



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HÜMİK ASİDİN İNSAN SERVİKS KANSERİ ÜZERİNE ANTİKANSEROJENİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE DEMİR AKTAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

İSTANBUL – 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HÜMİK ASİDİN İNSAN SERVİKS KANSERİ ÜZERİNE
ANTİKANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE DEMİR AKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

İSTANBUL – 2019

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (Ecz)
Tez Sahibi : Ayşe DEMİR AKTAŞ
Tez Başlığı : Hüyük asidin insan serviks kanseri üzerine antikanserojenik etkisinin araştırılması
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Haydarpaşa Kampüsü
Sınav Tarihi : 18.04.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Doç. Dr. Derya ÖZSAVCI

Doç. Dr. Engin KAPTAN

Kurumu

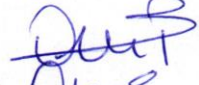
Marmara Ün.

Marmara Ün.

Marmara Ün.

İstanbul Ün.

İmza




Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun .0.6. Mayıs./2019.. tarih ve 25 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

18/03/2019

Ayşe DEMİR AKTAŞ

I. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm, tecrübeleri ile bana ışık tutan, çalışmalarımı titizlik ve özenle yönlendiren danışmanım Sayın Doç. Dr. *Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR*'a en içten teşekkürü borç bilir, en derin saygılarımı sunarım.

Eğitim dönemimdeki katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. *Fikriye URAS* başta olmak üzere; Sayın Prof. Dr. *Ayşen YARAT*, Prof. Dr. *Kadir TURAN*, Prof. Dr. *Azize ŞENER*, Prof. Dr. *Şermin TETİK*, Doç. Dr. *Derya ÖZSAVCI*, Yrd. Doç. Dr. *Bahar GÖKER*, Yrd. Doç. Dr. *Rabia OBA*, Yrd. Doç. Dr. *Halil AKSOY*, Arş. Gör. *Turgut ŞEKERLER*'e, teşekkür ederim.

Son olarak; eğitimim boyunca desteklerini her zaman arkamda hissettiğim sevgili eşim *Fatih AKTAŞ* ve oğlum *Ömer Mirza AKTAŞ* başta olmak üzere tüm aileme şükranlarımı sunarken, bu çalışmanın konu ile ilgili olarak yapılacak olan yeni çalışmalara yararlı olmasını dilerim.

Ayşe DEMİR AKTAŞ

Bu tez, TÜBİTAK 2210/C Yüksek Lisans Öncelikli Alanlar Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Kuruma desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	İ
II. İÇİNDEKİLER	İİ
III. KISALTMALAR.....	V
IV. ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
V. TABLOLAR VE RESİM LİSTESİ	VIII
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Kanser.....	5
4.1.1. Normal hücrelerde hücre siklusu	8
4.1.2. Kanser etiyojisi.....	15
4.1.3. Kanserin belirtileri ve bulguları	18
4.1.4. Dünyada ve Türkiye’de kanser	19
4.2. Hümik Maddeler	21
4.2.1. Hümik maddelerin oluşumu ve kaynakları.....	23
4.2.2. Hümik asit karakterizasyonu.....	24
4.2.2. Hümik asit saflaştırma yöntemleri	26
4.2.3. Hümik asit ve türevlerinin kullanım alanları	28
4.3. Serviks Kanseri	29

4.3.1. Serviks ve anatomik yerleşimi	29
4.3.2. Serviks kanserinin belirtileri	32
4.3.3. Serviks kanseri için risk faktörleri	32
4.3.4. Serviks kanseri tanı yöntemleri.....	32
4.3.5. Dünya’da ve Türkiye’de serviks kanseri	33
4.4. HPLC Çalışma Prensibi.....	37
5. MATERYAL VE METOT	39
5.1. Kullanılan Cihazlar.....	39
5.2. Kullanılan Kimyasallar.....	40
5.3. HA Karakterizasyonu	41
5.3.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	41
5.3.2. Karıştırma süresinin belirlenmesi.....	41
5.3.3. HA standart grafiğinin oluşturulması	41
5.4. Toprakta HA İzolasyonu	43
5.5. Çözeltilerin Hazırlanması	47
5.6. İzole edilen HA’nın Antikanserojenik Etkilerinin Belirlenmesi	47
5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	48
5.7.1. Hücrelerin çözülmesi	48
5.7.2. Hücrelerin pasajlanması.....	49
5.7.3. Hücre sayısının hesaplanması	49
5.7.4. MTT metodu ile antikanserojenik aktivitenin belirlenmesi.....	49
5.7.5. Gerçek zamanlı hücre ölçer sistemiyle hücre indeksinin belirlenmesi	51
5.7.6. Apoptoz deneyleri	51
5.7.7. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonlarının ölçümü	52
5.7.8. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi	53
6. BULGULAR.....	54

6.1. Optimum sıcaklık değeri.....	54
6.2. Optimum karıştırma süresi	54
6.3. Standart HA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	55
6.4. Toprakтан İzole Edilen HA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	58
6.5. HA'nın Antikanserojenik Aktivitesine ait Bulgular	60
6.5.1. Çözücünün etkisi	60
6.5.2. HA'nın antikanserojenik ve sitotoksik aktivitesi	60
6.5.3. HA'nın Apoptotik Yolak üzerine Etkileri	64
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
8. KAYNAKLAR	70
9. ÖZGEÇMİŞ	79

III. KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
CDK	Siklin bağımlı kinaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal bovine serum
HPV	Human papilloma virus
IARC	Uluslararası kanser araştırma kurumu
IC ₅₀	Radikal gibi moleküllerin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan ekstrakt ve standart madde konsantrasyonu
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue
PBS	Fosfat buffer saline
Rb	Retinablastoma
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağlık örgütü
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HA	Hümik asit
CDFA	Kaliforniya tarım ve gıda bölümü hümik asit metodu

IV. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Normal ve kanserli hücrelerde proliferasyon	5
Şekil 2. Nekroz ve apoptozun kıyaslanması.....	6
Şekil 3. Apoptozun instrinksik ve ekstrinsik yolları	8
Şekil 4. Normal hücre siklusu	9
Şekil 5. Siklin bağımlı kinazların siklin ve fosforillenme ile aktifleşmesi	11
Şekil 6. CDK'lerin hücre çevrimi sırasındaki aktifliklerindeki değişimler	11
Şekil 7. Ubikitin yıkım yolağı	12
Şekil 8. Hücre büyüme eğrisi	14
Şekil 9. Kanser oluşumunu etkileyen faktörler	15
Şekil 10. Dünya'da görülen ölüm sebepleri.....	19
Şekil 11. Türkiye'de kadın ve erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü	20
Şekil 12. Hümik maddelerin özellikleri	22
Şekil 13. Hümik maddelerin farklı ortamlarda çözünmeleri.....	22
Şekil 14. Hümik asidin çözünürlüğünün pH ile ilişkisi	23
Şekil 15. Lignin teorisine göre hümik maddelerin oluşumu).....	23
Şekil 16. Hümik asit Andosol Modeli.....	25
Şekil 17. HA Stevenson Modeli	25
Şekil 18. HA Kleinhempel Modeli	26
Şekil 19. Serviks ve anatomik yapısı	30
Şekil 20. HPV-16'nın genomik haritası	30
Şekil 21. Serviks kanserinin oluşum süreci.....	31
Şekil 22. 2012 yılında dünya çapında tahmini servikal kanser insidansı.....	34
Şekil 23. 2012'de Dünya tahmini servikal kanser ölümleri.....	35
Şekil 24: HPLC cihazının kısımları.....	37
Şekil 25. HA izolasyonunu gösteren diyagram	46
Şekil 26. MCF-7 hücre üzerine HA'nın zaman ve doza bağlı etkisinin sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiğı...48	
Şekil 27. HeLa hücreleri üzerine HA'nın zaman ve doza bağlı etkisinin sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiğı...48	

Şekil 28. Optimum sıcaklık eğrisi	54
Şekil 29. Optimum karıştırma süresi eğrisi	55
Şekil 30. Spektrofotometrik HA kalibrasyon eğrisi	55
Şekil 31. Standart HA'nın farklı mobil fazlarda verdiği piklere ait kromatogramlar A)30:70 MeOH:Su B)70:30 MeOH:Su C) 50:50 MeOH:Su	56
Şekil 32. Standart HA'nın değişen hacim birimleri için elde edilen kromatogramlar	56
Şekil 33. Literatürde bulunan standart HA eğrisi	57
Şekil 34. HA standart eğrisi	57
Şekil 35. Toprak numunesi HA kromatogramı	58
Şekil 36. Farklı toprak türlerinden izole edilen HA'ya ait kromatogram örneği	59
Şekil 37. Topraktan izole edilen HA'ya ait kalibrasyon grafiği	59
Şekil 38. Çözücünün farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisi.....	60
Şekil 39. Standart HA'nın HeLa hücre indeksi üzerine etkisi	61
Şekil 40. İzole edilen HA'nın IC50 değerleri	62
Şekil 41. Standart HA'nın NIH3 T3 hücre indeksi üzerine etkisi.....	63
Şekil 42. İzole HA'nın NIH T3 hücre indeksi üzerine etkisi.....	63
Şekil 43. Standart HA ile tetiklenen apoptotik mekanizma	64
Şekil 44. İzole HA ile tetiklenen apoptotik mekanizma	64
Şekil 45. Standart ve izole HA'nın mitokondri membran potansiyeline etkisi	65

V. TABLOLAR ve RESİM LİSTESİ

Tablo 1. Hücre siklusu kontrol noktaları.....	9
Tablo 2. Onkogenler.....	13
Tablo 3. Tümör baskılayıcı genler	13
Tablo 4. Normal ve kanserli hücre arasındaki farklar	15
Tablo 5. Karsinojenlerin sınıflandırılması.....	17
Tablo 6. Türkiye'de en sık görülen 10 kanser türü (kadın-erkek).....	21
Tablo 7. Hümik asit karakterizasyonunda dikkat edilen özellikler.....	24
Tablo 8. Doğal kaynakların içerdiği hümik ve fulvik asit oranları.....	27
Tablo 9. 15 yaş ve üzeri kadınların smear yaptırma durumunun dağılımı	36
Resim 1. Agilent 1100 serisi YBSK sistemi.....	42
Resim 2. Örneklerin mekanik çalkalayıcıda karıştırılması.....	43
Resim 3. Örneklerin santrifüjlenmesi.....	44
Resim 4. Santrifüj sonrası elde edilen örnekler	44
Resim 5. HA içeren örneğin etüvde kurutulması	45

1. ÖZET

Hümik Asidin İnsan Serviks Kanseri Üzerine Antikanserojenik Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Ayşe DEMİR AKTAŞ

Danışmanı: Doç. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Anabilim Dalı: Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Hümik asit (HA) çoğunlukla topraktan elde edilen ve tarım, tıp, kozmetik gibi yaygın kullanım alanları olan bir maddedir. Yüzyıllar boyu tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı topraktan HA izolasyonu ile HA'nın insan serviks kanseri üzerine olan antikanserojenik ve apoptotik aktivitelerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Antalya ilinden alınan toprak örneğinden HA izolasyonu için CDFA yöntemi kullanıldı. İzole HA'nın karakterizasyonu spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle yapıldı. Toprak örneğinden izole edilen HA'nın HeLa hücreleri üzerindeki antikanserojenik etkisi ile non-kanserojen embriyonik fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ve gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı kullanılarak yapıldı. Ayrıca, HeLa hücreleri üzerindeki antikanserojenik etki mekanizmasını belirlemek için kaspaz enzim aktivasyonlarıyla mitokondri membran potansiyelinin ölçüm işlemleri de gerçekleştirildi.

