların apoptoz sinyal yollarında belirli hedefleri tanıyarak apoptozu başlatmasını sağlar. Kaspazlar aracılığıyla yapılan işlem, substratın inaktivasyonu ile sonuçlanabilir bu hücrenin kontrollü ölümünü sağlar (McIlwain *et al.* 2013).

Apoptoz regülasyonu birçok yolla meydana gelebilir. Bununla birlikte apoptoz zincirinin İntrinsik (Mitokondriyal) yol ve Ekstrinsik yol olmak üzere ana iki tane regülasyonu vardır. Mitokondriyal yolda sağlıklı hücrelerde Bax/bak proteinleri, antiapoptotik olarak bilinen bcl-2 ve bcl-XL proteinlerinin mekanizmasını baskılayarak hücrenin apoptoz sürecine girmesini sağlar bu durumda hücrede bulunan bcl-2 ve bcl-XL proteinlerinin, Bax/bak proteinlerine karşı oranı önemlidir (Oltval Milliman and Korsmeyer 1993). Ekstrinsik yol yolda ise TNFR (tumor necrosis factor receptor) ailesine ait hücre yüzeyinde bulunan reseptör, hücre içerisinde bulunan ölüm ligandlarını tanımaktadır. Bu ligandlar, ölüm reseptörleri ile etkileşimde bulunurlar bu durumda özel peptit bağları oluştururlar. Hücrede gerçekleşen etkileşimler, apoptoz durumunun başlamasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri tarafından ölüm ligandlarının bağlanması algılanır. Ölüm reseptörleri, yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alanı olan ölüm bölgesi (death domain, DD) olarak adlandırılan sitoplazmik bir alana ve sistein (Cys, C) içeren hücre dışı bir alana sahiptir. DD, hücre yüzeyinden hücre içine apoptotik sinyalin iletilmesinde önemlidir. Bu sinyal iletişiminin DD aracılığı ile yapılması apoptoz sürecinin indüklenmesinde ve apoptotik sinyallerin yollarının aktivesinde DD'nin önemini göstermektedir (Peter and Krammer 2003).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

Bu tez çalışması deneyleri Gazi Üniversitesi Dişçilik Fakültesi Temel Bilimler Tıbbi Mikrobiyoloji Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan insan kolorektal adenokarsinom hücre hattı CaCo-2 (HTB37) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Fonu tarafından FF100522L08 no'lu proje ile desteklenmiştir.

##### 3.1.1 Kimyasal malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1** Kullanılan Malzeme Listesi.

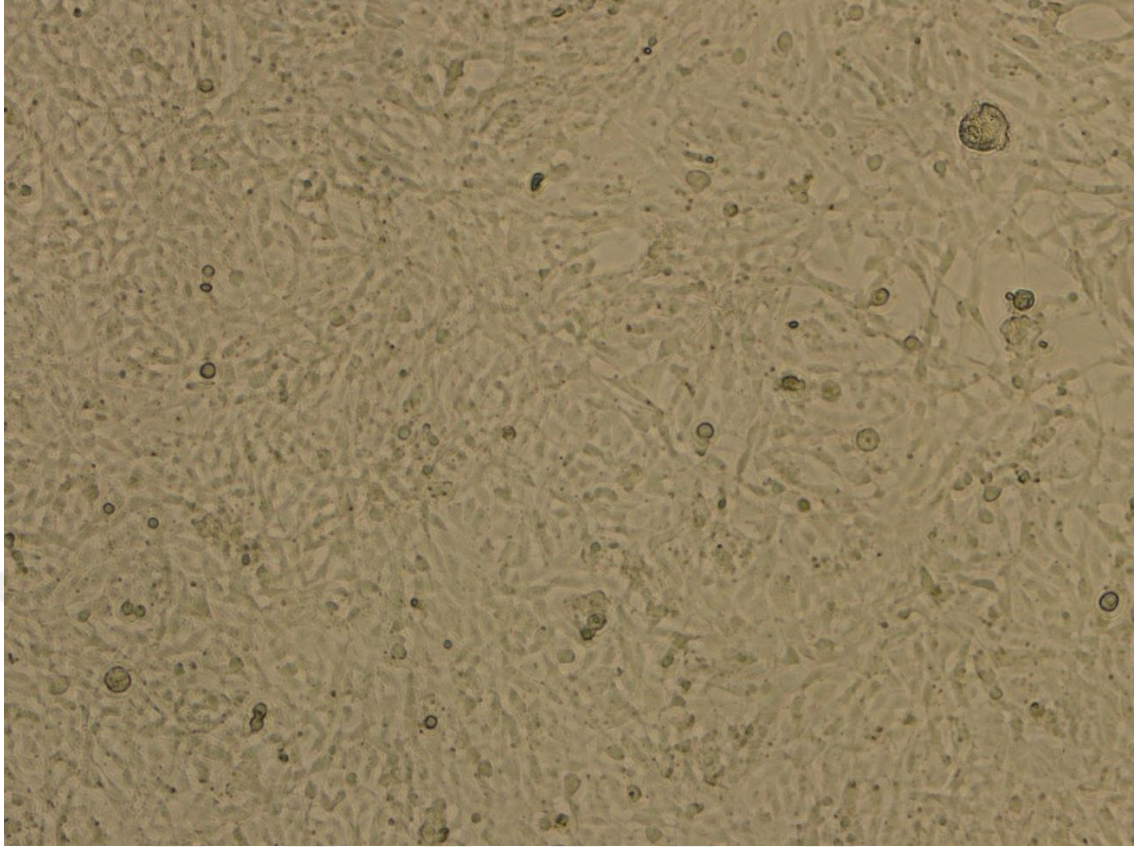
Katalog numarası	Malzeme	Marka	Menşe Ülkesi
E-EL-HOO17	Caspase-3	Elabscience	Çin
E-EL-H059	Caspase-8	Elabscience	Çin
E-EL-H0663	Caspase-9	Elabscience	Çin
01-052-1A	DMEM	Sartorius	İsrail
03-053-1B	Tripsin	Sartorius	İsrail
90080	CBD	Cayman	ABD
	Penicillin-Streptomycine		
	MTT		
	(Characterized Fetal Bovine Serum (FBS)FBS	Sartorius	İsrail

## 3.2 Metot

Araştırmanın deney aşamasından önce hücreler kültür edilmiş olup hücre canlılık analizi (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid) MTT analizi ile inhibisyon konsantrasyon değeri (IC<sub>50</sub>) değeri bulunmuştur. Daha sonraki aşamada ise hücrelerin CBD ile muamelesinden sonra ELISA testi uygulanıp kaspaz-3 kaspaz-8 ve kaspaz-9 ifadeleri belirlenmiştir.

### 3.2.1 Hücre kültürlerinin çözülmesi ve çoğaltılması

CaCO-2 hücre hatları -80°C'den alınıp 37 °C etüvde çözülürmüştür. Bu işlem sırasında Hücre medyumunu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose +4 °C'den ve Fetal Bovine Serum (FBS) -20°C'den alınarak 37 °C etüvde oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Kriyotüpün içinde bulunan hücreler çözülmesinin akabinde 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. HEPA-filtre ile tozdan ve partikülden arındırılmış hava sağlamak için kullanılan laminar hava akışlı kabin içerisinde santrifüj sonrası kriyotüpte bulunan dondurucu medium otomatik pipet yardımı ile atılmıştır. Kriyotüpün tabanında kalan hücre peleti üzerine 1 mL %10 FBS içeren medyum eklenerek pipetleme işlemi yapılmıştır. Kabin içinde devam eden işlem sırasında otomatik pipetör kullanılarak T25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Kap içerisine 7 mL % 10 FBS ve %1 PEST içeren hücre mediumu eklenerek 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüve alınmıştır. CaCo-2 hücreleri her gün invert mikroskop yardımı ile incelenmiş olup (Şekil 3.2) hücre kabının yüzeyini tamamen kapladıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır.



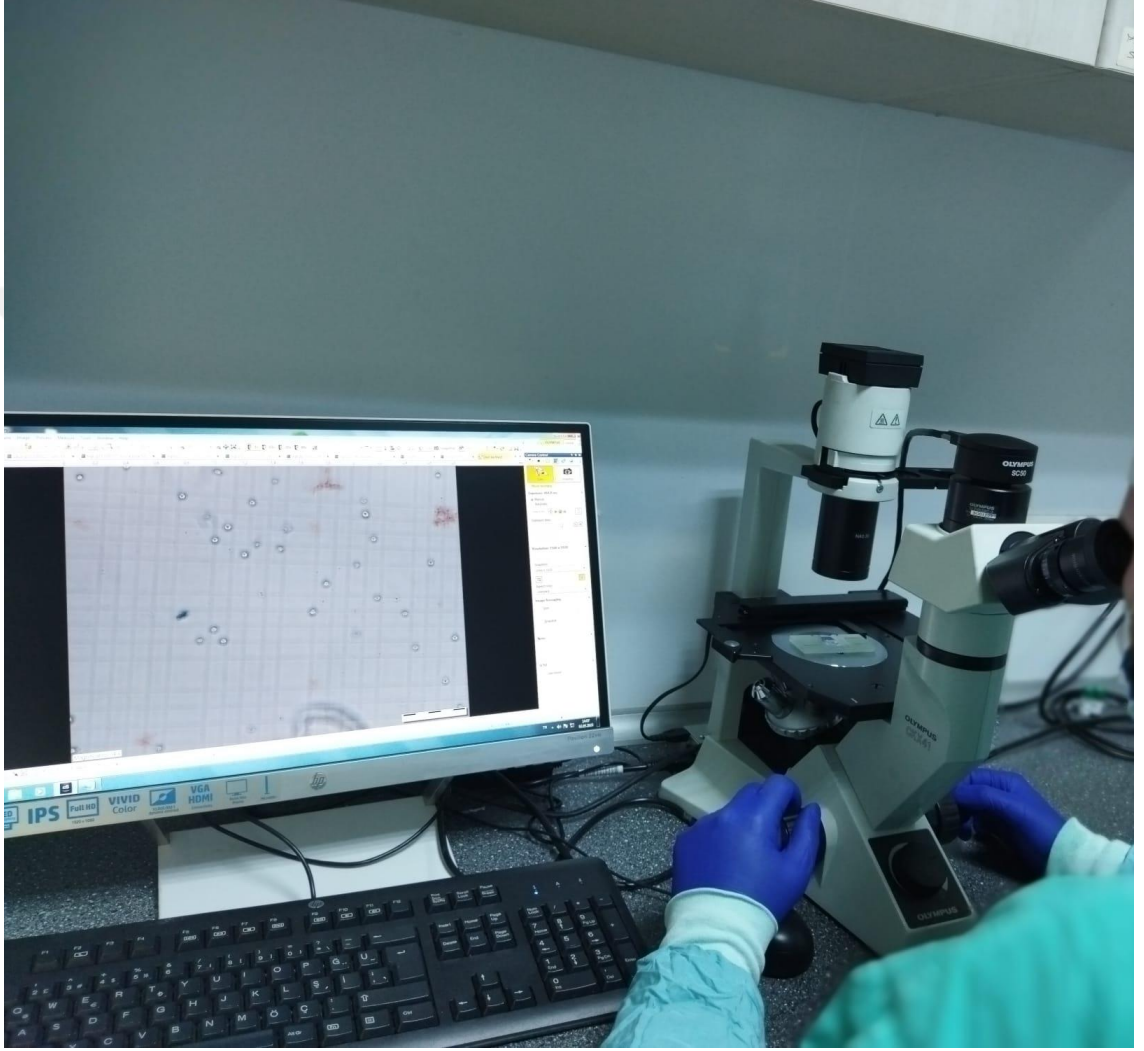
**Şekil 3.1** CaCo-2 hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü.

### **3.2.2 Hücrelerin MTT testine hazırlanması**

İnkübasyonda bulunan hücreler etüvden alınarak invert mikroskop aracılığı ile incelenmesi sonucunda hücre kabının yüzeyini tamamen kapladıklarında tripsinizasyon işlemine alınmıştır.

Laminar kabine alınan hücre kültür kaplarından hücre mediumu çekilerek uzaklaştırılmıştır. Sonrasında ise hücre kültür kabına 3 mL Tripsin solüsyonu eklenmesinin ardından etüvde 5 dk bekletilerek invert mikroskopta hücre kabının tabanından tamamen ayrılıp ayrılmadığı incelenmiştir. Bu işlem sonrası tekrar laminar kabine alınan hücre kapları içinden pipet yardımıyla çekilen Tripsin-hücre karışımı 15 mL steril falkon tüpüne konularak 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüje edilen falkon tüpü içerisinden süpernatant alınarak alttaki hücre peleti üzerine 1 mL %10 FBS ve %1 PEST içeren DMEM hücre mediumu eklenerek pipetleme işlemi

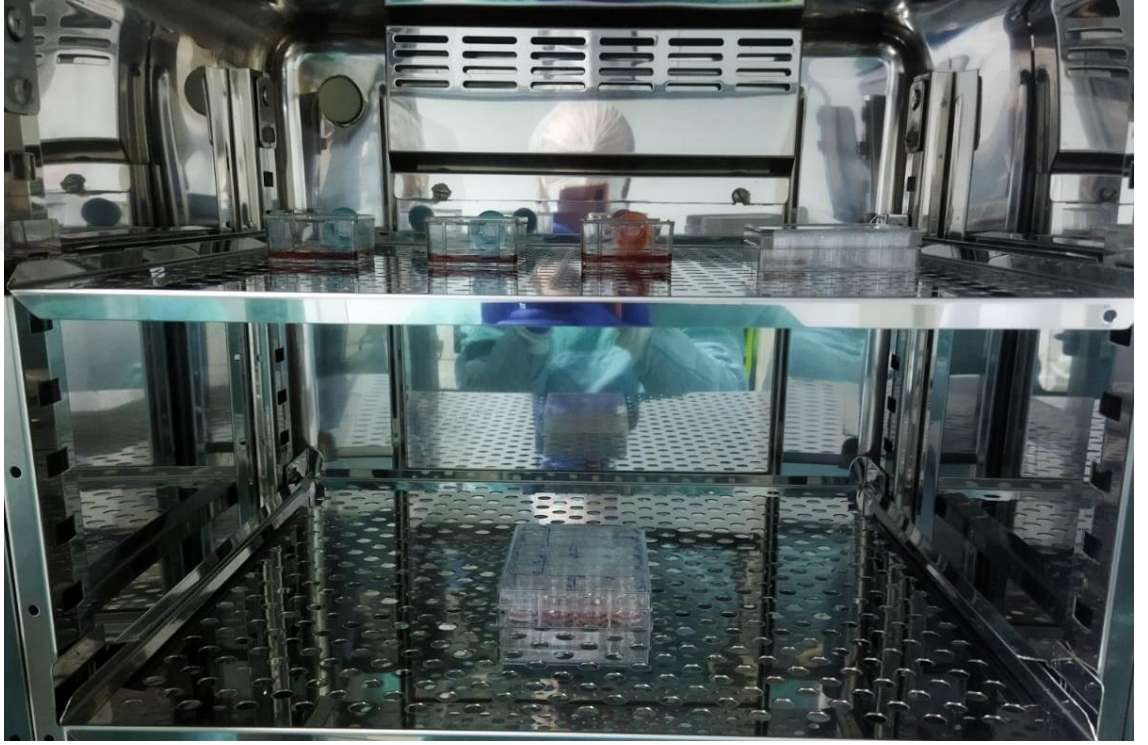
uygulanmıştır. Otomatik pipet yardımıyla alınan 10  $\mu$ L hücreli solüsyon ve 10  $\mu$ L Tripan mavisi, ependorff tüp içerisinde karıştırılarak Thoma lamında hücre sayımı yapılmıştır. 16 karede sayılan hücre sayısı 10.000 ile çarpılarak 1 mL hücre solüsyonunda ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 3.2 Thoma lamında hücre sayımı.