Bulgular ve Sonuç: Yapılan analizler sonucunda, CDFA yöntemi ile izole edilen HA'nın karakterizasyonunda kromatografik yöntemin daha uygun olduğu tespit edildi. İzole HA'nın HeLa hücreleri üzerinde antikanserojenik etkisi olduğu, normal hücreler üzerinde ise sitotoksik etkisi olmadığı belirlendi. HA'nın antikanserojenik etkisini kaspaz enzim aktivasyonunu arttırarak ve mitokondri membran potansiyelini azaltarak meydana getirdiği ortaya konuldu. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, HA'nın serviks kanseri için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Antikanserojen, hümik asit, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, serviks kanseri, MTT.

2. SUMMARY

The Cytotoxic Effects of Humic Acid on Human Cervical Cancer

Student's name: Ayşe DEMİR AKTAŞ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR

Department: Department of Biochemistry

Aim: Humic acid (HA) is a substance which is mostly obtained from soil and has widespread usage areas such as agriculture, medicine and cosmetics. It is known that it has been used for therapeutic purposes for centuries. The aim of this study was to evaluate the anticarcinogenic and apoptotic activities of HA isolated from soil on human cervical cancer cells.

Material and Methods: CDFA method was used for the isolation of soil taken from Antalya, Turkey province. Characterization of isolated HA was performed by spectrophotometric and chromatographic methods. The cytotoxic effect of HA isolated from the soil sample on non-carcinogenic embryonic mouse fibroblast (NIH-3T3) cells with the anticancerogenic effect on HeLa cells was performed using MTT method and real time cell analysis device. In addition, to determine the anticarcinogenic mechanism of action on HeLa cells, it was measured mitochondrial membrane potential and caspase enzyme activations.

Findings and Results: As a result of the analyzes, it was determined that chromatographic method was more suitable for characterization of HA isolated by CDFA method. It was determined that isolated HA had an anticancerogenic effect on HeLa cells and no cytotoxic effect on normal cells. The anticarcinogenic effect of HA was revealed by increasing caspase enzyme activation and decreasing the mitochondrial membrane potential. Findings from the study suggest that HA may be a potential therapeutic agent for cervical cancer.

Key words: Anticancer activity, apoptosis, cervical cancer, cytotoxicity, humic acid

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyadaki ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı alan kanser, hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını etkileyen çok sayıda mutasyon sonucu oluşan ölümcül bir hastalıktır. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi protokollerinin birçok önemli soruna sebep olduğu da çok iyi bilinmektedir. Hücrelerin kemoterapötik ilaçlara direnç kazanması, kanserli hücrelerin yanında normal hücrelerin de etkilenmesi, kemik iliğinin baskılanması nedeniyle immün sistemin yetersizliği hastalığın tedavisinde önemli başarılar elde edilememesine neden olmaktadır.

Özellikle kanser tedavisi için yeni moleküllere ihtiyaç duyulması, bitkilere ve diğer organik maddelere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Günümüzde kemoterapi protokollerine ilave olarak alternatif uygulamalardan da yararlanılmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda organik ve anorganik madde türlerinin sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini kapsayan çalışmaların sayısı ivme kazanmıştır. Klinikte kullanılan sentetik ilaçların çok fazla yan etkiye sahip olması, ülke ekonomisine ek yük getirmeyen kolay ve düşük maliyetli tedavi olanaklarını sağlaması ve çok yönlü aktiviteye sahip olması bu maddelerin klinikte kullanım potansiyellerini arttırmıştır.

Hüyük maddeler doğal olarak oluşan, yüksek moleküler ağırlığa sahip, renkleri sarıdan siyaha değişebilen, kolloidal yapılı, bozulmaya dayanıklı ve aromatik yapılı heterojen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu hüyük maddeler; hüyük asit (HA), fulvik asit ve hüyükin olarak sınıflandırılmaktadır. Bütün toprakların hüyük maddelerden en azından birini içerdiği düşünülmektedir. Fakat toprak türü, coğrafik yerleşim ve iklim koşulları gibi faktörlerin, hüyük maddelerin miktar, renk ve ağırlığı üzerinde farklılıklar oluşturduğu bilinmektedir.

Toprakta bulunan hüyük maddeleri saflaştırmak için yapılan çalışmalarda, çöktürme gibi klasik metotlardan başlayarak kromatografinin bütün çeşitlerine başvurulmuştur. Fakat, bütün bu saflaştırma çalışmalarında, elde edilen küçük parçaların oldukça kompleks bir yapıda olduğu belirlenmiş ve kimyasal yapısının

tam olarak aydınlatılmamış olmasından dolayı miktarı da tam olarak belirlenememiştir. Bundan dolayı hümik maddelerin düzenli bir şekilde devam eden ve tekrarlayan yayılmış bir moleküler iskeletten yoksun olduğu anlaşılmıştır.

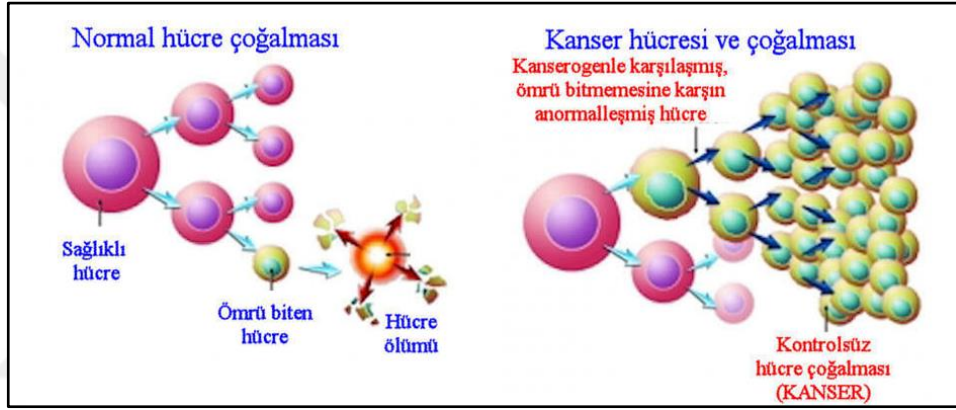
Hümik maddelerden biri olan HA'nın tıp alanında tıbbi malzemeler için hammadde olarak kullanımının yanısıra, antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, analjezik ve antiinflamatuvar etkilere de sahip olduğu bildirilmiştir. Bu biyolojik özelliklerinin, yapısında bulunan aromatik ve fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Hem kimyasal yapısı hem de elde edildiği kaynağa bağlı olarak HA'nın kimyasal yapısı ve biyolojik etkinliği de değişmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasında öncelikle, doğal bir yapı olan ve Antalya yöresinden alınan toprak örneğinden HA'nın iki farklı yöntemle izole edilmesi ve karakterizasyon çalışmasının yapılması amaçlanmıştır. Miktarı ve saflığı belirlendikten sonra, antikanserojenik ve apoptotik aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla, insan serviks kanseri hücre serisi olan HeLa hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser; hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, hücreler arası sinyaller ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) gibi hücre davranışlarının en temel kurallarını ihlal ederek kontrolsüz çoğalıp, doku ve organları işgal eden kompleks bir hastalıktır (Şekil 1), (Pal ve Nayak, 2010).

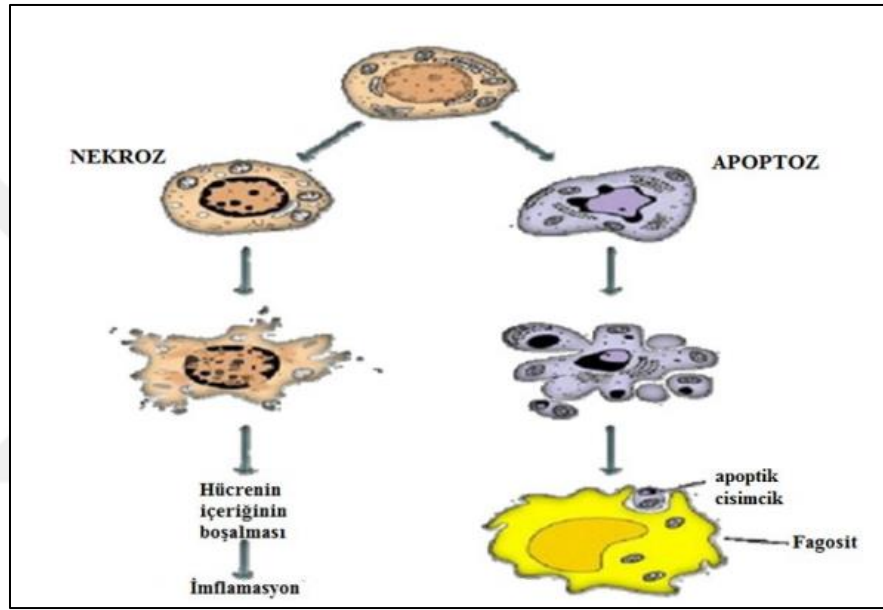


Şekil 1. Normal ve kanserli hücrelerde proliferasyon

Organizmanın yaşam süreci; hücre gelişimini, çoğalmasını ve ölümünü içerir (Özenoğlu ve ark., 2013). Hasarlı dokuların onarımı somatik hücrelerin ve destek dokunun çoğalması ile gerçekleşmektedir (Jemal, 2011). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında proto-onkogenlerin büyük bir önemi vardır (Greaves ve ark., 2012). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (Vermeulen ve ark., 2003).

Homeostazis; var olan dengenin korunmaya çalışılması olarak tanımlanmaktadır (Harris 2010). Homeostasisi sağlayan 3 önemli olay vardır. Bunlar; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı hücre ölümü) dir (Vermeulen ve ark., 2003).

Organizma içerisinde homeostazinin korunması için hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dengenin sağlanması gerekir. Hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılırken programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi çeşitli ölüm tipleri kullanılır (Bellamy, 1995). Bu dengenin bozulması hiperplazi veya neoplaziye neden olur (Ghaneh ve ark., 2007). Pozitif veya negatif uyarılar genetik lezyona yatkın hücrelerde tümöre neden olabilir. Tümör gelişimini en aza indirmeye yardımcı mekanizmalardan birisi nekrozdur. Nekroz ile apoptozis arasında farklılıklar vardır (Şekil 2).



Şekil 2. Nekroz ve apoptozun kıyaslanması (/tr.clipartlogo.com, erişim tarihi :05.04.2019)

Nekroz: Kontrolsüz hücre ölümü, hücre şişmesi ve hızlı dejenerasyon olarak tanımlanır. Nekroz genler tarafından kontrol edilemez (Goistein ve ark., 2007). Nekrozun bilinen en yaygın nedeni hipoksidir. Arsenik ve siyanid gibi toksik maddeler ve ağır metaller nekroza sebep olur. Nekroz sırasında mitokondride ROS üretimi artar ve nonapoptotik proteazlar aktive olur. Ayrıca ATP üretimi azalırken Ca^{+2} kanalları açılır (Nicotera ve ark., 2004).

Apoptozis: Nekrozdan farklı olarak fizyolojik koşullarda meydana gelen ve doku homeostazisini sağlayan ölüm şeklidir. Programlı hücre ölümü apoptozisin normal hücre döngüsünde ve fizyolojik süreçlerde rolü vardır (Guimaras, 2004)

Apoptozis, normal hücre ölümünde görev almakla birlikte mutasyona uğramış hücrelerinde çoğalmasını önleyen önemli bir yoldur. Hücre siklusu ve apoptozisde çok sayıda protein ikili rol oynar. DNA’da meydana gelen hasar hücre siklus kontrol mekanizmalarının bozulmasına neden olur. Birçok kanser tipinde hücre siklus kontrol noktalarında mutasyonlar ortaya çıkarılmıştır. (Vermeulen ve ark., 2003).

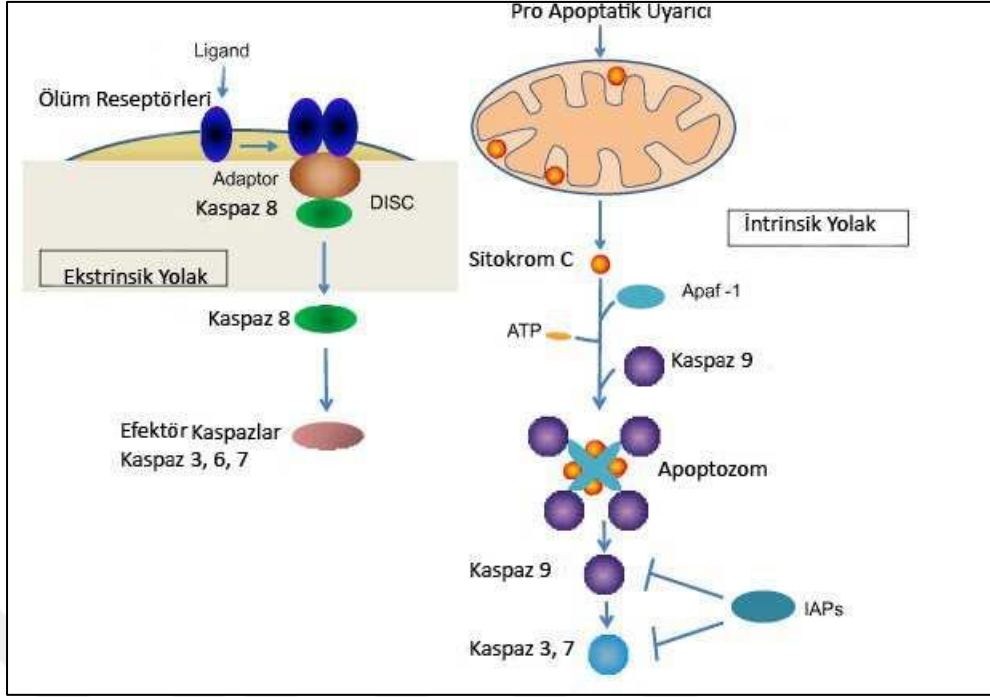
Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 genlerine bağlıdır. Bu grup proapoptotik ve antiapoptotik üyelerden oluşur. Hücrede proapoptotik üyeler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir (Kannan ve Jain, 2000).

Proapoptotik üyeler; Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa’dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktörün salınımını artırarak apoptozu indüklerler (Adrain ve Martin, 2001). Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1’dir. Bu proteinler de mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar. Kaspazların öncü formlarını ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (Spierings ve ark., 2004). Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır ve büzülür. Nukleus küçülür ve parçalara ayrılır.

Apoptoz için iki farklı yol bulunur (Şekil 3);

1. İnstrinsik Yol: Hücre içi sinyallerle başlar. Hücrede genetik hasar meydana geldiğinde antiapoptotik üyeler inhibe olurken proapoptotik üyeler aktive olur. Hücrede Bax salınımı mitokondri membranında por oluşumunu sağlar ve açılan bu porlardan sitokrom-c salgılanır. Sitokrom-c, Apaf-1 proteini ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Oluşan bu kompleks prokaspaz-9’u keserek aktif kaspaz-9’a çevirir. Kaspaz-9 ise prokaspaz-3’ü aktive eder. Oluşan kaspaz-3 apoptozun hızlanmasını sağlar (Keane ve ark., 2001).

2. Ekstrinsik Yol: Hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktive olmasıyla başlar. Aktive olan kompleks prokaspaz-8’i keserek aktif kaspaz-8’i oluşturur. Kaspaz-8 ise prokaspaz-3’ü hem doğrudan hem de mitokondriyal yolakla dolaylı olarak aktive edebilir. Kaspaz-3 apoptozun oluşumunu tetikler (Lou ve ark., 1998).



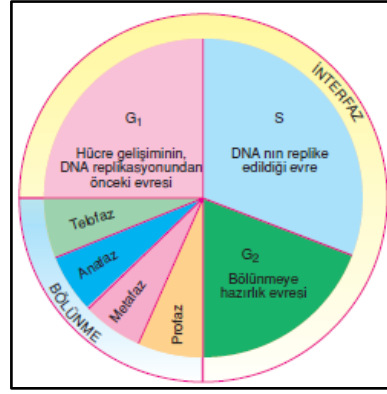
Şekil 3. Apoptozun instrinsik ve ekstrinsik yolları (<http://libratez.cu.edu.tr>, Erişim tarihi: 04.04.2019)

Apoptozun görüldüğü fizyolojik olaylar (Gewies, 2003);

- ✓ Parmak oluşumu sırasında
- ✓ Amfibilerin kuyruk hücrelerinde
- ✓ Lümenli organ oluşumunda (bağırsak)
- ✓ Üreme organları oluşumunda

4.1.1. Normal hücrelerde hücre siklusu

Normal bir hücre siklusu genel olarak 2 aşamadan meydana gelir. Bunlar; mitotik evre ve interfaz evresidir (Hudson, 2010). Mitoz evresinden sonra siklus G1-S-G2 ve tekrar mitoz şeklinde tekrarlanır (Şekil 4). Bu süre içerisinde büyüme meydana gelir ve eğer sinyal alınmazsa istirahat fazı denilen G0 fazında hücre durur (Vermeulen ve ark., 2003). G0 fazı saatler, günler hatta hücrenin yaşamı boyunca sürebilir. Örneğin hepatosit ve adiposit gibi işlev kazanmış hücreler G0'da dururlar (Nelson, 2008). İnterfaz evresi bölünmenin yaklaşık %90'ını kapsar ve ortalama 16-24 saat sürer. Mitoz evresi ise ortalama 1-2 saatte tamamlanır (Stratton ve Campbell, 2009).



Şekil 4. Normal hücre siklusu (https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle, Erişim tarihi: 07.01.2018)

Hücre bölünmesini denetleyen kontrol noktaları vardır (Vermeulen ve ark., 2003). Mitozdan G1 fazına geçen hücrenin S fazına geçmesine G1 kontrol noktasında karar verilir (R point). Bu noktada hücre ya siklusu durdurur ya da devam eder (Foster, 2008). G1 fazında hücre bulunduğu ortamı kontrol eder ve DNA sentezi için hazırlık yapar. RNA ve protein sentezi gerçekleşirken DNA sentezi olmaz. S fazında ise DNA sentezi gerçekleşirken DNA miktarı iki katına çıkar ve aynı zamanda RNA, proteinde sentezlenir. G2 fazında hücre büyümeye devam ederken RNA ve protein sentezi sürerken DNA sentezi olmaz. G2'den sonra mitozu geçen hücre burada profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçirir. Bunun sonunda mitoz (çekirdek bölünmesi) ve sitokinez (hücre bölünmesi) ile birbirinin aynı genetik materyale sahip iki hücre oluşur (Öndağ, 1978).