### 3.2.3 Hücreslerin 96 kuyucuklu mikroplakalara ekimi

Hücre sayımından sonra, 96 kuyucuklu mikroplakada her kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Mikroplakalar, ekim sonrası  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de % 5  $\text{CO}_2$  içeren etüvde 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.3).

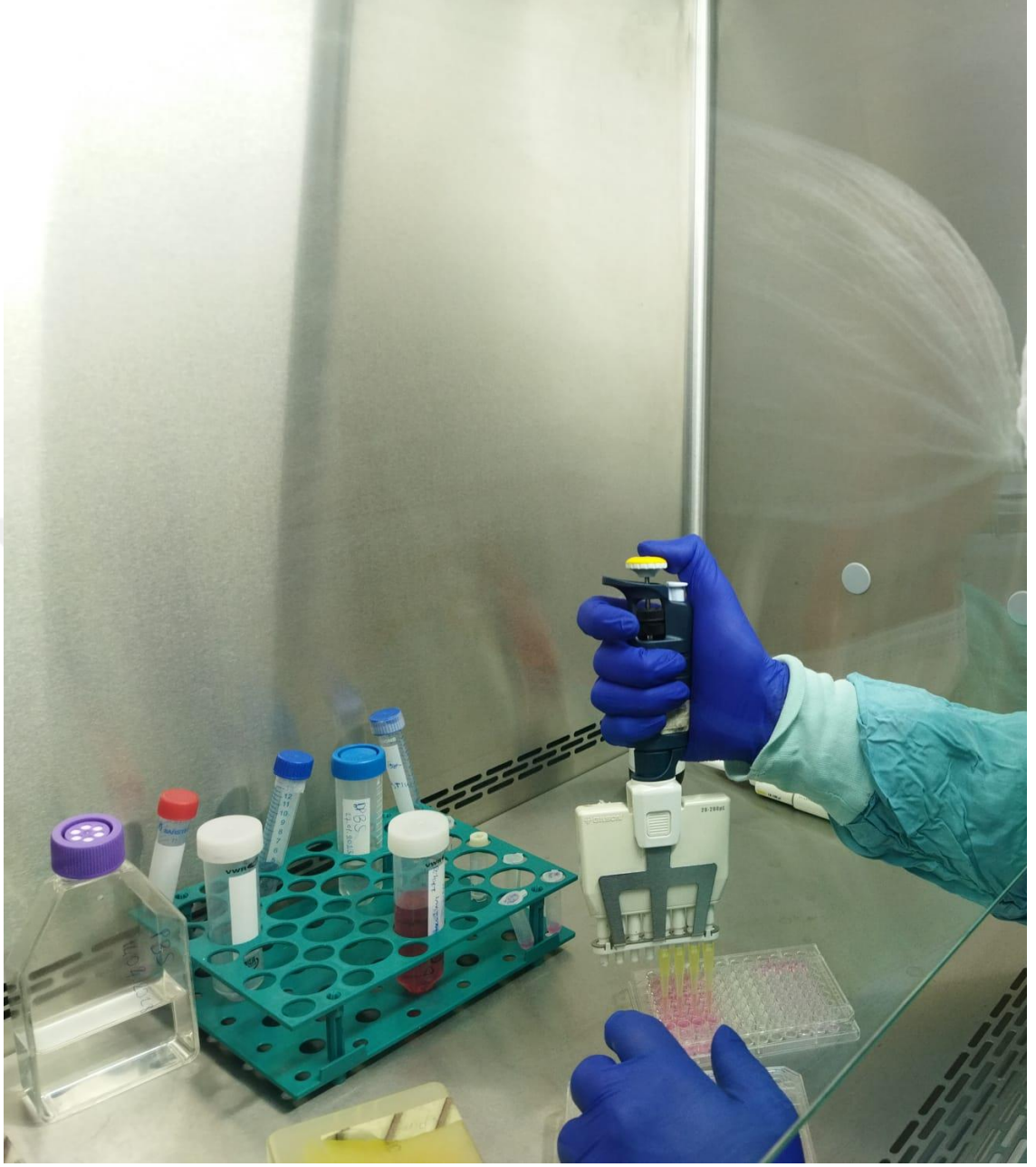


Şekil 3.3 Etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakılan hücreler.

### 3.2.4 CBD dozlarının hazırlanması ve uygulanması

CBD toz halinde bulunduğundan içerisine 1 mL DMSO ile eklenip çözdürülerek vortekslenmiştir. Ana stoktan 1/10 oranında dilüye edilen CBD maddesi  $200\text{ }\mu\text{M}$ ,  $100\text{ }\mu\text{M}$ ,  $80\text{ }\mu\text{M}$ , ve  $40\text{ }\mu\text{M}$ ,  $20\text{ }\mu\text{M}$ ,  $10\text{ }\mu\text{M}$ , olacak şekilde toplam 6 dilüsyon hazırlanmıştır.

96 kuyucuklu mikroplakalara ekilen hücrelerin etüvde 24 saatlik inkübasyonundan sonra CBD dozlaması yapılmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakalar  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren etüve alınarak 24 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.5.2).



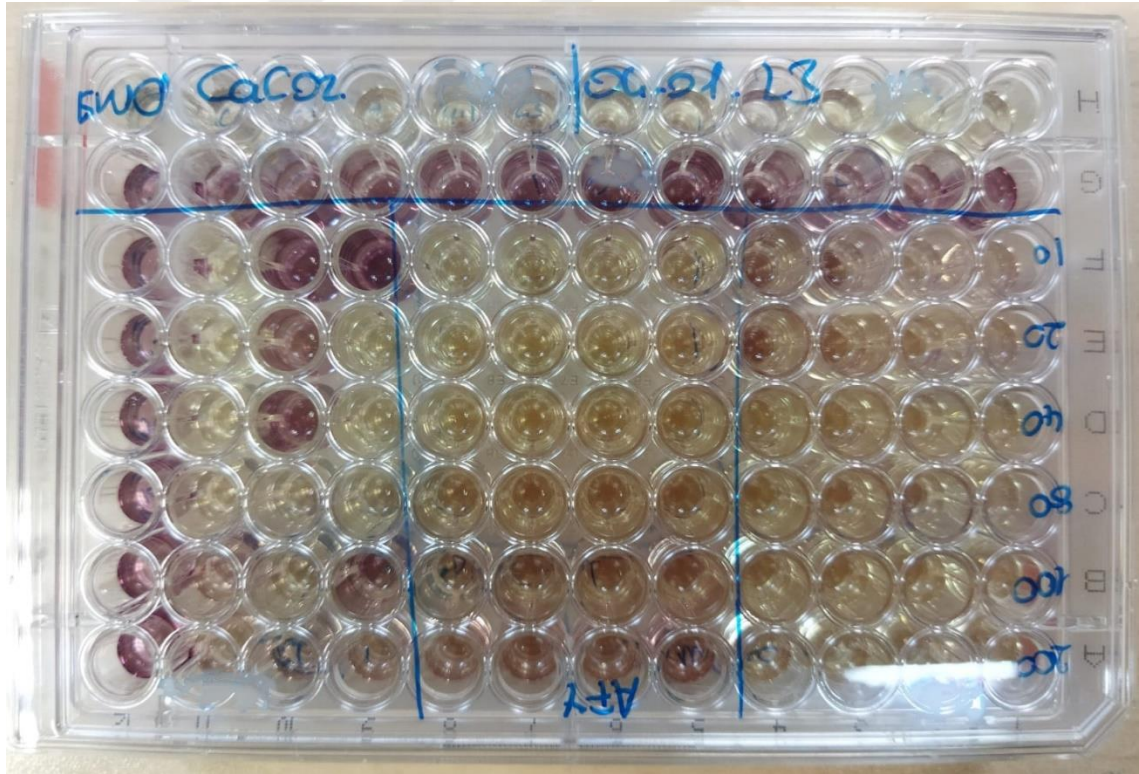
**Şekil 3.4** Mikroplakalara ekilen CaCo-2 hücrelerinin inkübasyonu sonrasında CBD metabolitinin uygulanması.

### **3.2.5 MTT analizi**

Standart sitotoksosite testlerinden biri olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid) testi mitokondrilerdeki dehidrogenazların aktivitesini ölçmektedir. Proliferasyona uğrayan hücreler tetrazolyumu formazan tuzuna dönüştürerek meydana gelen renk değişimi ölçülebilir olmaktadır. Hücre canlılığını

yitirmeye başladığında tetrazolyum tuzunu formazana çevirme yeteneğini kaybeder. Bu nedenle renk değişimi olmamaktadır (Tokur ve Aksoy 2017).

CaCo-2 hücrelerinin CBD madde konsantrasyonlarında 24 saat süre boyunca maruz bırakılmıştır (Şekil 3.2.6). Hücre canlılık analizi MTT testi (Yurdakok vd. 2016) metodu temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem uygulamasında öncelikle mikropalaklarda bulunan hücre mediumu, solvent ve CBD'den oluşan kuyu içeriği boşaltılmıştır. 96 kuyucuklu mikropalakanın her kuyucuğuna 10 µl MTT (0,5 mg/mL) eklenmiştir. Mikropalakalar, laminar kabinden alınıp 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Ardından mikropalaka kuyularının her birine 100 µL DMSO uygulanarak 5 dakika etüvde inkübe edilmiş ve 540 nm dalga boyunda BioTek marka mikropalaka okuyucu kullanılarak okutulmuştur (Şekil 3.2.7).



Şekil 3.5 MTT testi sonucu 96'lık mikropalakada formazan tuzunun renk değişimi.



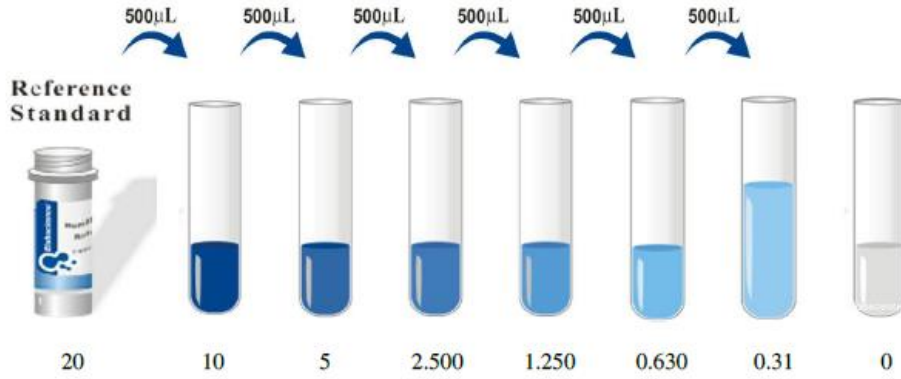
**Şekil 3.6** MTT testi: Biotek marka mikropılaka okuyucuda örneklerin okunması.

### **3.2.6 ELISA testi**

CBD'nin MTT testi sonrası hesaplanan  $IC_{50}$  değerinin 1/10 ve 1/100'lük dozları hazırlanmıştır. Bu dozlar 24'lük mikropılakalara eklendikten sonra 24 ve 48 saat olmak üzere etüvde inkübasyona bırakılmıştır. ELISA testi için tüm kuyucuklardaki mediumlar çekilmiştir. Bu mediumlar kullanılarak CBD ile muamele edilmiş CaCo-2 hücre hatlarının kaspaz-3 (Human CASP-3 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0017), kaspaz-8 (Human CASP-8 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0659) ve kaspaz-9 (Human CASP-9 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0663) ELISA kit) enzim ifadelerini ölçmek amacıyla ELISA testi yapılmıştır.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yaygın olarak immünolojik testlerde kullanılan antijen ve antikor arasındaki reaksiyonu ölçen analiz kitidir. Bu tezde kullanılan kit, Sandwich-ELISA prensibini kullanmıştır. Analiz için mikro ELISA plakası, insan CASP-3, CASP-8 ve CASP-9'a için özgü bir antikorla her bir kit için önceden kaplanmıştır. Test öncesi tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirilmiştir (18-25°C).

Kaspaz-3 için yoğunlaştırılmış Yıkama Tamponu'ndan 30 mL'yi, deiyonize veya distile suyla 720 mL olacak şekilde seyreltilmiş olup ve 750 mL yıkama tamponu hazırlanmıştır. Standart çalışma çözeltisi hazırlanırken standart 10.000×g hızında 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Referans standarttan ve örnek seyrelticiden 1,0 mL eklenmiştir. Referans Standart ve Örnek Seyrelticiden 1 mL eklenmiş olup, vortex ile düşük hızda karıştırılmıştır. 7 ependorff tüpe 500 µL Referans Standart ve Örnek Seyreltici eklenmiştir. İlk tüpe 500 µL 20 ng/mL çalışma çözeltisinden pipetlenerek 10 ng/mL çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Önceki tüpteki çözeltiden 500 µL'yi, bu adıma göre sonraki tüpe pipetlenmiş Ardından Human CASP-3 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0017) (Şekil3.7) kiti için: 20, 10, 5, 2.500, 1.250, 0.630, 0.31, 0 ng/mL, olacak şekilde dilüe edilmiştir. (Şekil3.6)



**Şekil 3.7** Kaspaz-3 kiti için dilüe yöntemi.

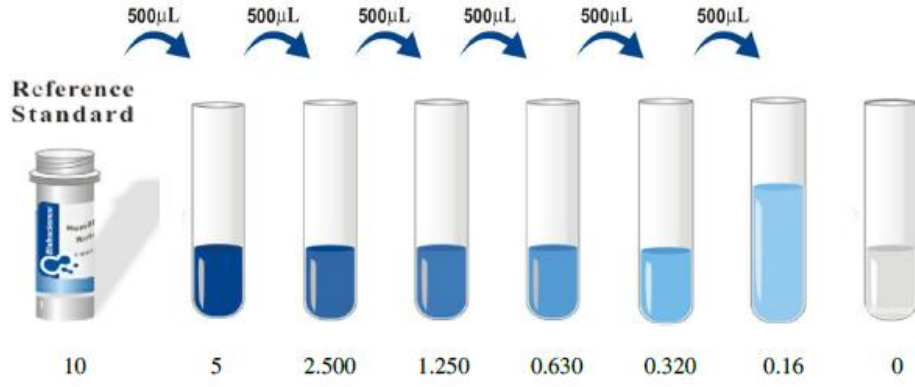


**Şekil 3.8** Human CASP-3 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0017) ELISA kiti.

Biyotinileşmiş Tespit Antikoru vortexlendikten sonra 100× Yoğunlaştırılmış Biyotinileşmiş Tespit Antikorusunu Biyotinileşmiş Tespit Antikorusuna Dilüent ile 1× çalışma çözeltilisine kadar seyreltilmiştir. HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase) Konjugatı, HRP ile konjuge edilmiş avidindir. Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını vortexlemenin ardından 100× Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını HRP Konjugatı Dilüenti ile 1× çalışma çözeltilisine kadar seyreltilmiştir. ELISA kitlerinde dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı için kuyucuklar belirlendikten sonra her bir kuyucuk için 100 µL dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı kuyulara eklenmiştir. Kitle birlikte gelen kapakla plaka kapatılmıştır. 37°C'de 90 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Her

kuyudan eklenen çözelti döküldükten sonra, yıkama yapılmadan her kuyuya 100 µL Biotinileşmiş Tespit Antikor çalışma çözeltisi eklenmiş ve plakalar yeni bir kapakla kapatılıp 37°C'de 1 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyudan çözelti boşaltılmıştır. Herbir kuyuya 350 µL yıkama tamponu eklenerek. 1 dakika beklenmiş, ardından her bir kuyudan çözeltiyi dökülerek emici kâğıt üzerinde kurulanmıştır. Bu yıkama adımını 3 kez tekrar edilmiştir. Her kuyuya 100 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklenerek plakalar yeni bir kapakla 37°C'de 30 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Kuyulardan çözeltiyi dökülerek 5 kez yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyuya 90 µL Substrat Reaktif eklenerek plaka yeni bir kapakla kapatılmış ve 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümü için mikropilaka okuyucuyu yaklaşık 15 dakika önceden ısıtılmıştır. Renk değişimi gözlenen mikropilakaların (Şekil 3.2.7.1.4) her kuyucuğuna 50 µL Durdurma Çözeltisi eklenerek 450 nm'de her bir kuyucuğun absorbans değeri ölçülmüştür