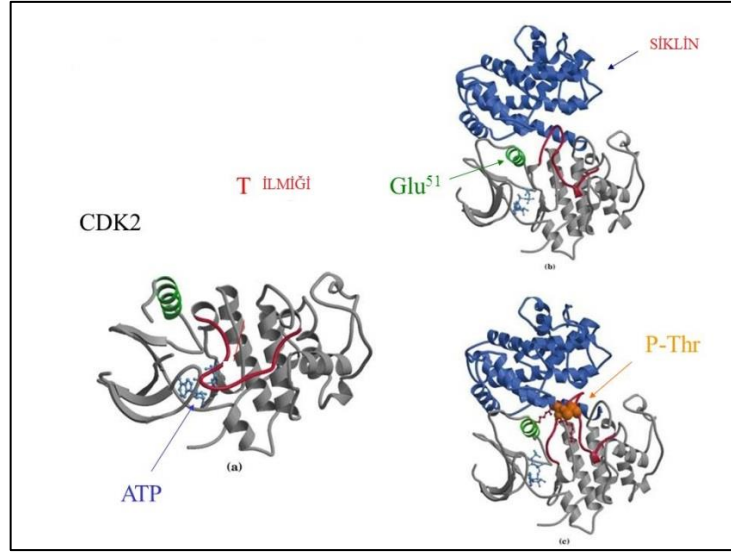
Hücre siklusunda herhangi bir noktada aksaklık yaşanırsa, DNA doğru olarak kopyalanamaz ve hücrede hasar meydana gelebilir. Bu sebeple hücrede G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu noktalarda hücrenin yoluna devam edip etmeyeceğine karar verilir (Vermeulen ve ark., 2003). Bu noktalarda Tablo 1'de belirtilen özelliklere dikkat edilmektedir.

Tablo 1. Hücre siklusu kontrol noktaları

G1 kontrol noktası	- Hücre büyüklüğü - Besin miktarı - DNA hasarı kontrol edilir.
G2 kontrol noktası	-Hücrenin büyüklüğü -DNA hasarı kontrol edilir.
M kontrol noktası	-Kromozomların iğ ipliklerine bağlanması kontrol edilir.

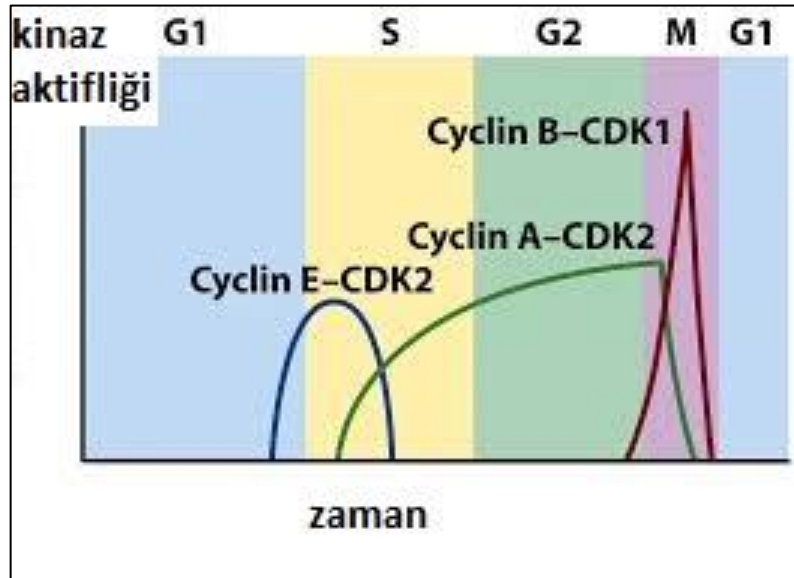
Hücre siklusunu kontrol eden 3 protein sınıfı vardır. Bunlar; siklinler (cyc=cln), siklin bağımlı kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) dir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir. Siklin bağımlı kinazlar G-S-G ve mitozaya geçişi kontrol eder. Memeli hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde işlevleri en iyi bilinen on bir tane siklin bağımlı kinaz ve on altı tane siklin rol oynamaktadır (Cairns ve ark. 2011).

Kinaz grubu proteinler fosforilasyon görevini üstlenmişlerdir. Siklin bağımlı kinazların aktiviteleri bağlandıkları sikline bağımlı olduğu için bunların adlandırılması bu şekildedir. Cdk'ler siklinler ile birleştiğinde aktif hale geçebilirler. Bu komplekste siklinler düzenleyici alt birim, siklin bağımlı kinazlar ise katalitik alt birimlerdir (Şekil 5). Siklinin siklin bağımlı kinaza bağlanması ile yeni bir konformasyonel değişiklik olur ve aktifleşmiş kompleks oluşur.



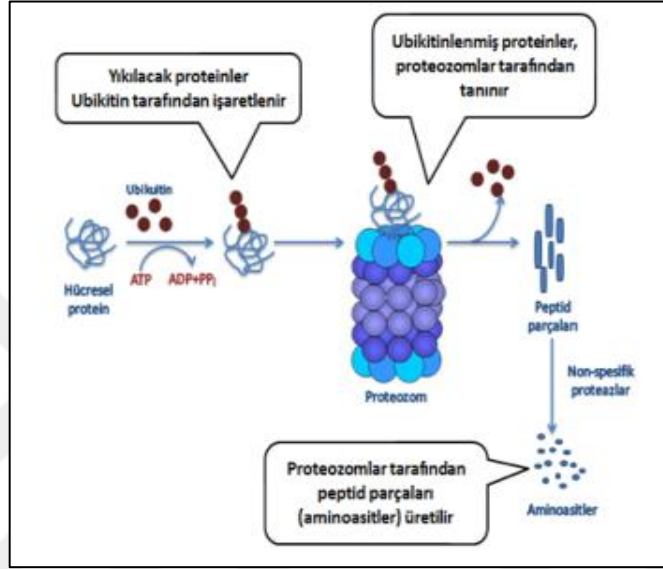
Şekil 5. Siklin bağımlı kinazların siklin ve fosforillenme ile aktifleşmesi (www.semanticscholar.org, erişim tarihi: 10.03.2019)

Oluşan her bir eşleşme siklusun farklı noktasında düzenleyici olurken miktarı da buna göre ayarlanır. Hücre siklusu boyunca kinaz komplekslerinin aktivite düzeyi değişir. Kinaz aktifliğinin siklusta nasıl değiştiği Şekil 6'da gösterilmiştir. Oluşan bu komplekslerin düzeyi siklin alt birimlerinin konsantrasyonlarına, fosforillenme durumuna ve inhibitör moleküllere bağlıdır.



Şekil 6. CDK'lerin hücre çevrimi sırasındaki aktifliklerindeki değişimler (www.nature.com, erişim tarihi: 05.03.2019)

Siklinler siklusun farklı düzeylerinde bir taraftan sentezlenirken bir taraftan da yıkılırlar. Siklin moleküllerinin yıkımı ise ubiquitin yolağı ile sağlanır (Fearson, 1997). Siklin ile ubiquitin bir araya geldiğinde siklin parçalanması başlar. Siklin ve aktifleşmiş ubiquitin, ubiquitin kinaz enzimi ile kovalent bağlanır ve zamanla birçok ubiquitin molekülü eklenir. Bu durum bir yıkım enzimi olan proteozomun siklini parçalaması için bir sinyal oluşturur (Şekil 7).



Şekil 7. Ubikitin yıkım yolağı (www.semanticscholar.org, erişim tarihi: 10.03.2019)

Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilmesi durumunda genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre siklusunda iki tip gen grubunun rolü vardır. Bu genler; onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir (Foster, 2008).

- 1. Onkogenler:** Kanser gelişimini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen ayrıca hücresel büyümeyi uyararak etkileyen genlerdir. Hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlere protoonkogenler denir. Protoonkogenlerdeki mutasyonlar, bu genlerin işlevini değiştirerek bir onkogen haline getirebilir onkogenler kontrolsüz hücre çoğalmasını uyararak tümör oluşumuna sebep olurlar. Tablo 2’de bazı kanser tümörleri ile ilişkilendirilen onkogenler verilmiştir (Lodish ve ark., 2000).

Tablo 2. Onkogenler

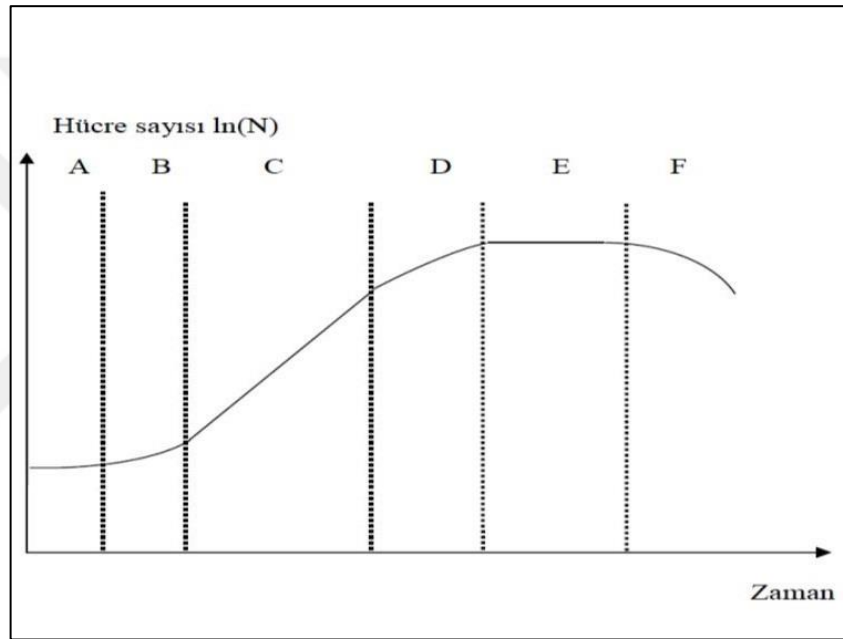
RAS	Kolon kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde aktif
c-MYC	Kolon ve akciğer kanserinde aktif
MET	Böbrek kanseri
CDK4	Familial melanoma
BCL2	Foliküler lenfoma
HER2/neu	Meme kanseri

2. Tümör baskılayıcı genler: Tümörün oluşumunu durduran fren görevi üstlenen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler tablo 3’de gösterilmiştir. P53 geni hasara uğradığında hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkar ve onarım olmadan hücre siklusu kontrolsüz devam eder (Vermeulen ve Ark. 2003). Normal bir hücrede meydana gelen bir hasarı p53 geni farkettiğinde aktif hale gelir ve hücre çoğalmasını yavaşlatır. Bunu siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin sentezini artırarak yapar. Hücre çoğalmasını yavaşlatan p53 geni aynı zamanda DNA hasarını giderebilecek proteinleri de aktive eder. Buna rağmen hasar onarılmazsa hücrenin ölümü sağlanır. p53 geninde bir hasar olması durumunda Rad 9 geni, p53 ile benzer görevler üstlenen çok sayıda protein üretir ve bu proteinler kırık DNA parçasına bağlanır. Bu süreçte siklin üretimi durur.

Tablo 3. Tümör baskılayıcı genler

p53	Çeşitli tümörler
RB1	Retinablastoma geni
WT1	Wilm’s tümörü geni
NF1	Neurofibromatosistype 1 geni
NF2	Neurofibromatosistype2 geni
DCC	Kolon kanseri
BRCA1, BRCA2	Meme kanseri

Tümörün büyüme hızını ifade etmede kullanılan “doubling time (ikilenme zamanı)” tümör hücre sayısının iki katına çıkmasıdır (Şekil 8). Özellikle solid tümör hücreleri başlangıç aşamasında geometrik bir artış gösterip, ilerleyen zamanlarda büyüme hızının yavaşladığı ve platoya ulaştığı eğriye “büyüme eğrisi” denir (Dinçol, 2000). Hücre siklus saati hücrenin normal seyrine devam edip etmeyeceğini belirler veya hücreyi ölüme yönlendirir (Bellamy, 1996). Kanserin oluşumu aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik ölüm hızında bağımlıdır. Zamanı geldiğinde apoptoza uğrayamayan hücreler kansere dönüşme potansiyeline sahiptir (Ulukaya 2003).



Şekil 8. Hücre büyüme eğrisi (<http://genderi.org>, erişim tarihi: 01.02.2019)

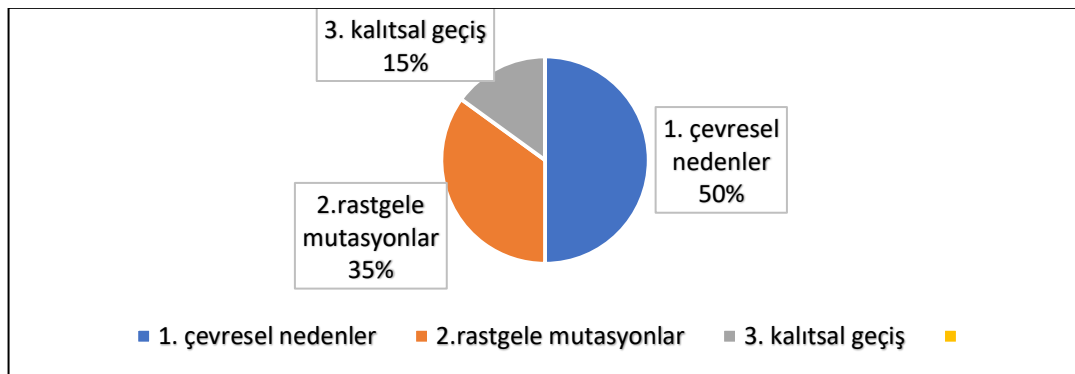
Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran önemli biyolojik özellikler Tablo 4’te ayrıntılı olarak sunulmuştur (Mızra ve Akbulut, 2015).

Tablo 4. Normal ve kanserli hücre arasındaki farklar

NORMAL HÜCRE	KANSER HÜCRESİ
-Büyüme faktörlerine bağlı olarak bölünürler	-Büyüme faktörlerinden bağımsız bölünürler
-Vücudun ihtiyacına göre sinyallere cevap verirler	-Özellikle büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermezler
-Apoptoz görülür	-Apoptoz görülmez
-Replikasyon sınırlıdır	-Replikasyon sınırsız gerçekleşir
-Anjiyogenez gözlenmez	-Anjiyogenez gözlemlenir
-İnvazyon ve metastaz gözlenmez	-İnvazyon ve metastaz gözlenir

4.1.2. Kanser etiyojisi

Batı toplumlarında her üç insandan birinde kanser gelişmekte ve bunların da beşte biri hayatını kaybetmektedir. Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15'inin kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'luk kısmın ise çevresel faktörlere bağlı geliştiği bilinmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Kanser oluşumunu etkileyen faktörler

Canlının yaşamı boyunca DNA'sının mutajenlere maruz kalması ve buna bağlı olarak meydana gelen progressif değişiklikler ile replikasyon sırasında oluşan hatalar sonucu şekillendiği düşünülmektedir.

Bazen oluşan mutasyonlardan biri, bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar (Futreal ve ark., 2001).

Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır. Genlerin bazı hastalıklara karşı yatkınlığa neden olup olmadıkları konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun kalıtsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın bir hale gelebilmektedirler. Meme ve yumurtalık kanseri kalıtsal geçişine ait bazı genler (BRCA1 ve BRCA2) tespit edilmiştir. Lösemiler ve bazı çocukluk çağı tümörleri (Wilms tümörü, retinoblastoma) kalıtsal özellik gösterir. Kalınbarsakta polip gelişimine olan genetik yatkınlıkta, kolon kanseri gelişim riskini artırmaktadır.

Her ne kadar kolon kanserlerinin çoğu yaklaşık %85-90'ı doğumdan sonra meydana gelen mutasyonların eseri olsa da geriye kalan kısmı kalıtsaldır (Vogelstein ve ark., 2003).

Çevresel olarak maruz kaldığımız ve kansere sebep olan ajanlara karsinojen adı verilir. Karsinojenlerin başlıca özellikleri şu şekildedir.

- Etkileri genellikle doza bağımlı, birikimli ve geri dönüşüzdür.
- Karsinojenle karşılaşan organizmada, malign değişiklik oluşmadan önce, genellikle latent bir evre olur.
- Karsinojenlere karşı duyarlılıkta tür, soy ve cinsiyet farklılıkları vardır.
- Birçok kimyasal ajan organizmada metabolik değişikliğe uğradıktan sonra aktiflenerek karsinojenik hale gelir.

Karsinojenleri kimyasal, biyolojik ve fiziksel olarak 3 bölümde incelemek mümkündür (Tablo 5), (Ergün, 2014).

Tablo 5. Karsinojenlerin sınıflandırılması

Kimyasal karsinojenler	Biyolojik karsinojenler	Fiziksel karsinolenler
<ul style="list-style-type: none">- Polisiklikaromatik karbonlar- Aromatik aminler- Nitrozaminler- Aflatoksin- Benzen- Asbest- Berilyum- Alkilleyici ajanlar	<ul style="list-style-type: none">- EpsteinBarr virüsü- Hepatit B virüsü	<ul style="list-style-type: none">- Ultraviolet radyasyon- İyonize radyasyon

Başlıca kansere sebep olan faktörler ise şu şekilde açıklanmıştır;

1. İyonize radyasyon: İyonize radyasyonun kansere sebep olduğu Japonya'ya atılan atom bombasının etkisine maruz kalanlarda ve ankilozan spondilit hastalığı sebebiyle radyasyon verilenlerde gösterilmiştir. İyonize radyasyon DNA hasarı yaparak uzun dönemde kanser riskini artırır (Uluslararası radyoloji komisyonu bildirgesi 2017). Bu süre iyonize radyasyonun verilme dozuna bağlıdır (Feinendegen, 2005).

2. Ultraviyole ışınları: Güneş, solaryum UV ışın kaynağıdır ve UV ışınları çok yüksek enerjilidir. UV ışınları; UVA, UVB ve UVC olmak üzere 3 çeşittir (Armstrong, 2001). UVA ışınları daha düşük enerjiye sahip oldukları, UVC ışınları ise çok yüksek enerjiye sahip olduklarından atmosferden geçemedikleri için kanser oluşumunda etkili değildir. UVB ışınlarının ise direk DNA hasarında etkisi vardır (Koh, 2003).

3. Hava kirliliği: Hava kirliliği içerdiği karsinojen maddeler dolayısıyla kanser oluşumunda etkilidir (Raaschou-Nielsen ve ark., 2013).

4. Sigara: Sigara özellikle akciğer kanseri oluşumunu 10-20 kat artırır (Colditz ve ark., 2003). İlk olarak 1912 yılında akciğer kanseri ile sigara ilişkilendirilmiştir

(Adler 1912). Sigara akciğer kanserinin yanında larenks, ağız boşluğu, mesane, yutak gibi kanserlere de sebep olur (Sasco ve ark., 2004).

5. Alkol: Birçok hastalığa yol açmasının yanında ağız, özofagus, meme ve pankreas kanserine yakalanma riskinide artırır (Allen ve ark., 2009).

6. Beslenme ve diyet: Beslenme insanın sağlığı ile doğrudan ilgilidir. Bu yüzden sağlıklı bir beslenme alışkanlığı özellikle sindirim sistemi kanserlerinde oldukça önemli bir risk faktörüdür (Rapp ve ark., 2005).

7. Kimyasal maddeler: Bazı meslek grupları çalıştıkları ortamda katran ve kömürün yanma ürünlerine aşırı maruz kaldıklarında potansiyel bir kanser hastası adayı olurlar (Zeegers ve ark., 2001). Ayrıca plastik sanayinde çalışanlarda karaciğer kanseri görülme sıklığı oldukça fazladır (Spirtas ve ark., 1994).

8. Mikroorganizmalar: HBV ile hepatoselüler karsinom, EBV ile burkit lenfoma oldukça ilgilidir (Beasley ve ark., 1981; Chene ve ark. 2009).

9. Genetik: Kanser oluşumunda genetik etki oldukça az olmasına karşın bazı kanser türlerinde ailesel geçişler mevcuttur.

4.1.3. Kanserın belirtileri ve bulguları

Kanser vücutta herhangi bir organı veya dokuyu etkileyebilir bu yüzden belirtileri de farklılık gösterebilir. Bazı durumlarda ise hiçbir belirti olmaksızın rutin kontroller sırasında açığa çıkar. Kanserın tedavisi için erken tanı oldukça önemlidir. Genel olarak ise kanser türlerinde gözlemlenen belirtiler şu şekildedir;

-Açıklanamayan kilo kaybı: 6 aylık sürede vücut ağırlığının %10'undan daha fazla kilo kaybı kanser ile ilişkilendirilebilir. Mide, pankreas ve özofagus kanserlerinde kilo kaybı oldukça sık görülür (Marton ve ark., 1981).

-Ateş: Neden olduğu bilinmeyen ateş kanser ile ilişkilendirilebilir. Lenfoma ve lösemide ateş oldukça sık gözlenir (Bleeker ve ark., 2007).

-Halsizlik: Halsizlik kanser belirtilerinden en yaygın görülenidir. Hastalarda ilk dönemde, tedavi aşamasında ve tedavi sonrasında halsizlik görülebilir (Bower ve

ark., 2000). Halsizliğin en önemli sebebi ise kansere bağlı gelişen anemidir (Morrow ve ark., 2002).