Kaspaz-8 için yoğunlaştırılmış Yıkama Tamponu'ndan 30 mL'yi, deiyonize veya distile suyla 720 mL olacak şekilde seyreltilmiş olup ve 750 mL yıkama tamponu hazırlanmıştır. Standart çalışma çözeltisi hazırlanırken standart 10.000×g hızında 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Referans standarttan ve örnek seyrelticiden 1,0 mL eklenmiştir. Referans Standart ve Örnek Seyrelticiden 1 mL eklenmiş olup, vortex ile düşük hızda karıştırılmıştır. 7 ependorff tüpe 500 µL Referans Standart ve Örnek Seyreltici eklenmiştir. İlk tüpe 500 µL 20 ng/mL çalışma çözeltisinden pipetlenerek 10 ng/mL çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Önceki tüpteki çözeltiden 500 µL'yi, bu adıma göre sonraki tüpe pipetlenmiş Ardından Human CASP-8 (Elabsience marka, Katalog no:E-EL-H0659) (Şekil 3.9) kiti için: 10, 5, 2.500, 1.250, 0.630, 0.320, 0.16, 0 ng/mL., olacak şekilde dilüe edilmiştir.(Şekil3.8)



Şekil 3.9 Kaspaz-8 kiti için dilüe yöntemi.



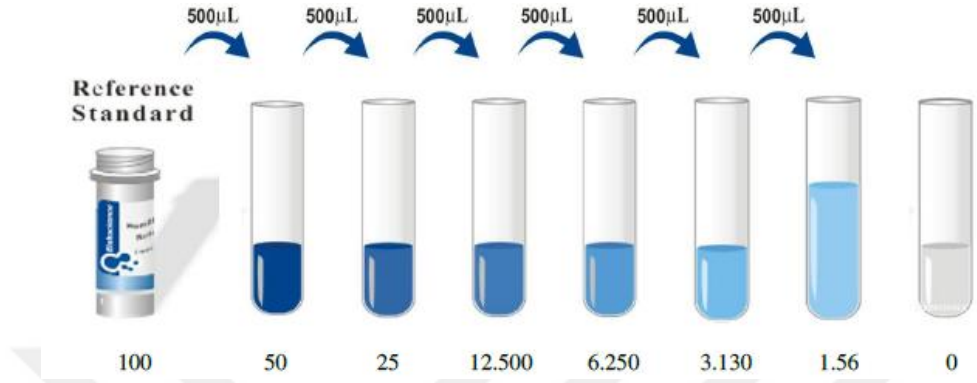
Şekil 3.10 Human CASP-8 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0659) ELISA kiti.

Biyotinileşmiş Tespit Antikoru vortexlendikten sonra 100× Yoğunlaştırılmış Biyotinileşmiş Tespit Antikorusunu Biyotinileşmiş Tespit Antikoruyla Dilüent ile 1× çalışma çözeltisine kadar seyreltilmiştir. HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase) Konjugatı, HRP ile konjuge edilmiş avidindir. Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını vortexlemenin ardından 100× Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını HRP Konjugatı Dilüenti ile 1× çalışma çözeltisine kadar seyreltilmiştir.

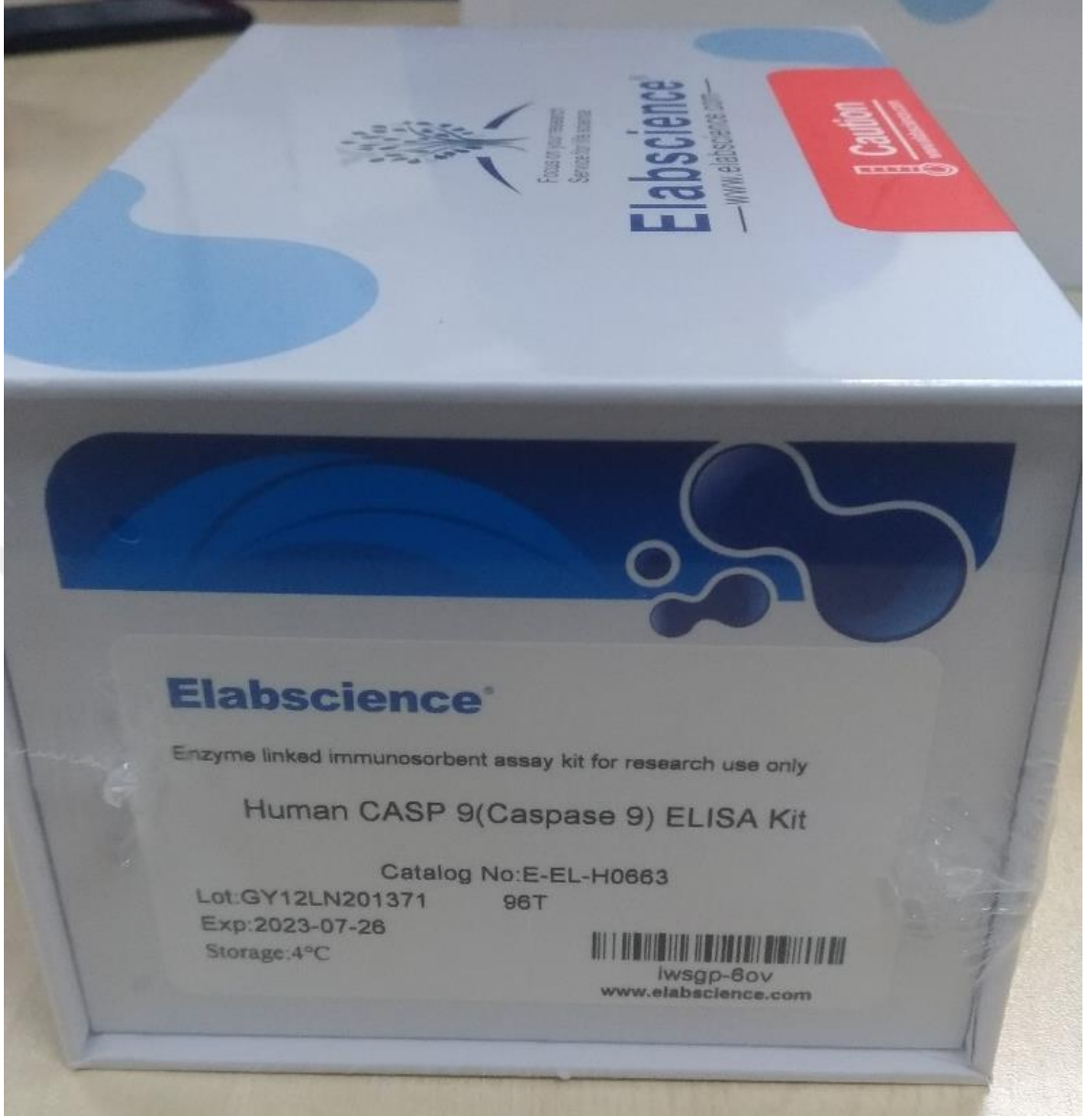
ELISA kitlerinde dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı için kuyucuklar belirlendikten sonra her bir kuyucuk için 100 µL dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı kuyulara eklenmiştir. Kitle birlikte gelen kapakla plaka kapatılmıştır. 37°C'de 90 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Her kuyudan eklenen çözelti döküldükten sonra, yıkama yapılmadan her kuyuya 100 µL Biyotinileşmiş Tespit Antikor çalışma çözeltisi eklenmiş ve plakalar yeni bir kapakla kapatılıp 37°C'de 1 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyudan çözelti boşaltılmıştır. Herbir kuyuya 350 µL yıkama tamponu eklenerek. 1 dakika beklenmiş, ardından her bir kuyudan çözeltiyi dökülerek emici kâğıt üzerinde kurulanmıştır. Bu yıkama adımını 3 kez tekrar edilmiştir. Her kuyuya 100 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklenerek plakalar yeni bir kapakla 37°C'de 30 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Kuyulardan çözeltiyi dökülerek 5 kez yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyuya 90 µL Substrat Reaktif eklenerek plaka yeni bir kapakla kapatılmış ve 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümü için mikrolaka okuyucuyu yaklaşık 15 dakika önceden ısıtılmıştır. Renk değişimi gözlenen mikrolakaların (Şekil 3.2.7.1.4) her kuyucuğuna 50 µL Durdurma Çözeltisi eklenerek 450 nm'de her bir kuyucuğun absorbans değeri ölçülmüştür.

Kaspaz-9 için yoğunlaştırılmış Yıkama Tamponu'ndan 30 mL'yi, deiyonize veya distile suyla 720 mL olacak şekilde seyreltilmiş olup ve 750 mL yıkama tamponu hazırlanmıştır. Standart çalışma çözeltisi hazırlanırken standart 10.000×g hızında 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Referans standarttan ve örnek seyrelticiye 1,0 mL eklenmiştir. Referans Standart ve Örnek Seyrelticiye 1 mL eklenmiş olup, vortex ile düşük hızda karıştırılmıştır. 7 ependorff tüpe 500 µL Referans Standart ve Örnek Seyreltici eklenmiştir. İlk tüpe 500 µL 20 ng/mL çalışma çözeltisinden pipetlenerek 10 ng/mL çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Önceki tüpteki çözeltiden 500 µL'yi, bu adıma göre

sonraki tüpe pipetlenmiş Ardından Human CASP-9 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0663) (Şekil 3.11) kiti için: 100, 50, 25, 12.500, 6.250, 3.130, 1.56, 0 ng/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir. (Şekil 3.10)



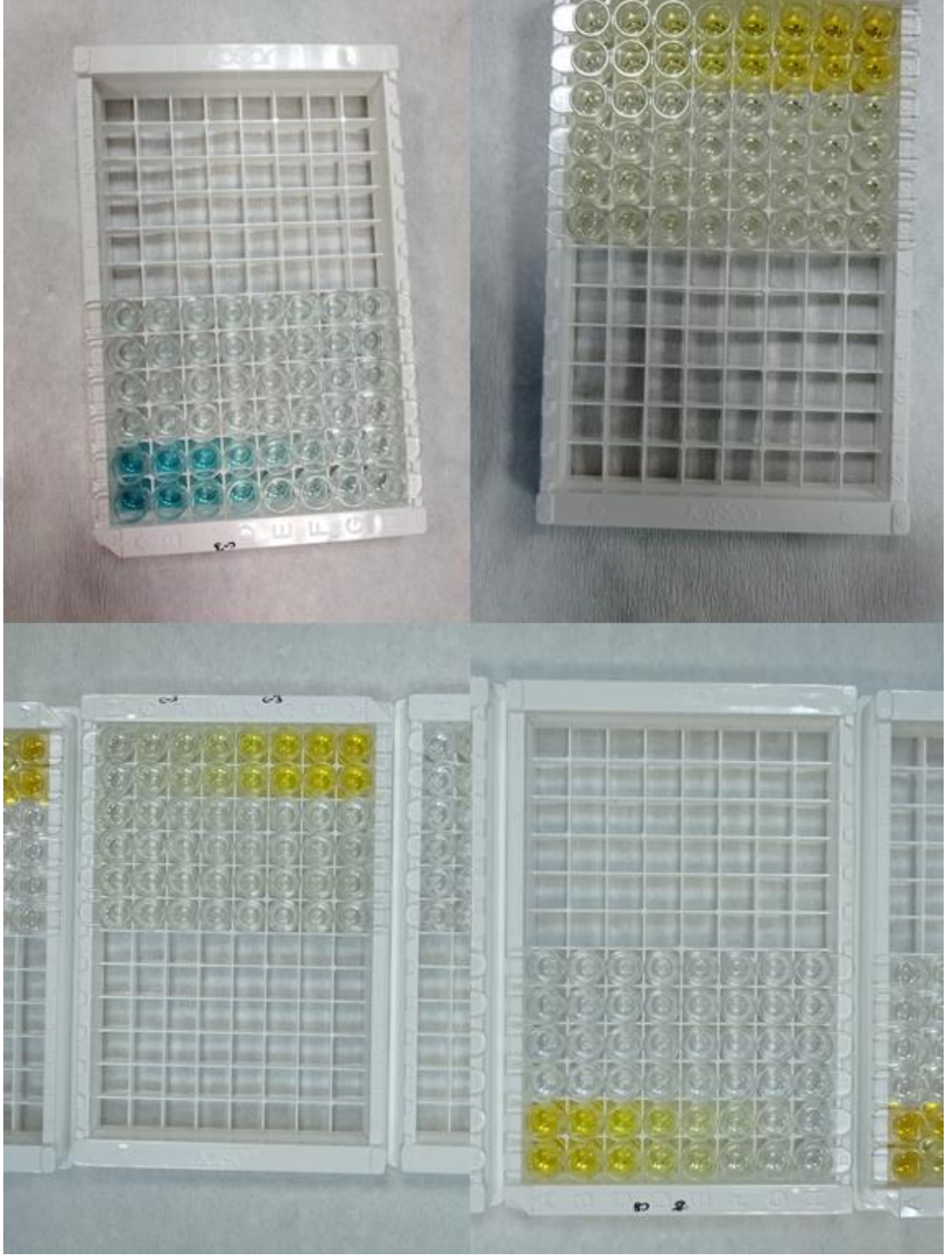
Şekil 3.11 Kaspaz-9 kiti için dilüe yöntemi.



**Şekil 3.12** Human CASP-9 (Elabsience marka, Katalog no: E-EL-H0663) ELISA kiti.

Biyotinileşmiş Tespit Antikoru vortexlendikten sonra 100× Yoğunlaştırılmış Biyotinileşmiş Tespit Antikorusunu Biyotinileşmiş Tespit Antikorusuna Dilüent ile 1× çalışma çözeltisine kadar seyreltilmiştir. HRP (Avidin-Horseradish Peroxidase) Konjugatı, HRP ile konjuge edilmiş avidindir. Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını vortexlemenin ardından 100× Yoğunlaştırılmış HRP Konjugatını HRP Konjugatı Dilüenti ile 1× çalışma çözeltisine kadar seyreltilmiştir.