-Ağrı: Ağrı bir çok kanser türünde ilerlemiş dönemde görülürken kemik ve testis kanserinde ilk aşamada gözlenebilir (Goudas ve ark. 2005).

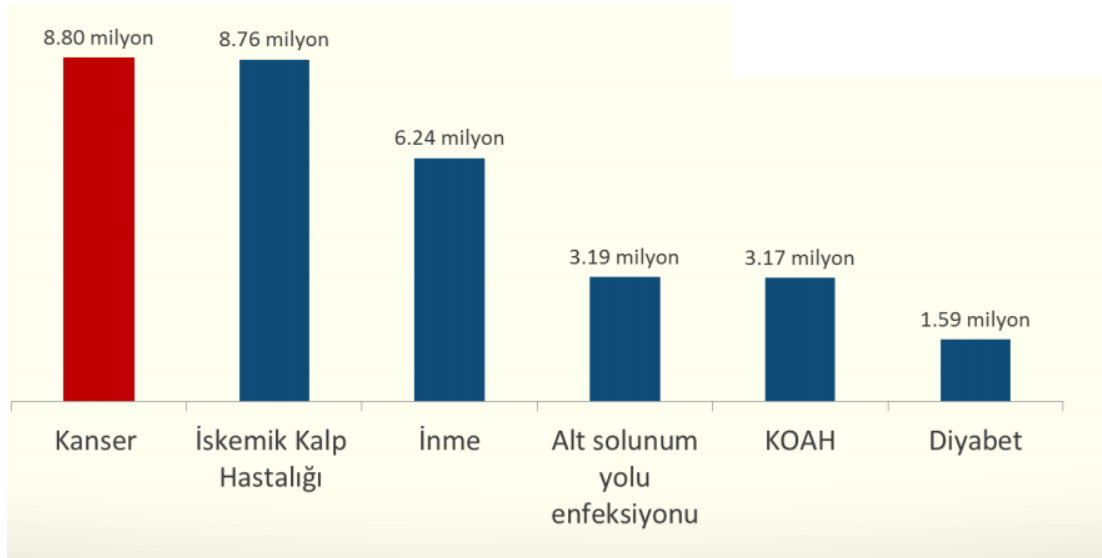
-Şişlik : vücutta herhangi bir bölgede çıkan şişlikler kanser için belirti olabilir. Özellikle ağrılı, sert büyüme gösteren şişlikler ve kitleler dikkate alınmalıdır (Morrow 2000).

-Kanama: Kanama neredeyse tüm kanser türlerinde görülür. Serviks kanserinde ise vaginal kanama ilk belirtileridir (Hyde ve ark. 1974).

Dışkılama ve idrar yapma alışkanlığında değişiklik (Speights ve ark., 1991), yutma güçlüğü ve ses kısıklığı (Schwartz, 2009), siğil ve benlerde değişiklik ise diğer bilinen kanser belirtileridir (Abbasi, 2004).

4.1.4. Dünyada ve Türkiye’de kanser

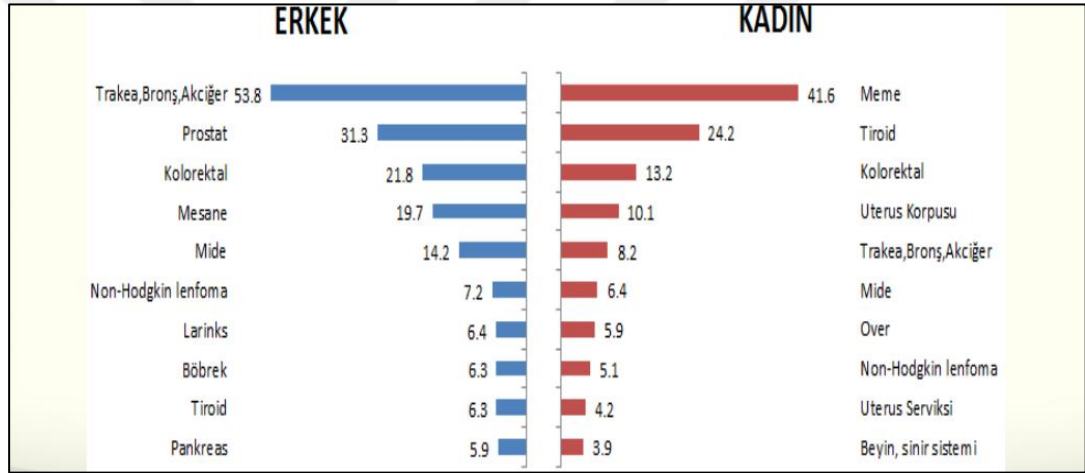
Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre Dünya genelinde ölüm sebepleri görülme sıklığına göre sırasıyla; kanser, kalp hastalıkları ve inme olarak belirtilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Dünya'da görülen ölüm sebepleri (WHO, 2015)

Dünya geneline bakıldığında kanser insidansı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde; erkeklerde en çok akciğer ve prostat kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserler gözlenmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ise erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer, kadınlarda meme ve servikal kanser daha sık görülmektedir. Kanser, son yıllarda, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir. Dünyada ölüm nedenleri arasında birinci sırayı kanser almaktadır. Bununla birlikte 2030 yılına kadar kansere yakalanma oranının hızla artacağı öngörülmektedir.

Türkiye’de kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü Şekil 11’de verilmiştir (hsgm.saglik.gov.tr, erişim tarihi: 05.09.2018).



Şekil 11. Türkiye’de kadın ve erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü, 2015 İstatistikleri (hsgm.saglik.gov.tr, erişim tarihi: 05.09.2018)

Sık rastlanmakta ve görülme sıklığı zaman içinde hızla artmakta olan bu hastalığın tam ve etkin kontrolü ancak dinamik, çok yönlü, bilimsel, multidisipliner ve maliyet etkin bir program ile mümkün olabilecektir. Kansere karşı gerekli önlemler alınmadığı ve sistematik bir kontrol programı uygulanmadığı takdirde 2030’lu yıllarda direkt tedavi maliyetlerinin Sağlık Bakanlığı bütçesi tarafından karşılanamaz bir büyüklüğe ulaşacağı beklenmektedir (ulusal kanser kontrol planı 2004-2008). Türkiye’de en sık görülen ilk on kanser türü sıralandığında kadınlarda ve erkeklerde farklılık ortaya çıkmaktadır (Tablo 6).

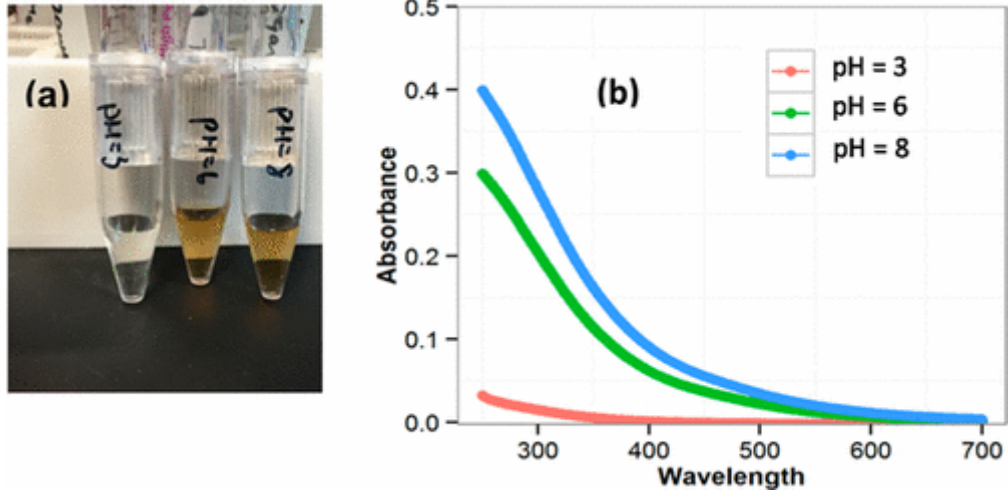
Tablo 6. Türkiye'de kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen 10 kanser türü

	KADIN	ERKEK
1	Meme	Trake, broş, akciğer
2	Troid	Prostat
3	Kolorektal	Mesane
4	Uteruskorpusu	Kolorektal
5	Trake, broş, akciğer	Mide
6	Mide	Larinks
7	Over	Nhl
8	NHL	Pankreas
9	Beyin	Beyin
10	Uterusserviksi	Böbrek

4.2. Hümik Maddeler

Hümik maddeler; doğadaki çürümüş bitki ve hayvan atıkları ile kalıntılarında meydana gelen organik maddelerdir. Hümik maddelerce zengin turba ve çamur bataklıkları jeolojik tortuları oluşturur. Bu dönüşüme diagenesis veya metamorfizma adı verilir. Jeolojik hümik maddeler, linyit veya leonarditteki çeşitli kömür tiplerinden olan hümik maddelerdir. Bu hümik maddeler çoğunlukla hümik asitten meydana gelirler ve çok fazla hümin içerirler. (Erdurur, 2009)

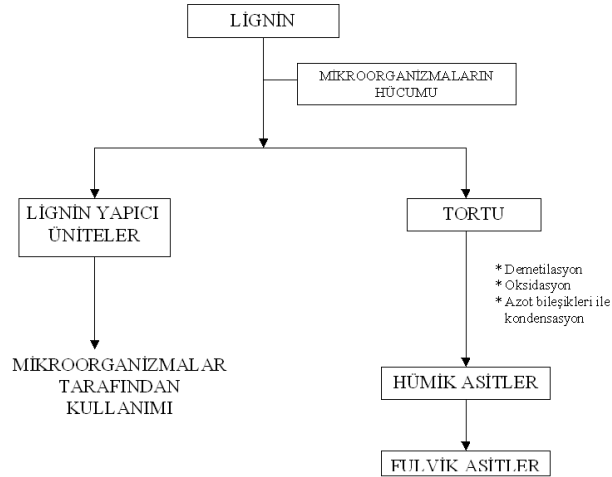
Hümik maddeler doğal olarak oluşan, renkleri sarıdan siyaha kadar değişen yüksek moleküler ağırlığa sahip ve bozulmaya dayanıklı heterojen maddelerdir. Hümik maddeler şekilsiz, kısmen aromatik ve çok iyi bir şekilde tanımlanan organik bileşikler gibi kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olmayan maddelerdir (Şekil 12).