ELISA kitlerinde dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı için kuyucuklar belirlendikten sonra her bir kuyucuk için 100 µL dilüe edilmiş standart, blank ve hücre vasatı kuyulara eklenmiştir. Kitle birlikte gelen kapakla plaka kapatılmıştır. 37°C'de 90 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Her kuyudan eklenen çözelti döküldükten sonra, yıkama yapılmadan her kuyuya 100 µL Biotinileşmiş Tespit Antikor çalışma çözeltisi eklemiş ve plakalar yeni bir kapakla kapatılıp 37°C'de 1 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyudan çözelti boşaltılmıştır. Herbir kuyuya 350 µL yıkama tamponu eklenerek. 1 dakika beklenmiş, ardından her bir kuyudan çözeltiyi dökülerek emici kâğıt üzerinde kurulanmıştır. Bu yıkama adımını 3 kez tekrar edilmiştir. Her kuyuya 100 µL HRP Konjugat çalışma çözeltisi eklenerek plakalar yeni bir kapakla 37°C'de 30 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Kuyulardan çözeltiyi dökülerek 5 kez yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Her kuyuya 90 µL Substrat Reaktifi eklenerek plaka yeni bir kapakla kapatılmış ve 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümü için mikropłaka okuyucuyu yaklaşık 15 dakika önceden ısıtılmıştır. Renk değişimi gözlenen mikropłakaların (Şekil 3.12) her kuyucuğuna 50 µL Durdurma Çözeltisi eklenerek 450 nm'de her bir kuyucuğun absobans değeri ölçülmüştür.



**Şekil 3.13** Renk değişimi gözlenen Human Casp-3, Human Casp-8, ve Human Casp-9 ELISA mikroplakaları.

### **3.2.7. Deneý sonuçlarının istatistiksel deęerlendirilmesi**

Deneýler sonucunda elde edilen veriler Microsoft Excel 2013 programına girilmesiyle birlikte alınan sonuçlar, GraphPad Prism 5 istatistik programına girilerek normal dağılım ve varyansların homojenliği testleri açısından değerlendirilmiştir.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmektedir.



#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

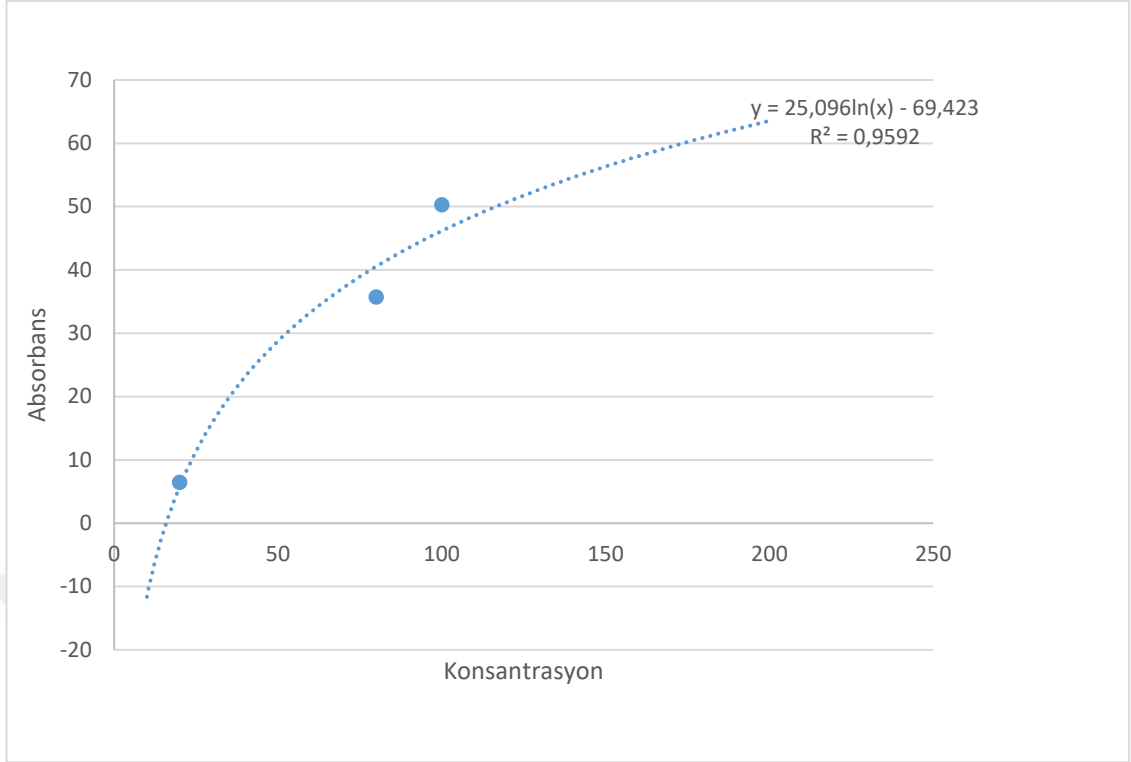
Günümüzde kanser için uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinin olumsuz yan etkileri istemeyen sonuçlar doğurduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya konmuştur. *Cannabis sativa* L. bitkisi geçmişten bugüne tıbbi alanlarda kullanılmasına rağmen son yarım yüzyılda adından sadece halüsinojenik olmasıyla bahsettirmiştir. Bitkinin iki ana kannaboidinden biri olan CBD'nin böyle bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Kanserli dokularda kannabinoid reseptörlerinin aktif olarak bulunduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Bifulco *et al.* 2008, Limonta *et al.* 2019).

Bu araştırmada CBD'nin hücrenin apoptoz yollarında görevli olan kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin aktivitesindeki değişime odaklanılmıştır. İlk olarak CBD'nin CaCo-2 hücre hattı üzerine sitotoksitesinin belirlenmesi ve IC<sub>50</sub> değerinin bulunması amacıyla MTT testi yapılmış. Çıkan sonuçlar neticesinde CBD ile muamele edilen CaCo-2 hücre hatlarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin aktiviteleri ELISA test kitleri kullanılarak belirlenmiştir.

##### 4.1 CBD'nin CaCo-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkileri

CaCo-2 hücre hatlarındaki CBD etkisini belirlemek amacıyla bir sitotoksite testi olan MTT testi uygulanmıştır. CaCo-2 hücrelerine test için farklı dozlarda CBD uygulanmıştır. 24 saat inkübe edilen hücreler 200 µM'dan başlanarak yarı dilüsyon oranında dilüsyon ile hazırlanmış olup 6 doz uygulanmıştır. Bu işlemler sonrasında MTT testi sonucuna göre CaCo-2 hücre hattının IC<sub>50</sub> değeri 115,271 µM olarak belirlenmiştir.

CaCo-2 hücrelerinde 24 saat boyunca CBD uygulamasından sonra elde edilen hücre canlılık grafiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1** Konsantrasyona bağlı hücre canlılık grafiği.

Nasrin *et al.* (2013), kanabidiol (CBD) ve aktif metaboliti 7-hidroksi-CBD'nin (7-OH-CBD) nikotin metabolizmasında meydana gelen potansiyel ilaç-ilaca etkileşimleri incelemiştir. Araştırmada CBD'nin sitokrom P450 aracılığı ile nikotin metabolizmasını inhibe ettiği gözlemlenmiştir. CBD bu inhibisyonu kotinin ve nornikotin, kotininin trans-3'-hidroksikotine dönüştürerek yaptığı anlaşılmıştır. CBD'nin IC<sub>50</sub> değeri CYP2A6 için  $0.27 \pm 0.060$ ,  $0.23 \pm 0.14$  ve  $0.21 \pm 0.14$   $\mu\text{M}$  olmakla birlikte, CYP2B6 için  $0.26 \pm 0.17$  ve  $0.029 \pm 0.0050$   $\mu\text{M}$  bulunmuştur(Nasrin *et al.* 2023). Isaev ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmada CBD'nin ana iyon akımları üzerindeki etkileri tavşanların ventriküler miyositlerinde patch-clamp tekniği kullanılarak araştırılmıştır. CBD'nin Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> kanallarını 5.4 ve 4.8  $\mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> ettiği bulunmuştur(Isaev *et al.* 2022). Surapaneni *et al.* (2022) tarafından yapılan bu çalışmada Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hatlarından MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları kullanılmıştır. CBD'nin bu hücre hatları üzerindeki IC<sub>50</sub> sırasıyla 3.22  $\mu\text{M}$  ve 3.31  $\mu\text{M}$  bulunmuştur(Surapaneni *et al.* 2022) Cerretani *et al.* (2020), HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada 24 saatlik CBD maruziyetinde kalan hücrelerin IC<sub>50</sub> değerlerinin 30.0  $\mu\text{M}$  olduğu tespit edilmiştir (Cerretani *et al.* 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen IC<sub>50</sub> değeri

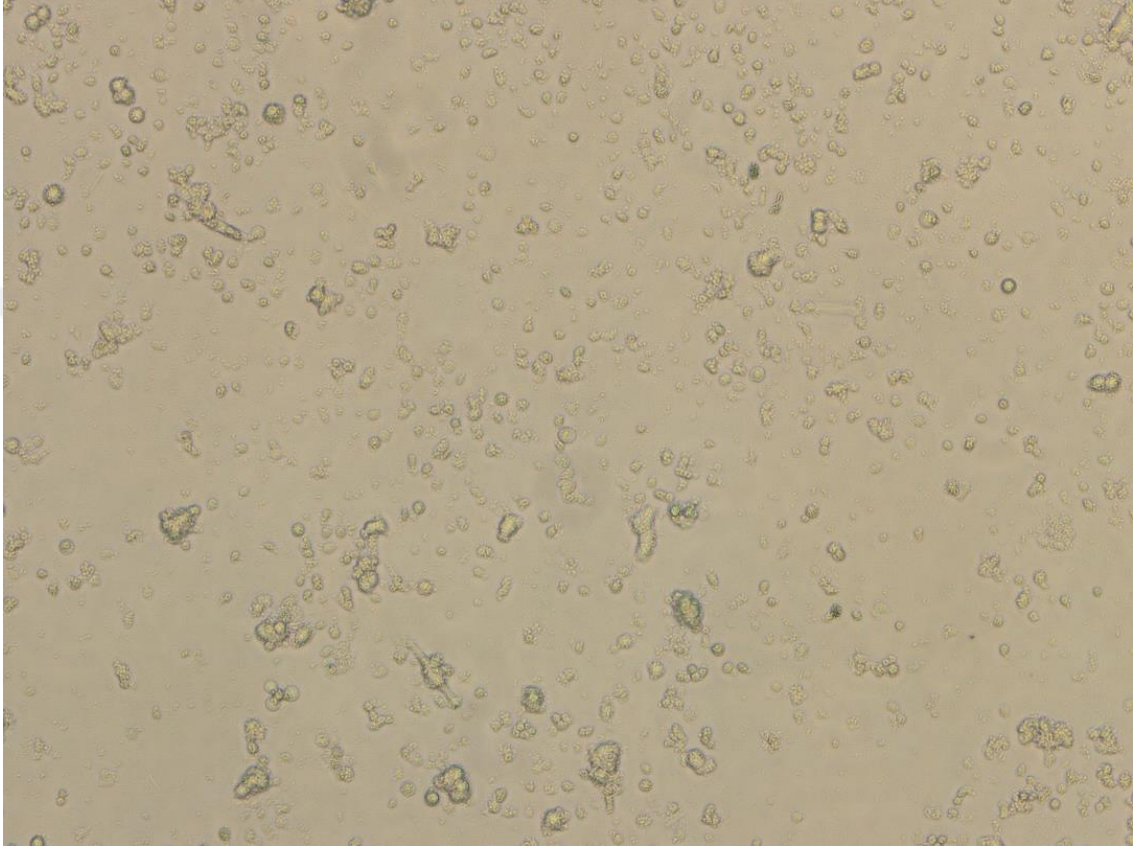
$\mu\text{M}$  seviyesinde literatür ile uyumlu olarak bulunmuşken konsantrasyon bakımından daha yüksek bulunmuştur. Carty *et al.* (2018) zebra balıklarıyla yaptığı çalışmada  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC) veya CBD'ye maruz kalan zebra balığı larvalarında ortaya çıkan morfolojik, davranışsal ve gen ekspresyonu fenotiplerini karşılaştırmasını hedeflemiştir. Bu deneyler sonunda CBD için  $\text{LC}_{50}$  değeri  $0,53\text{mg/L}$  olarak bulunmuştur (Carty *et al.* 2018). Pila *et al.* (2023) yılında yaptığı çalışmada *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı CBD'nin antibiyotik etkisini ve *Artemia salina* üzerindeki toksisite düzeyini değerlendirmek istenilmiştir. Bu çalışma sonucunda CBD'nin *Artemia salina* üzerinde  $\text{LD}_{50}$  değeri  $\%4,8$  olarak bulunmuştur (Pila, Segarra and Cerna 2023). Filipciuc *et al.* (2023) yılında yaptığı çalışmada ise  $15.6\%$  THC:  $<1\%$  CBD oranına sahip, EU-GMP sertifikalı *Cannabis sativa* L.'nin farelerde akut toksisitesini, OECD akut oral toksisite kılavuzları doğrultusunda değerlendirmek ve farmakokinetik profilini sunmayı hedeflemiştir. Bu çalışmada  $\text{LD}_{50}$  değeri farelerde oral  $5000\text{ mg/kg}$ 'nin üzerinde ve insan eşdeğer oral dozun  $\approx 806,45\text{ mg/kg}$  olduğunu belirlenmiştir (Filipciuc *et al.* 2023).

#### **4.2 CBD'nin CaCo-2 hücreleri üzerindeki Apoptotik etkisi**

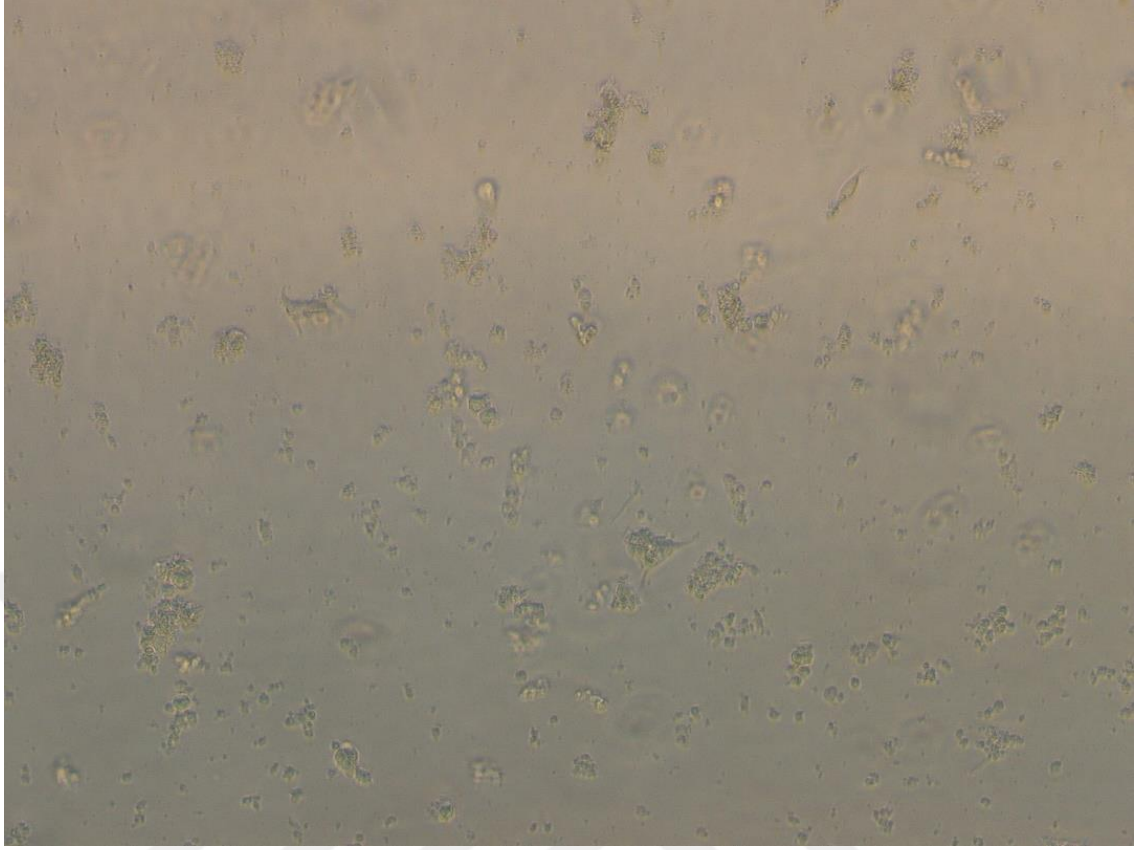
Hücrelerin kendi yaşam süreleri boyunca proliferasyon gerçekleştirir, diferansiyasyon yapar ve apoptoza uğrayıp hücre döngüsünü tamamlamaktadırlar. Bu durum bir denge halinde sürdürülür. Bahsedilen biyolojik süreç içinde apoptoz önemli bir yol oynamaktadır. Apoptozu düzenleyen sistein-proteaz grubu kaspazlar hücrede inaktif durumda prokaspaz formunda bulunurlar. Apoptoz normal hücre nekrozundan ayıran en önemli kriter nekrozun düzensizlik içermesi fakat apoptozun programlanmış olmasıdır. Apoptoz bu temel farklılık sebebiyle, mekanizması çeşitli biyokimyasal, immunohistokimyasal, immunolojik, morfolojik ve moleküler biyoloji yöntemleri ile gözlemlenebilmektedir.

Bu çalışmada immünolojik yöntem olan ELISA testi kullanılarak kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. CBD'nin CaCo-2 hücre hatları üzerindeki  $\text{IC}_{50}$  değerinin  $1/10$ 'luk ve  $1/100$ 'lük dozları uygulanmıştır. Bu dozlar  $1/10$  için  $1,153\ \mu\text{M}$  olup  $1/100$  içinse  $11,53\ \mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Araştırma 48'lik mikropalakaların 24

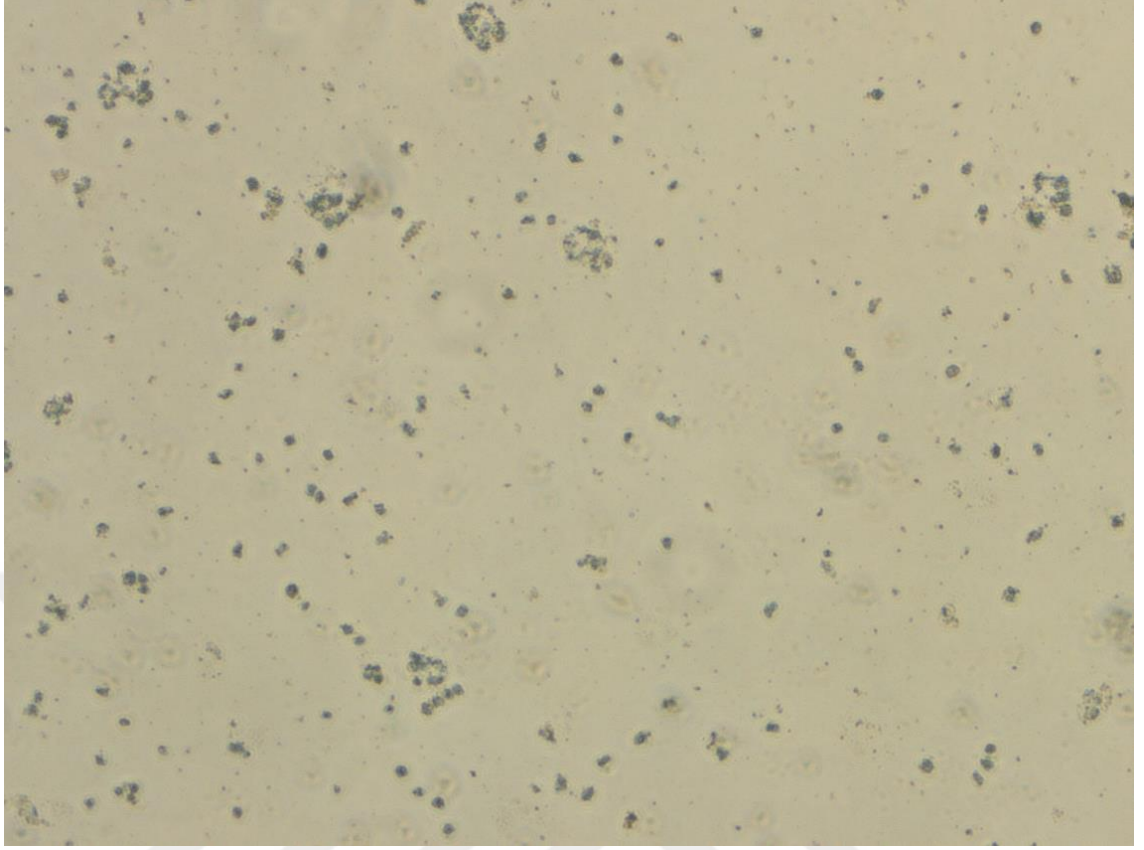
saat ve 48 saatlik inkübasyonlarından sonra ELISA testi, testin kullanım prosedürlerine bağlı kalınarak uygulanmıştır. Mikroplaka okuyucuda 480 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Bu test sonrasında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin ortamda CBD varlığında aktivitelerine bakılmıştır.



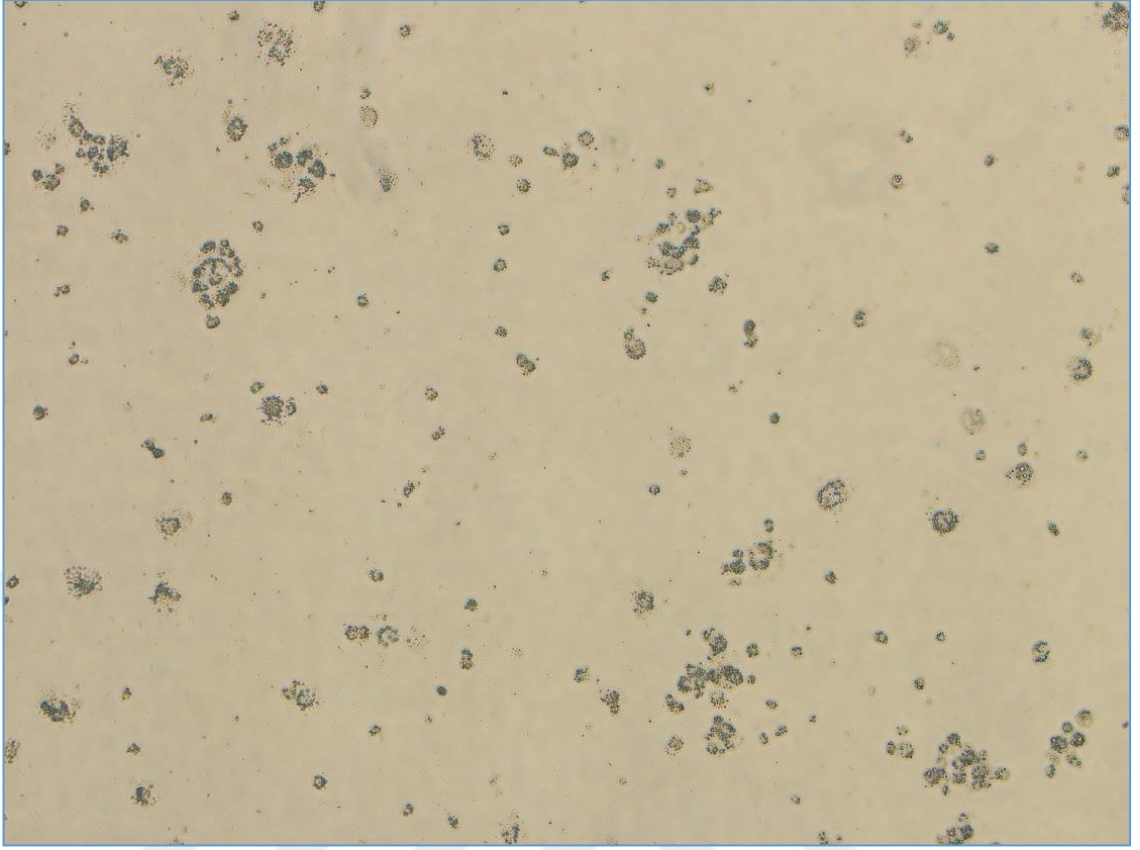
**Şekil 4.2** Kontrol grubu 24 saatlik Caco-2 hücreleri.



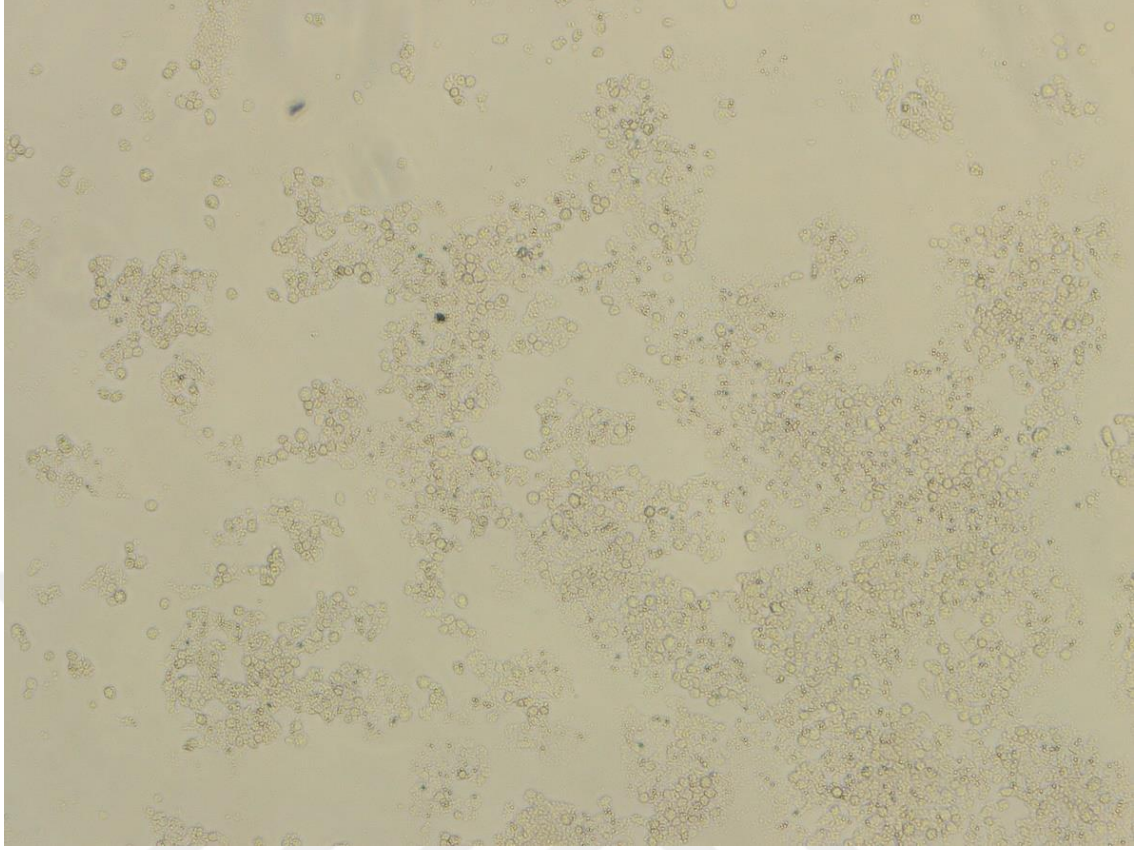
**Şekil 4.3** Kontrol grubu 48 saatlik Caco-2 hücreleri.



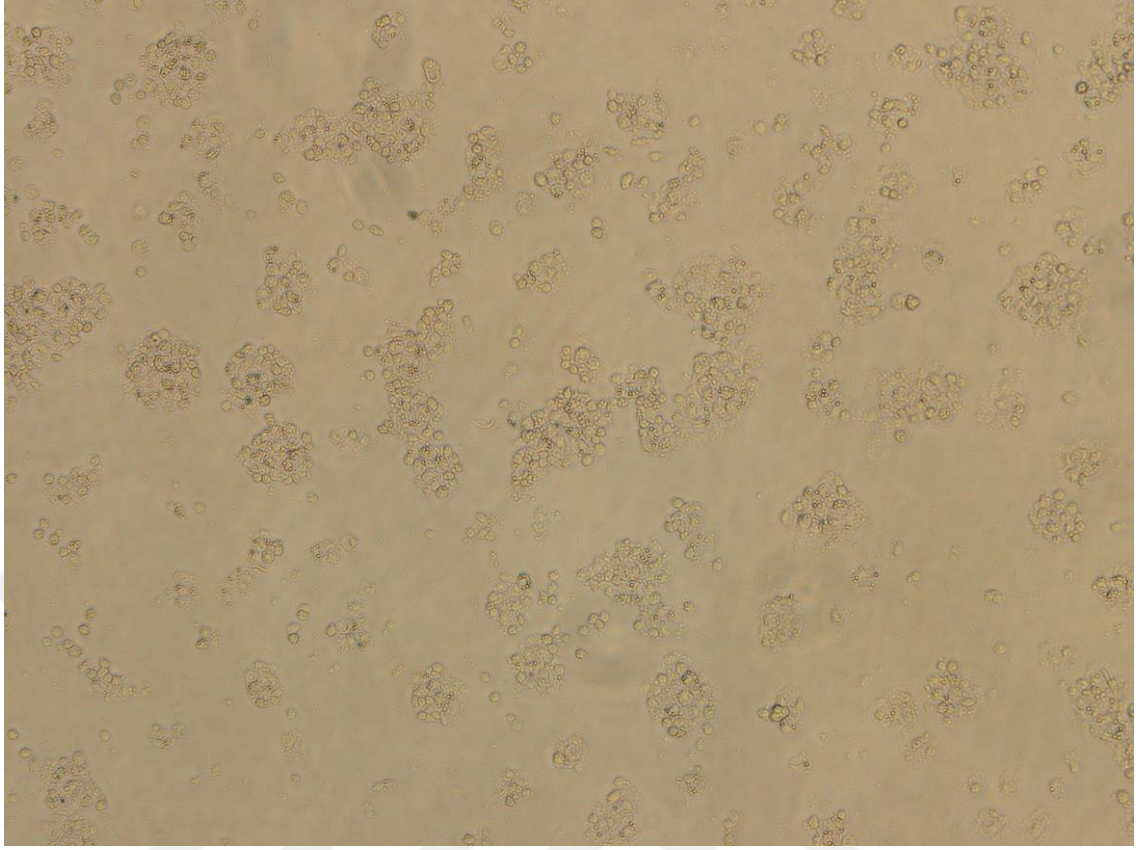
**Şekil 4.4** 1/10'luk CBD dozlanması 24 saat Caco-2 hücreleri.