Şekil 14. Hümik asidin çözünürlüğünün pH ile ilişkisi

4.2.1. Hümik maddelerin oluşumu ve kaynakları

Fischer ve Schrader'in teorilerine lignin teorisi ismi verilir ve bu teoriye göre hümik maddelerin ve sonrasında nihai ürün olan kömürün meydana gelişi Şekil 15'de gösterilmiştir.



Şekil 15. Lignin teorisine göre hümik maddelerin oluşumu (<http://humikasit100.blogspot.com>, erişim: 05.04.2018)

4.2.2. Hümik asit karakterizasyonu

Hümik maddelerin karakterizasyonunda bakılan özellikler Tablo 7’de ayrıntılı olarak ele alınmıştır (Stevenson, 1992).

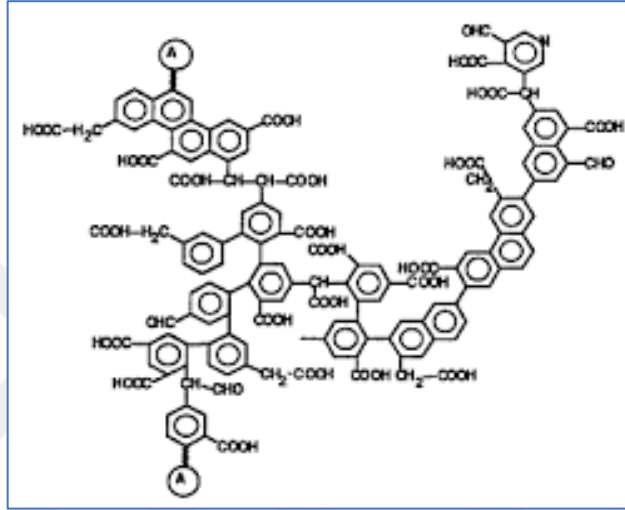
Tablo 7. Hümik asit karakterizasyonunda dikkat edilen özellikler

Elementel Bileşim	<ul style="list-style-type: none">- Hümik asit karakterizasyonunda genellikle maddenin karbon (C), hidrojen(H), oksijen(O),kükürt(S) ve bazen de fosfor(P) içeriğine bakılır.- Hümik esaslı maddelerde C içeriği %50’den fazla, O içeriği ise %30-40 aralığındadır.
Fonksiyonel gruplar ve yapısal bileşenler	<ul style="list-style-type: none">-Hümik maddelerde genellikle karboksil, fenolik hidroksil, alkolik hidroksil ve karbonil grupları bulunur.
Molekül ağırlığı	<ul style="list-style-type: none">-hümik maddelerin bir karışım olma özelliğinden dolayı molekül ağırlığı net olarak bilinemez bu yüzden molekül ağırlığı ortalaması hesaplanır.-yaygın olarak sayısal ortalama(Mn) ve ağırlık ortalaması(Mw) kullanılır.-Mw/Mn oranı arttıkça maddenin molekül ağırlığı dağılımı genişler.
Spesifik yüzey alanı	<ul style="list-style-type: none">-Hümik asit için spesifik yüzey alanı $200m^2/g$ olarak belirlenmiştir.

Hümik asidin moleküler yapısı tam olarak bilinmemekle birlikte bununla ilgili çeşitli teoriler vardır.

4.2.2.1.Hümik asit modeli (Andosol)

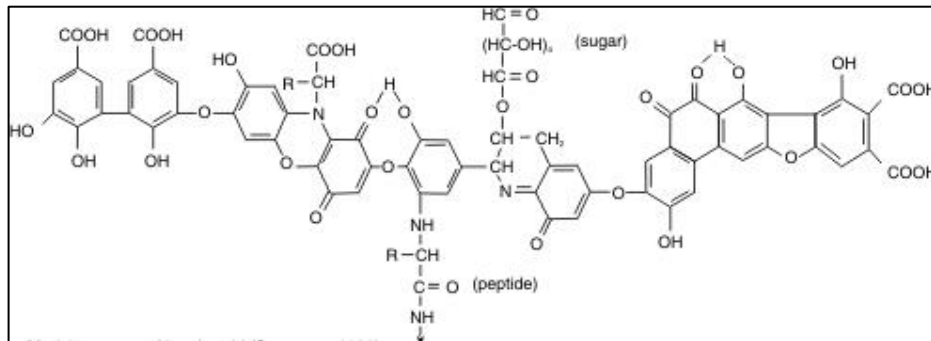
Andosol hümik asidin iki boyutlu yapısını ortaya koyarken yapının ağırlıklı olarak aromatik halkalardan ve karboksil gruplarından oluştuğunu ileri sürmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. Hümik asit Andosol Modeli (acikerisim.selcuk.edu.tr, erişim tarihi: 05.04.2018)

4.2.2.2. HA molekül yapısı modeli (Stevenson)

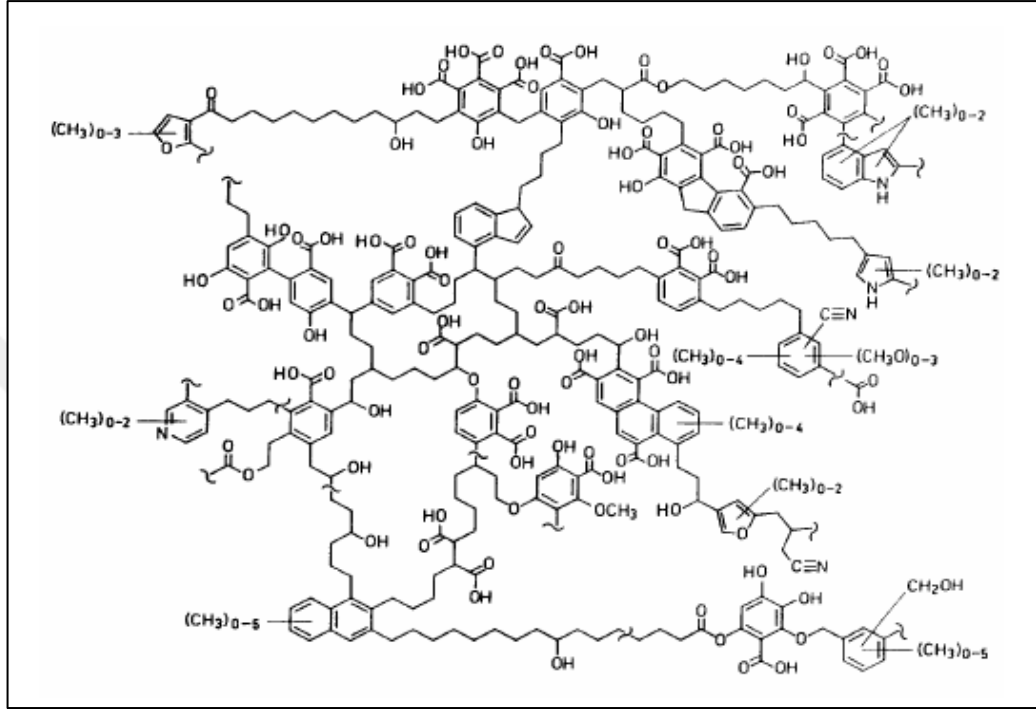
Stevenson' nın ortaya koyduğu modeldede çok sayıda aromatik halka ve karboksil grubu yer almaktadır fark olarak -COOH ve -OH gruplarının sayıları birbirine oldukça yakındır. Ayrıca bu yapıda peptid ve şeker gruplarına da yer verilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. HA Stevenson Modeli (acikerisim.selcuk.edu.tr, erişim tarihi: 05.04.2018)

4.2.2.3. HA Kleinhempel moledi

Kleinhempel modelinde Andosol ve Stevenson modelinde olduğu gibi $-COOH$ ve $-OH$ gruplarına yer verilir. Farklı olarak ise silika ve alümina gruplarının varlığı çeker. Ayrıca N ve aldehitlerin bağlı olduğu kısımlar bulunur (Şekil 18).



Şekil 18. HA Kleinhempel Modeli (acikerisim.selcuk.edu.tr, erişim tarihi: 05.04.2018)

4.2.2. Hümik asit saflaştırma yöntemleri

Bitki kalıntılarının uzun yıllar boyunca kimyasal ve biyolojik olarak parçalanması sonucu hümik asit meydana gelir ve kömürlerin önemli bir kısmını oluşturur. Doğal kaynaklar içerisinde hümik madde oranı oldukça yüksek olan maddeler mevcuttur. Tablo 8’de doğal kaynakların içerdiği hümik asit ve fulvik asit oranları verilmiştir (Kural 1978).

Tablo 8. Doğal kaynakların içerdiği hümik ve fulvik asit oranları

Doğal Kaynak	Hümik ve Fulvik Asit Oranları %
Leonardit	40-85
Siyah turba	10-40
Sapropel turba	10-20
Linyit	10-30
Hayvan gübresi	5-15
Toprak	1-5
Arıtma çamuru	1-5
Taş kömürü	0-1

HA'nın kimyasal yapısı net olarak belirlenememiştir bu sebeple miktarını tam olarak belirleyecek analitik bir yöntem bulunmamaktadır. HA tayini için kullanılan bazı metodlar aşağıda incelenmiştir (TÜBİTAK MAM 2010).

- a. Kaliforniya Yöntemi (CDFA, 1983):** Kaliforniya Gıda ve Tarım Bakanlığı tarafından kabul edilen bu yöntemde katı numunelerden hümik asit elde etmek için 0.5N NaOH kullanılır. Daha sonra ürünün pH derecesi konsantre HCl kullanılarak 2'ye ayarlanır ve çöken hümik asit yıkanır, kurutulur ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla tartılır. Tez çalışmamızda CDFa metodu kullanılmıştır.
- b. Kalorimetrik Yöntem :**0–500 mg konsantrasyonlarında standart solüsyonlar hazırlanması için ticari reagent kalitesinde Aldrich HA sodyum tuzu kullanılır. Her bir hümik asit standart solüsyonunun 450 ya da 650 nm'de absorpsiyon ölçümlerinden bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Hümik asit 0.2M NaOH alkali ekstarktlarından alınan seyreltilmiş test numunelerinin absorpsiyon ölçülür ve bu ölçümler standart eğrideki hümik asitlerin hesaplanmasında kullanılır.
- c. Uluslararası Hümik Maddeler Topluluğu Yöntemi:**Bu yöntem, DAX–8 kolonu aracılığıyla hümik maddelerin sıvı numunesinin kullanılmasına

dayanmakta olup, hümik ve fülvik asit kolonda absorbe edilir. Hümik ve fülvik asit elde etmek için kolon 0.1N HCl ile yıkanır ve daha sonra tekrar 0.1N NaOH ile ayrıştırılır. HA'nın fülvik asitten ayrıştırılması için numune pH 1 derecesine kadar asitlendirilir. Daha sonra toplam organik karbon oranı ölçülerek % hümik ve fülvik asit oranı hesaplanır.