**Şekil 4.5** 1/10'luk CBD dozlanması 48 saat Caco-2 hücreleri.



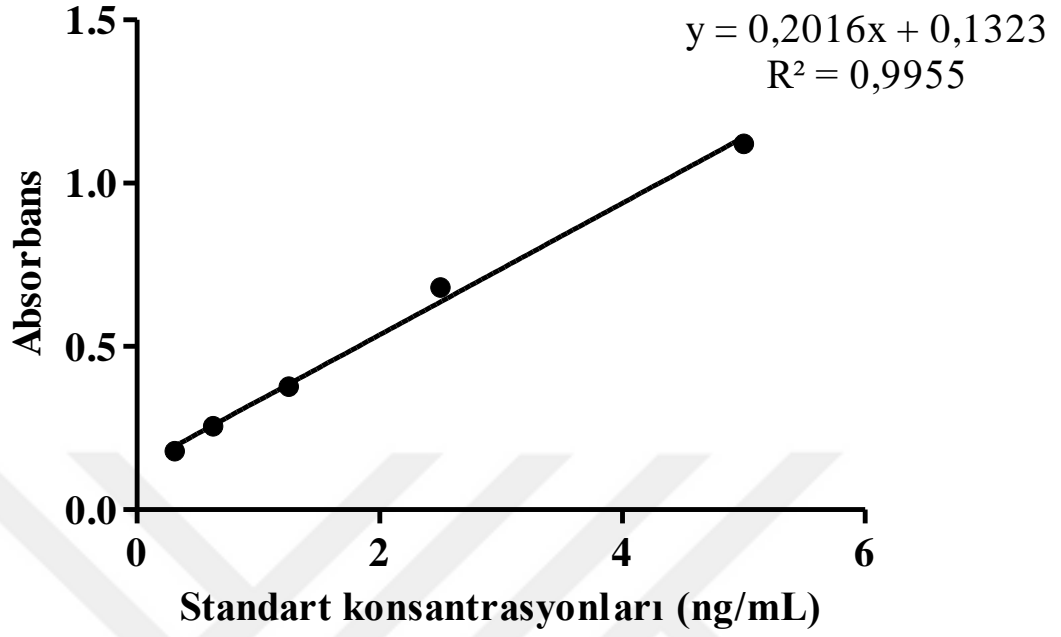
**Şekil 4.6** 1/100'luk CBD dozlanması 24 saat Caco-2 hücreleri.



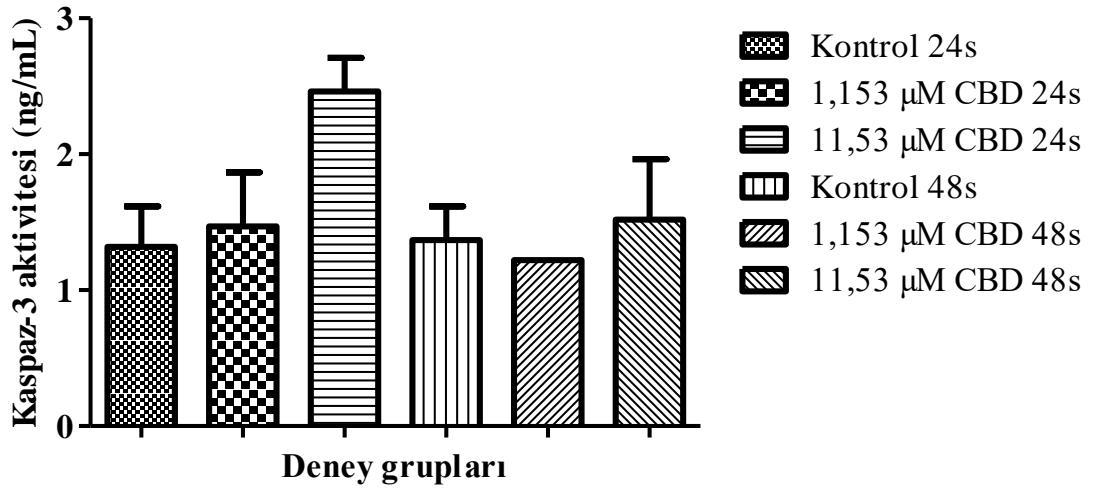
**Şekil 4.7** 1/100'luk CBD dozlanması 48 saat Caco-2 hücreleri.

Kaspaz-3 aktivitesi için kullanılan ELISA test kitinden elde edilen verilere bakıldığında: 24 saat boyunca CBD'nin 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik dozu varlığında kontrol grubuna göre kaspaz-3 miktarında artış ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik dozunda ise  $\text{IC}_{50}$  değerinin 1/10'luk değerine ve kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir ( $P>0.05$ ). Kaspaz-3 aktivitesinin 48 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik CBD maruziyetinde aynı şekilde artışı fakat 24 saat maruziyeti kadar etkili bir artış gözlemlenmemiştir.

### Kaspaz 3 standart grafiği



Şekil 4.8 Kaspaz-3 enzimin absorbans grafiği.

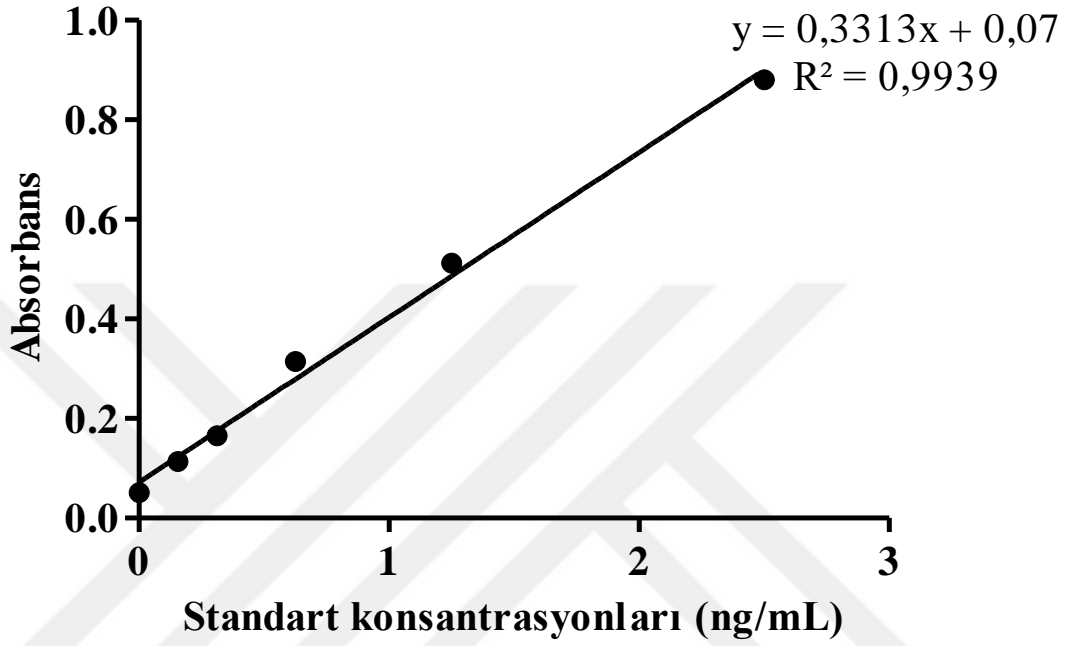


Şekil 4.9 Kaspaz -3'ün CBD varlığında aktivitesi.

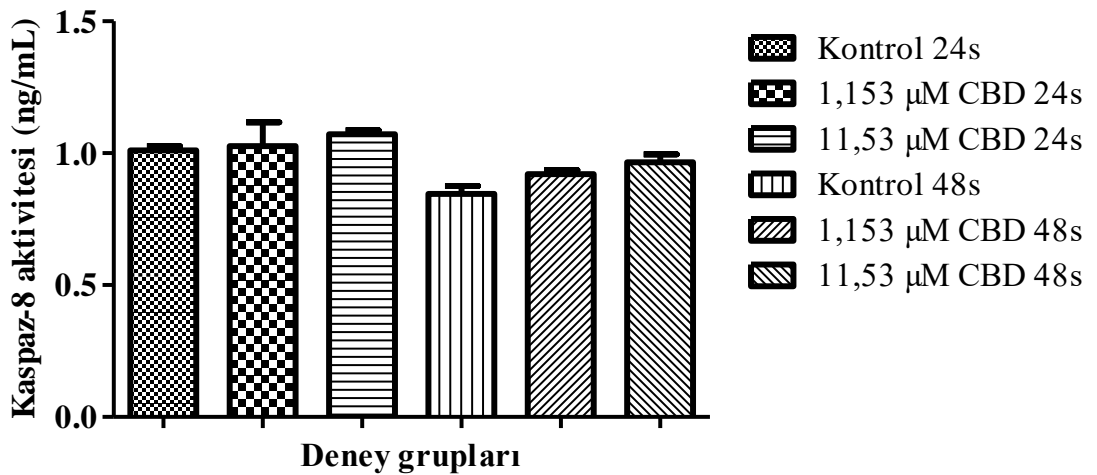
Kaspaz-8 aktivitesi için kullanılan ELISA test kitinden elde edilen verilere bakıldığında: 24 saat boyunca CBD'nin 1,153 µM'lik dozu varlığında kontrol grubuna göre kaspaz- 8 miktarında artış ve 11,53 µM'lik dozunda ise IC<sub>50</sub> değerinin 1/10'luk değerine ve kontrol

grubuna göre artış gözlemlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Kaspaz-8 aktivitesinin 48 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik CBD maruziyetinde ise anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir.

### Kaspaz 8 standart grafiği



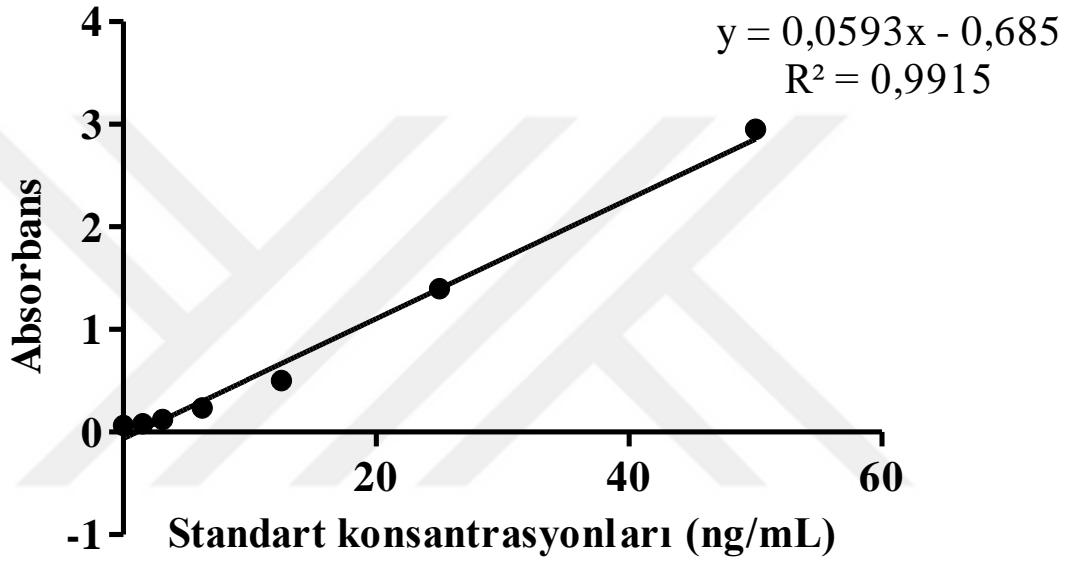
Şekil 4.10 Kaspaz-8 enzimin absorbans grafiği.



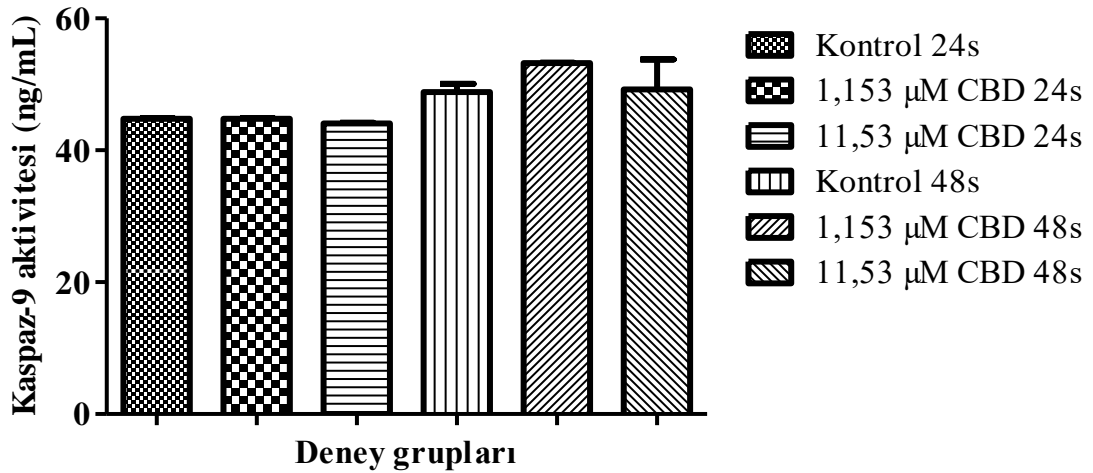
Şekil 4.11 Kaspas -8'in CBD varlığında aktivitesi.

Kaspaz-9 aktivitesi için kullanılan ELISA test kitinden elde edilen verilere bakıldığında: 24 saat boyunca CBD'nin 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik dozu varlığında kontrol grubuna göre kaspaz-9 miktarında artış ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik dozunda ise  $\text{IC}_{50}$  değerinin 1/10'luk değerine ve kontrol grubuna göre artış gözlemlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Kaspaz-8 aktivitesinin 48 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik CBD maruziyetinde ise anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir.

### Kaspaz 9 standart grafiği



Şekil 4.12 Kaspaz-9 enzimin absorbans grafiği.



Şekil 4.13 Kaspaz -9'un CBD varlığında aktivitesi.

CBD, *in vitro* glioma hücrelerinin apoptozunu ve *in vivo* olarak tümör gerilemesini indüklediğini gösterilmiştir. CBD'nin apoptotik etkisinde kaspaz aktivasyonunun ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) indüksiyonunun olası bir katılımını araştırılmıştır. CBD, apoptotik ölümün ortaya çıkmasından önce gelen kaspaz-3'ün kademeli, zamana bağlı bir aktivasyonunu üretti gözlemlenmiştir. CBD'ye maruz kalan, glioma hücrelerinde erken bir ROS üretimine sebep olup hücre içi glutatyonun tükenmesine bu süreçte glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesinin artmasına neden olduğu ortaya konmuştur (Bifulco *et al.* 2006).

CBD'nin insan eklem kondrositleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığı, Resazurin tahlilleri ile belirlenmiştir. Apoptoz, anneksin-V/7-aktinomisin D (7-AAD) boyaması ve ardından akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Kaspaz 3/7 aktivitesi, kaspaz analizleri ile ölçülerek hücre içi Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>] i), hızlandırılmış floresan görüntüleme yöntemi ile izlenmiştir. Hücre zarı potansiyelini ölçmek için Patch Clamp Yöntemi kullanılmıştır. Erk1/2 fosforilasyonu, western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Kondrosit hücre dizisi C28/I2 ve birincil kondrositler, 4 µM'den yüksek CBD konsantrasyonları ile tedaviden sonra azalmış bir canlılık göstererek bu apoptotik etkiye, kaspaz 3/7 aktivitesinde ve erken apoptotik hücre popülasyonunda bir artışın eşlik ettiği gözlemlenmiştir (Winklmayr *et al.* 2019).

Kannabidiol (CBD) ve Kannabidiol-dimetilheptil (CBD-DMH), HL-60 miyeloid lösemi hücre hattında apoptozu indüklemiştir. Apoptoz, bisBenzimid ve propidium iodide ile boyanarak belirlenmiş olup 24 saatlik bir tedaviden sonra 8 µg/ml CBD ve 15 µg/ml CBD-DMH ile sırasıyla %61 ve %43'e ulaşan doza bağlı apoptoz artışı kaydedilmiştir. Hücrelerin önceden γ-ışınlamasına (800 cGy) maruz kalması apoptozu belirgin şekilde arttırmış olup sırasıyla %93 ve %95 değerlerine ulaşmıştır. Normal bireylerden alınan insan monositleri, kanabinoidlere veya γ-ışınlamasına karşı dirençli olmasına rağmen. CBD tedavisinden sonra kaspaz-3 aktivasyonu gözlenmiştir. Bu artış apoptoz için bir mekanizmayı temsil edebileceği ortaya konmuştur (Gallily *et al.* 2003).

İnsan Göbek Damarı Endotel Hücreleri (HUVEC) ile yapılan deneylerde HUVEC'in 6 µM CBD ile inkübasyonu, artan metabolik aktivite ile sonuçlanmış olup, 10 µM CBD,

gelişmiş kaspaz-3 bölünmesi ile gösterildiği gibi, metabolik aktivitede azalmaya ve apoptoz indüksiyonuna neden oldu ortaya konulmuştur (Böckmann and Hinz 2020).

CBD etkilerinin T hücreleri üzerindeki potansiyel mekanizmalarını araştırmak için, CBD'nin primer lenfositler üzerindeki proapoptotik etkisini karakterize edilmiştir. Splenositlerin apoptozu, nükleer hipodiploidite ve DNA sarmal kırılmaları ile kanıtlandığı gibi, CBD'ye maruz kalmanın ardından zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde belirgin şekilde artmıştır. Splenositlerin CBD'ye maruz kalması, CBD tedavisinden 1 saat sonra en yüksek tepki ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) erken bir üretimini ortaya çıkartmıştır. ROS üretimine paralel olarak, CBD ile tedavi edilen splenositlerde hücrel glutatyon (GSH) içeriğinde kademeli bir azalma tespit edilmiştir. Hem CBD aracılı ROS üretimi hem de GSH azalması, bir tiyol antioksidan olan N-asetil-L-sistein (NAC) varlığıyla önemli ölçüde zayıflatılmış olup CBD tedavisi, NAC veya GSH varlığında iptal edilen kaspaz-8'in aktivasyonunu önemli ölçüde uyardığı gözlemlenmiştir. Splenositlerin kaspaz-8 için hücre geçirgen bir inhibitör ile ön tedavisi, konsantrasyona bağlı bir şekilde CBD aracılı apoptozu önemli ölçüde azalttı, ancak ROS üretimini azaltmadığı anlaşılmıştır. Toplu olarak, bu çalışma, CBD'nin primer lenfositlerdeki apoptotik etkisinin kaspaz-8'in oksidatif strese bağlı aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Wu *et al.* 2008).

CBD bazı kanser türleri de dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. CBD'nin sitotoksik aktivitesini ve bunun programlanmış hücre ölümü süreci üzerindeki etkisini değerlendirmiş olan bu çalışma: iki akciğer kanseri hücre dizisi, p53 ile ifade edilen A549 ve H1299-p53 negatif kullanılmıştır. Apoptozu, Annexin V tahlili ve Caspase 3/7 aktivasyonu ile izlemiştir. CBD tedavisinin, p53 pozitif A549 hücrelerinde doza bağlı apoptoz artışına yol açtığı bulunmuştur. P53 negatif H1299 hücrelerinde apoptoz seviyesi çok daha düşük olduğu bununla birlikte, H1299 hücrelerinde gözlenen artan nekrozdan dolayı toplam hücre canlılığı, iki hücre hattı için benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (Todorova *et al.* 2021).

Nöroblastom (nbl) ile yapılan deneylerde  $\Delta$  (9)-tetrahidrokanabinol (thc) ve kannabidiol (CBD) içindeki en aktif bileşiklerin anti-nbl etkisini *in vitro* ve *in vivo* olarak

araştırılmıştır. Bu bileşiklerin insan nbl SK-N-SH hücrelerinde canlılık, istilacılık, hücre döngüsü dağılımı ve programlanmış hücre ölümü üzerindeki etkilerini araştıran çalışmada: her iki bileşik de *in vitro* antitümörijenik aktiviteye sahip ve tümör ksenogreftlerinin *in vivo* büyümesini engellediği ortaya konmuştur. Test edilen iki kanabinoidten CBD daha aktif bulunmuştur. CBD ile tedavi, *in vitro* olarak tedavi edilen tümör hücrelerinin canlılığını ve invazivliğini azaltmış ve apoptozu indüklemiştir. Ayrıca CBD, tedavi edilen hücrelerde ve tümör ksenogreftlerinde aktive edilmiş kaspaz 3'te bir artış ortaya çıkarmıştır (Fisher *et al.* 2016).

CBD'nin kaspaz-3 aktivasyonunu artırması Bifulco ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışma bu tez sonucu ile örtüşmektedir. Hücrenin apoptoz sürecine girmesi olarak kabul edebileceğimiz bu durum CBD'nin ortamdaki varlığının Kaspaz-3'ün glioma hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü ROS yardımıyla gerçekleştirebileceğini ortaya koymuştur.

Winklmayr *et al.* (2019) yaptıkları bir çalışma ile CBD'nin insan eklem kondrositlerinin hücre canlılığını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu tez sonucu ile uyumlu olan bu durum kaspaz-3 mekanizmasına etki eden CBD'nin hücrelerin apoptotik nüfusunda artışa ilişkili olduğunun kanıtı niteliğindedir.

Kannabidiol ve Kannabidiol-dimetilheptil üzerinden gerçekleştirilen çalışmada: CBD ve lösemi hücreleriyle yapılan tedavide apoptoz artışının olduğu belirlenmiştir. Bu tez sonucu ile Gallily ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışma kaspaz-3 aktivitesinin benzerliği üzerinden paralellik bulunmaktadır. Kaspaz-3 ifadesinin hücre içerisindeki artışı CBD'nin apoptozu tetikleyebileceğini göstermektedir.

Böckmann ve Hinz'in (2020) yaptığı çalışmada kaspaz-3 ifadesindeki artışın CBD'nin varlığı ile doğrusal olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasındaki alınan sonuçlardan biri ile paralellik göstermektedir. Bu durum hücre içerisindeki CBD miktarına bağlı olarak apoptozun kaspaz-3 ifadesindeki artışla ilişkilendirilebilir.

Wu ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada kaspaz-8 ifadesinin artışı araştırmamızın sonuçlarından biri olan kaspaz-8 aktivasyonun artmaması ile zıtlık oluşturmaktadır. Kaspaz-8 apoptoz mekanizması kaspaz-3 apoptoz yolundan farklıdır. Kaspaz-8 hücrenin dışından gelen sinyal yollarıyla aktive olurken kaspaz-3 mitokondri hasarı ya da DNA hasarı gibi iç sinyaller yoluyla aktivasyonu tetiklenir. CBD'nin T hücrelerinde kaspaz-8 ifadesini artırması fakat CaCo-2 hücre hattında anlamlı bir değişikliğe sebep olamaması başka bir araştırmanın konusu olabilecek niteliğe sahiptir.

Todorova ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışmada A549 ve H1299-p53 negatif hücre hatlarında kaspaz-3 ifadesindeki artışla CBD'nin doza bağlı apoptozu indüklediği hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç araştırmamızla paralellik göstermektedir. Fisher ve arkadaşlarının (2016) yaptığı araştırmada CBD'nin tümör hücrelerinde apoptozu indüklemesi kaspaz-3 ifadesinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Bu durumda ortaya çıkan sonuç bu tez ile benzerlik göstermektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada CBD'nin CaCo-2 hücrelerinde 24 saatlik maruziyeti sonrası uygulanan 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik dozda belirgin bir şekilde kaspaz-3 üzerinden aktivasyonun kontrol grubuna karşı anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Diğer yandan 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik doz uygulaması kontrol grubuna göre kaspaz-3 ifadesini arttırdığı, fakat bu ifade artışının 1/100'lük doz uygulamasına kıyasla daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. 48 saatlik CBD ile maruziyet sonrası ise iki doz grubu içinde kaspaz-3 aktivitesinin azaldığı not edilmiştir. CaCo-2 hücre hattında CBD ile maruziyetlerinde Kaspaz-8 ve kaspaz-9 ifadelerinin 24 ve 48 saatlik iki periyotta kontrol grubuna kıyasla herhangi anlamı bir artışı olamamıştır.

Kaspaz-8 enzim aktivitesine bakıldığında ise 24 ve 48 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$  ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik dozlarda uygulanan CBD'nin: 24 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$ 'lik dozunda diğer uygulamalara karşı kontrol grubuna göre ifadesini arttırdığını gözlemlenmiştir. Bir diğer yandan bu artış kaspaz-3 enzimin artışına nazaran az kalmaktadır.

Kaspaz-9 enzim aktivitesinde ise 24 ve 48 saatlik 1,153  $\mu\text{M}$  ve 11,53  $\mu\text{M}$ 'lik CBD uygulamalarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artışın olmadığı anlaşılmıştır.

Bu tez araştırmasında efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 ifadesinin uygulanan dozla birlikte artması, CBD'nin apoptozu indükleyebileceği konusunda yeni verilerden birini oluşturmaktadır. *Cannabis Sativa* L bitkisinden sentezlenen CBD gerek bu çalışma gerekse diğer kanser araştırmalarında ortaya konan diğer veriler ile paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. Geleneksel tedavi yöntemlerinin eksik kaldığı noktalarda alternatif bir tedavi yöntemi olabilecek CBD dikkate değer bir sekonder metabolittir. CaCo-2 hücre hattıyla yapılan bu çalışma ve literatür bulgularıyla birlikte CBD maddesinin kanseri önlemede yardımcı bir rol üstlenebilecek madde olduğu ortaya çıkmıştır. CBD'nin EKS üzerindeki etkileri kanser tedavisinde umut verici başka bir yol olduğunu düşündürmektedir. Özellikle EKS'nin reseptör ve enzimleri üzerinden yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar CBD'nin önemli bir kanserojen olduğunun anlaşılmasının önünü açacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alaca, F. ve Arslan, N. 2012. Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi. Ziraat Mühendisliği.
- Baykara, O. 2016. Current Modalities in Treatment of Cancer. Balıkesir Health Sciences Journal, 5(3):154-65.
- Bifulco, M., Chiara L., Simona, P., and Patrizia, G. 2006. Cannabinoids and cancer: Pros and cons of an antitumour strategy. British Journal of Pharmacology, 148(2):123-35.
- Bifulco, M., A. Malfitano, and Chiara L. 2008. Endocannabinoids in endocrine and related tumours. Endocrine-Related Cancer, 15(2): 391-408.
- Böckmann, Sabine and Burkhard Hinz. 2020. Cannabidiol Promotes Endothelial Cell Survival by Heme Oxygenase-1-Mediated Autophagy. Cells, 9(7).
- Carty, Dennis R., Cammi., James H. Gledhill., and Kristine L; Willett. 2018. Developmental effects of cannabidiol and d9-tetrahydrocannabinol in zebrafish. Toxicological Sciences, 162(1): 137-45.
- Cascio, M., Marini, P. and Pertwee, R. G. 2017. The Pharmacology and Therapeutic Potential of Plant Cannabinoids. Cannabis sativa L. Botany and Biotechnology. Springer International Publishing. 17-207
- Cerretani, D., Giulia C., Antonella Brizzi, Anna I., Andrea M., Elena M., Laura M., and Lucia Micheli. 2020. Cytotoxic effects of cannabinoids on human ht-29 colorectal adenocarcinoma cells: Different mechanisms of THC, CBD, and CB83. International Journal of Molecular Sciences, 21(15): 1-15.
- Chanda, D., Dietbert N. and Jan F. C. Glatz. 2019. The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 140: 51-56.
- Choi, K., 2008. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean Panax ginseng C A Meyer. Acta Pharmacologica Sinica 29(9): 1109-18.
- Çefle, Kıvanç. 2003. P53 Tümör Süpresör Geni. İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası, 66(2):121-26.

- Dağdeviren, T. 2021. Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 13(3): 120-35.
- Dasram, Henna,, Roderick B., Walker and Sandile M., 2022. Recent Advances in Endocannabinoid System Targeting for Improved Specificity: Strategic Approaches to Targeted Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21).
- De Sousa E Melo, F., Kurtova, A. V., Harnoss, J. M., Kljavin, N., Hoeck, J. D., Hung, J., Anderson, J. E., Storm, E. E., Modrusan, Z., Koeppen, H., Dijkgraaf, G. J. P., Piskol, R. and De Sauvage, F. J. 2017. A distinct role for Lgr5 + stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*, 543 (7647), 676–680.
- Desai, G., Ghulam N. Qazi, K. Ganju, Mahmoud El-Tamer, Jaswant Singh, Ajit K. Saxena, Yashbir S. Bedi, Subhash C. Taneja and Hari K. Bhat. 2008. *Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention*. 9(7):581-91
- De Sousa E Melo, Felipe, Antonina V. , Jonathan M., Noelyn Kljavin, Joerg D. Hoeck, Jeffrey Hung, Jeffrey Eastham Anderson, Elaine E. Storm, Zora Modrusan, Hartmut Koeppen, Gerrit J. P. Dijkgraaf, Robert Piskol and Frederic J. De Sauvage. 2017. A distinct role for Lgr5 + stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*, 543(7647): 676-80.
- Ekinci, Y. 2016. Kanser Hastalarında Yorgunluğu Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Programı Yüksek Lisans Tezi. Ankara
- Faydaoğlu E. ve Metin Saip Sürücüoğlu. 2011. Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. 11(1):52-67
- Filipiuc, L., Elena, Raluca Ş., Carmen S., Mitică C., Andrei S., Dana C., Gabriela Dumitrita S., Ioana C., Cătălin C., Daniela C., Roxana E., Andrei D., Silviu F., and Veronica B., 2023. Acute Toxicity and Pharmacokinetic Profile of an EU-GMP-Certified Cannabis sativa L. in Rodents. *Pharmaceuticals*, 16(5).
- Fisher, T., H. Golan, G. Schiby, S. Prichen, R. Smoum, I. Moshe, N. Peshes-Yaloz, A. Castiel, D. Waldman, R. Gallily, R. Mechoulam and A. Toren. 2016. In vitro and in vivo efficacy of non-psychoactive cannabidiol in neuroblastoma. *Current Oncology*, 23: S15-22.
- Gallily, R., Tal E., Galia K., Dan L., Arie D., and Raphael M. 2003.  $\gamma$ -Irradiation enhances apoptosis induced by cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid, in cultured HL-60 myeloblastic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma*, 44(10): 1767-73.

- Göktaş, Ö. ve Betül G. 2019. Derleme Makalesi Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *Bayburt*. 2(1): 145-151
- Guégan, J. and Patrick L. 2018. Nonapoptotic functions of Fas/CD95 in the immune response. *FEBS Journal* 285(5): 809-27. doi: 10.1111/FEBS.14292.
- Guzmán, M., M. J. Duarte, C. Blázquez, J. Ravina, M. C. Rosa, I. Galve-Roperh, C. Sánchez, G. Velasco, ve L. González-Feria. 2006. A pilot clinical study of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer*, 95(2): 197-203.
- Gülfidan, C. ve Hülya Ö. 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. C. 20.
- Happyana, Nizar, Sara Agnolet, Remco Muntendam, Annie Van Dam, Bernd Schneider, and Oliver Kayser. 2013. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87: 51-59.
- Hodgkinson, N, Cherie A. and Heidi A. 2017. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. *Tumor Biology*, 39(10): 1-17.
- Howlett, A. and Mary E. 2017. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. Ss. 169-206 içinde *Advances in Pharmacology*. C. 80. Academic Press Inc.
- Isaev, D., Waheed S., Ege Y. Dinc, Dietrich E. Lorke, Georg P., and Murat O. 2022. Cannabidiol Inhibits Multiple Ion Channels in Rabbit Ventricular Cardiomyocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 13.
- Jerry M, and Suzanne C. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26(1): 61-66.
- Jiang, R., Satoshi Yamaori, Y., Ikuo Y. and Kazuhito W. 2013. Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(4): 332-38.
- Kam, P. and N. I. Ferch. 2000. Apoptosis: Mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 55: 1081-93.
- Keum, Na and Edward G. 2019. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews. Gastroenterology and hepatology*, 16(12):713-32.

- Kisková, T., Felicitas M., Mária S., Walter J. and Theresia T. 2019. Future aspects for cannabinoids in breast cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7).
- Koçak, N. 2011. Cellular functions of p53 and p53 gene family members p63 and p73. *Dicle Medical Journal / Dicle tıp Dergisi*, 38(4): 530-35.
- Lauckner, J E., Bertil H. and Ken M. 2005. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB 1 receptor coupling to G q/11 G proteins. *27:102(52): 19144-9*
- Ligresti, A.i, Aniello M., Katarzyna S., Isabel M., Simona P., Luciano D., Chiara L., Giuseppe P., Maurizio B. and Vincenzo D. 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3): 1375-87.
- Limonta, P., Roberta M., Moretti, M., Marzagalli, F., Michela R, and Marina M. 2019. Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4).
- Lu, D., Sri S., Zhixing W. and Debra A. 2019. Translational potential of allosteric modulators targeting the cannabinoid CB 1 receptor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3): 324-35.
- Malki, A., Rasha A., Ishita G., Asma A., Semir V. and Ala E. 2020. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 130 22(1): 130.
- Massi, Paola, Angelo Vaccani, Stefania Ceruti, Arianna Colombo, Maria P. Abbraccio and Daniela Parolaro. 2004. Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3): 838.
- McAllister, S., Rigel T., Maxx P., Amaia G. and Pierre Yves D. 2007. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(11): 2921-27.
- McAllister, Sean D., Ryuichi M., Rigel T., Darryl L., Anne J. Zielinski, Juanita A., Carolina A., Arash P., Jasmine L., Chandani L., Yong L., Robert J. Debs, Dan H. Moore and Pierre Y. 2011. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the

- reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(1):37-47.
- McIlwain, R., Thorsten B. and Tak W. Mak. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4): 1-28.
- Mechoulam, R., Maximilian P., Eric M. and Lumír O. Hanuš. 2007. REVIEW Cannabidiol-Recent Advances. 4(8): 1678-92
- Murase, R., Rumi K., Eric S., Arash P., Pranamee S., Jonathon J., Eiman E., Sonali D.,. 2014. Targeting multiple cannabinoid anti-tumour pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. *British Journal of Pharmacology*, 171(19): 4464-77.
- Nasrin, S., Shelby C., Ketu B., Christy W., Joshua E. Muscat and Philip Lazarus. 2023. Inhibition of Nicotine Metabolism by Cannabidiol (CBD) and 7-Hydroxycannabidiol (7-OH-CBD). *Cite This: Chem. Res. Toxicol*, 36:177-87.
- Nassar, Dany and Cédric Blanpain. 2016. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11:47-76.
- Nguyen, Ha Thi and Hong Quan Duong. 2018. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncology Letters*, 16(1):9.
- Oltval, N., Curt L. Milliman and Stanley J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4): 609-19.
- Peter, M. E. and P. H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*, 10(1):26-35.
- Pettit, R., Rui Tan, Yoshitatsu I., Michael D. Williams, Dennis L. Doubek, Larry P. Tackett, Jean M. Schmidt, Ronald L. Cerny, Michael R. Boyd and John N. A. Hooper. 1995. Antineoplastic Agents, 325.1 Isolation and Structure Of The Human Cancer Cell Growth Inhibitory Cyclic Octapeptides Phakellistatin 10 and 11 From *Phakellia Sp.* 58(6): 961-5.
- Pila, G., Danny S. and Marco C. 2023. Antibacterial effect of Cannabidiol oil against *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and level of toxicity against *Artemia salina*. *Bionatura*, 8(1).

- Piomelli, D. 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(11): 873-84.
- Ramakrishna, A. and Gokare A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11):1720-31.
- Rehfeld, A., Malin N. and Kirstine K. 2017. *Compendium of Histology A Theoretical and Practical Guide*.
- Roland, Alexandre B., Ana ., Damien C., Benjamin M. Jordan,. 2014. Cannabinoid-induced actomyosin contractility shapes neuronal morphology and growth.
- Sabapathy, K. and David P. Lane. 2019. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *Journal of Molecular Cell Biology* 11(4): 317-29.
- Safe, S., Sandeep S., Sonia J., Indira Jutooru, Gayathri Chadalapaka and Stephen H. Safe. 2011. Induction of Apoptosis by Cannabinoids in Prostate and Colon Cancer Cells Is Phosphatase Dependent.
- Saroz, Y., Dan T. Kho, M., Glass and Natasha G. 2019. Cannabinoid Receptor 2 (CB2) Signals via G-alpha-s and Induces IL-6 and IL-10 Cytokine Secretion in Human Primary L., *ACS Pharmacology and Translational Science*, 2(6):414-28.
- Scott, Katherine A., Angus G. Dalgleish and Wai M. Liu. 2014. The combination of cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol enhances the anticancer effects of radiation in an orthotopic murine glioma model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(12): 2955-67.
- Shigekazu, N. 1997. Apoptosis by Death Factor Review. *Cell* 88:355-65.
- Spierings, Diana C., Elisabeth G. De Vries, Edo V., Harry H. and Steven De Jong. 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(6): 821-31.
- Surapaneni, S., Kumar, N., Patel, Li Sun, and Mandip S. 2022. Anticancer and chemosensitization effects of cannabidiol in 2D and 3D cultures of TNBC: involvement of GADD45 $\alpha$ , integrin- $\alpha$ 5, - $\beta$ 5, - $\beta$ 1, and autophagy. *Drug Delivery and Translational Research*, 12(11): 2762-77.
- Şık, E. 2014. Kolorektal Kanserele Epigenetik Yaklaşım; Apc Tümör Supresör Gen Fonksiyon Analizleri. Çanakkale.
- Taylor, H., Daniel T., Thangesweran A., Justin C. Konje and Mauro M. 2021. (Endo)cannabinoids and gynaecological cancers. *Cancers*, 13(1): 1-22.

- Teoh, E. 2016. Secondary Metabolites of Plants. Medicinal Orchids of Asia. Springer International Publishing. 59-73
- Thomas, A., G. L. Baillie, A. M. Phillips, R. K. Razdan, R. A. Ross and R. G. Pertwee. 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 150(5): 613-23.
- Tiring, G., Serdar Satar ve Okan Özkaya. 2020. Sekonder Metabolitler. 35(1), s. 203-215
- Todorova, J., Lazar I. L., Maria P., Alexander T. and Iva U. 2021. The antitumor activity of cannabidiol on lung cancer cell lines A549 and H1299: the role of apoptosis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 35(1): 873-79.
- Tokur, O. ve Abdurrahman A. 2017. *In Vitro* Sitotoksosite Testleri. Harran Üniv Vet Fak Dergisi, 6: 112-18.
- Top, R., Yavuz E., ve Suat T.. 2019. Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan ve antikanser etkilerinin araştırılması, C. 8.
- Triantafyllidis, JK, G. Nasioulas and PA Kosmidis. 2009. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer Res.*, 29(7).
- Velasco, G., Cristina S. and Manuel G. 2012. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer* 12(6): 436-44.
- Vousden, H., and Xin Lu. 2002. Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8): 594-604.
- Wei SC, Lin YS, Tsao PN, Wu-Tsai JJ, Wu CH and Wong JM. 2004. Comparison of the anti-proliferation and apoptosis-induction activities of sulindac, celecoxib, curcumin, and nifedipine in mismatch repair-deficient cell lines. *Formos Med Assoc.*, 8(103): 599-606.
- Wess, J. 1997. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *The FASEB Journal*, 11(5):346-54.
- Wettschureck, N. and Stefan O. 2005. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions.
- Winklmayr, M., Martin G., Michael K., Julia F., Markus Ritter and Martin Jakab. 2019. Dose-Dependent Cannabidiol-Induced Elevation of Intracellular Calcium and

Apoptosis in Human Articular Chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(12) :2540-49.

Wu, H., Rea M., Chia Chi Wang, Chi Y., Shu H. and Tong R. 2008. Cannabidiol-induced apoptosis in primary lymphocytes is associated with oxidative stress-dependent activation of caspase-8. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226(3): 260-70.

Ye, L., Zheng C., Weiwei W. and Naiming Z. 2019. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Current Molecular Pharmacology*, 12(3):239-48.

Yokus, Beran ve Dilek Ülker Çakır. 2012. *Kanser Biyokimyası*. C. 2012.

Yurdakok, B., Koray T., Mehmet T., Ali D. ve Ayhan F. 2016. In Vitro Toxicity of Some Pesticides on Goat and Dog Spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Ali Fatih Yıldırac

E-posta :

### Eğitim

Yüksek Lisans : 2021-2023. Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji/Hücre Biyolojisi, Çankırı, Türkiye

Yüksek Lisans :2015-2020. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Biyolojisi/Bitki Ekolojisi

Lisans :2008-2014. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Ön Lisans :2021-Devam ediyor. Anadolu Üniversitesi, Coğrafi Bilgi Sistemleri

### Çalıştığı Kurumlar

2022-2023. Anatolian Nature and Culture Conservation Cooperative

İş Tecrübesi: Biyolojik Çeşitliliğe Dayalı Geleneksel Bilginin Kayıt Altına Alınması Projesi Yozgat ve Niğde İlleri. Botanik Araştırmacı

2020-2020. Alka Çevre Laboratuvarları, Biyolog

İş Tecrübesi: Antalya ve Batı Karadeniz Havzaları Biyolojik İzleme Projesi- Makrofit-Uzman Yardımcısı.

06/2020 – 09/2020. Proden Çevre Mühendislik Anonim Şirketi, Biyolog

İş Tecrübesi: Biyolog, Alan Şefi

Göksu Özel Çevre Koruma Bölgesi Tür ve Habitat İzleme Projesi Kapsamında Göksu Kumsal Alanında Deniz Kaplumbağaları (Caretta Caretta, Chelonia Mydas) ve Nil Kaplumbağası (Trionyx Triunguis) Popülasyonlarının Araştırılması İzlenmesi ve Korunması Projesi.

2016 – 2018. Aecom TurkeyBiyolog

İş Tecrübesi: Biyolog, Alan Şefi

2016-2017-2018 Yılları, Enerjisa Kavşakbendi-Köprü-Menge HES Balık Yakalama-Taşıma Projesi

2015 – 2016. Turunç Peyzaj Ltd. Şti

İş Tecrübesi: Biyolog

Ankara-Çankırı-Kırıkkale-Kastamonu-Çorum-Bolu-Zonguldak ve Bartın İlleri

Doğal Sit Alanlarının Ekolojik Temelli Bilimsel Araştırma Projesi

Antalya-Burdur-Isparta İlleri Doğal Sit Alanlarının Ekolojik Temelli Bilimsel Araştırma Projesi

Trabzon İli'nin Karasal (Orman. Bozkır. Alpın-Subalpın. Maki. Pseudomaki, Kumul, Su Kenarı. Tarım. Yerleşim vd.) ve İç Su (Akarsu. Göl vd.) Ekosistemlerinin Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzlenmesi Projesi

Tunceli. İli'nin Karasal ve İç Su Ekosistemlerinin Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzlenmesi Projesi

Sinop İli'nin Karasal ve İç Su Ekosistemleri Biyolojik Çeşitlilik Envanter ve İzleme İş Projesi

Sivas İli Tüm Yüzölçüm Alanı İçin Karasal ve İç Su Ekosistemleri Biyolojik Çeşitlilik Envanteri ve İzleme Projesi.

Foça Özel Çevre Koruma Bölgesi Yönetim Planı Hazırlama ve Uygulama Projesi  
Artvin ili Hopa Engereği (*Vipera kaznakovi*) Tür Eylem Planı  
Manisa Lalesi (*Tulipa orphaneidea*) Tür Eylem Planı

### **Akademik Aktiviteler**

06/2012 – 12/2012 Demokrasi için İnsan ve Doğa, Ulusal Ajans-Avrupa Birliği  
Bakanlığı. Avrupa Birliği Projesi

Proje Danışmanı-Yürütücü Proje Asistanlığı  
Ankara/Türkiye, Palermo/İtalya

2023. Çankırı Üniversitesi BAP Projesi. Kannabidiolün (Cbd) Caco-2 Hücre Hattına  
Etkilerinin Araştırılması

2023 Gazi Üniversitesi Bap Projesi. Tetrametrinin Omurgasız Sucul Model Organizma  
Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

09/2021 6.International Congress on Veterinary and Animal Sciences (ICVAS)  
Total Hemocyte Counts of Freshwater Mussel *Unio delicatus* Lea 1863 After  
Exposure to Piperonyl Butoxide

08/2021 9. Ulusal Limnoloji Sempozyumu  
Tiametoksamın *Unio delicatus* (Lea, 1863) Üzerindeki Akut Toksik Etkisinin  
Araştırılması Sözlü sunum

11/2019 Ankara İli Dişli Çakşır (*Prangos denticulata*) Tür Eylem Planı (2020 – 2024)

11/2019 Ankara İli Koca Soda (*Salsola grandis*) Tür Eylem Planı (2020 – 2024)

06/2018 1st Gypsum Ecosystem Research Conference (Horizon 2020). European Union

Katılımcı-Görevli

06/2017 Ankara Üniversitesi 5. Çevre Günleri Uluslararası Sempozyumu Sera gazı Emisyon Değerlerinin Sektörel Dağılım Oranları (1990-2015) Davetli Konuşmacı

11/2017 İklim Değişikliği ile Mücadele Bağlamında Türkiye'de Tarım ve Gıda Güvenliği Çalışmayı Katılımcı-Görevli

11/2019 Ankara Üniversitesi BAP Projesi. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum'undaki (Ank) *Astragalus (Fabaceae)* Cinsinin Revizyonu ve Veri tabanı Yönetim Sisteminin Hazırlanması

2011. EKAD (Ekolojik Araştırmalar Derneği) Deniz Kaplumbağası Koruma ve Araştırma Çalışmaları

### **Sertifikalar ve Kurslar**

2021. PCR Laboratuvar Eğitimi Sertifikası. Red Cell Biotechnology

2022. Hücre Ölümü Araştırma Derneği tarafından 17-19 Mart 2022 tarihlerinde Çevrim içi gerçekleştirilmiş olan 4. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Derneği Kongresi kapsamında düzenlenmiş LC – MS/MS PROTEOMİKS Kursu