- d. Çin Yöntemi:** Hümik maddenin toplam karbon içeriğinin ve daha sonra 0.64 katsayısı baz alınarak toplam hümik içeriğinin belirlenmesinde kullanılacak işlenmemiş dikromat miktarının ölçülmesi için sıvı ürünlerin harici ısıtma ve geri titrasyon yöntemleri kullanılarak sulu oksidasyonu işlemidir.
- e. ISO 5073:** Bu yöntem kömür ve linyitten HA üretilmesi için pirofosfat ve NaOH kullanılan alkali hidrolize dayalıdır. Yöntemde, hümik maddenin toplam karbon içeriğinin ve 0.59 (kömürdeki ortalama karbon miktarı) katsayısı baz alınarak toplam hümik içeriğinin belirlenmesinde sulu oksidasyon işlemi uygulanır.

4.2.3. HA ve türevlerinin kullanım alanları

Hümik asit ve türevleri tarım alanında yoğun bir şekilde kullanılırlar. Bunun dışında kullanılan sanayi alanları aşağıda belirtilmiştir (TÜBİTAK MAM 2010).

Atık su arıtımı: Su arıtımında zehirli metal iyonların ve çözülebilir organik maddelerin uzaklaştırılmasında hümik asit ve türevleri kullanılır.

Çimento ve beton: betonlara sıvılaştırıcı, çimento ve betonda yoğunluk kontrol maddesi olarak kullanılır.

Sondajlama: Yağ ve su esaslı sondaj sıvılarında kayıp önleme katkı maddesi olarak kullanılır.

Kağıt: Bazı koyu renkli özel kağıtlarda özel dolgu maddesi olarak kullanılır.

Pil: Kurşun akümülatörlerinde yüzey aktif malzemesi olarak kullanılır.

Asfalt: Asfalt esaslı ürünlerin modifiye edilmesinde kullanılır.

4.3. Serviks Kanseri

Dünyada kadınlarda görülen en yaygın dördüncü kanser türü serviks kanseridir. (Ager ve ark., 2018). Her yıl yaklaşık 500.000 birey serviks kanserine yakalanmakta ve bunların 250.000'i hayatını kaybetmektedir. Serviks kanserine bağlı ölümlerin %80' inin az gelişmiş ülkelerde olduğu; gelişmekte olan ülkelerde de kanserden ölümlerin ana sebebinin serviks kanseri olduğu bilinmektedir.

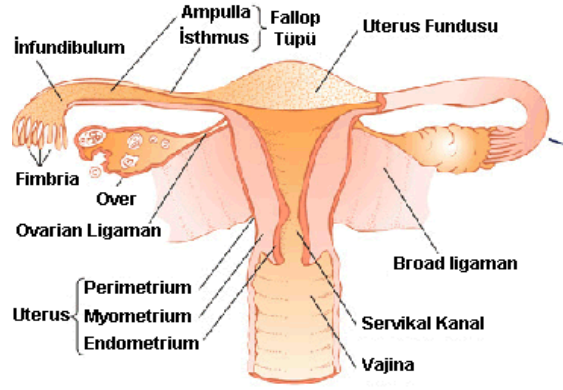
Human Papillom Virüsü (HPV) tekrar eden yüksek riskli enfeksiyonlarda serviks kanserinin ortaya çıkmasına sebep olur. Serviks kanseri olgularının neredeyse tümünde HPV enfeksiyonu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca genetik faktörler ve kişinin yaşam şartları da serviks kanserine yakalanma riskini etkilemektedir. Buna rağmen serviks kanserinin etiyojisi kesin olarak bilinmemektedir (Liao ve ark., 2017).

4.3.1. Serviks ve anatomik yerleşimi

Uterus, mesane ve rektum arasında yer alan, döllenmiş yumurtanın doğuma kadar gelişimini sağlayan bir organdır. Uterus'un uzunluğu yaklaşık 7.5 cm genişliğinde 5 cm eninde olup kalınlığı 2.5 cm kadardır. Serviks önde mesaneden gözenekli yağlı bir dokuyla ayrılır, yanda ise serviksin damar ve lenfatiklerinin bulunduğu ligamentum kardinale ve parametriumlar bulunur. Saat 4 ve 8 hizasında, sakrouterin bağlar sakruma doğru uzanır (Şekil 19).

Endoserviks mukus salgılayan kriptomlardan zengin stroma üzerinde yer alan tek katlı silindirik epitelyum ile, ektoserviks ise yoğun fibrözstroma üzerinde yer alan çok katlı yassı epitelyum ile örtülüdür.

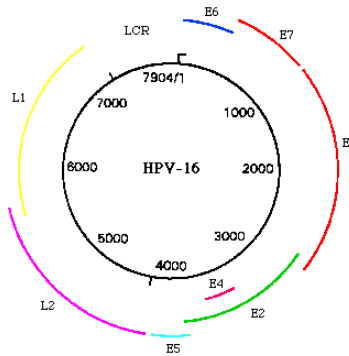
Orijinal yassı silindirik epitel sınırı ile metaplazisi tamamlandıktan sonra ortaya çıkan yeni yassı-silindirik epitel sınırı arasında kalan bölgede transformasyonzonu olarak adlandırılan bir geçiş bölgesi vardır ki bu bölge aktif metaplazi alanıdır ve genişliği yaklaşık 1-10 mm'dir. (Bushell ve Milles, 2004).



Şekil 19. Serviks ve anatomik yapısı (www.anatomi.gen.tr, erişim tarihi: 05.04.2018)

Dünya genelinde kadınlar üzerinde yapılan son araştırmalarda serviks kanseri 2. sıraya konulmuştur. Yeni serviks kanseri vakaları sürekli artış göstermesine rağmen insanlar üzerinde görülen kanser türleri arasında en önlenebilir olanıdır. Serviks kanserinin başlangıcı on yıllardır HPV enfeksiyonunun varlığına dayandırılır. HPV'nin 120 farklı türü insan cildine ve mukozasına bulaşabilir. Bunlardan sadece 13-15'i serviks kanserinde ve yüksek riskli olarak adlandırılan kanser türlerinde bulunur. Bunlardan HPV-16 en önemli olanıdır ve genomik haritası en ayrıntılı belirlenmiş olan HPV tipidir. Şekil 20'de HPV-16'nın genomik haritası belirtilmiştir.

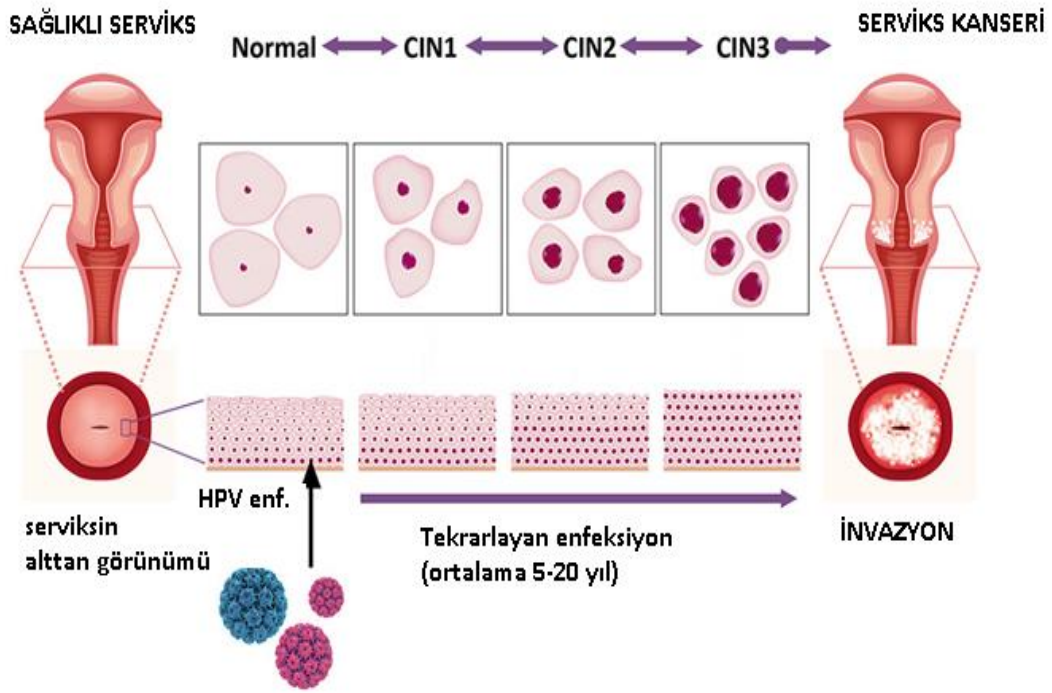
HPV-16 dünya genelinde serviks kanseri vakalarının yaklaşık olarak %50' si ile bağlantılıdır. Özellikle 20'li yaşların başında olan kadınlarda HPV ye bağlı olarak gelişen serviks kanseri oldukça yaygındır (Petry, 2014).



Şekil 20. HPV-16'nın genomik haritası (www.wikiwand.com, erişim tarihi: 05.04.2018)

Rahim ağzında tek bir bölgede, genellikle transformasyon alanı denilen bölgede başlayan CIN (cervical intra epithelial neoplasia) kanser olmayıp kanser öncüsü bir lezyondur. Rahim ağzının üst dokusunu tutmadaki derinliğine göre gruplandırılmaktadır (Şekil 21).

Epitelyal yüzeyin %25'i tutulmuş ise CIN 1 (hafif displazi), %50'si tutulmuş ise CIN 2 (orta derece displazi) ve %75 veya üzeri tutulmuş ise CIN 3 (ağır displazi) olarak sınıflandırılır. Hafif derecede olan displazinin (CIN 1), ağır displaziye (CIN 3) geçmesi için uzun yıllar gerekmektedir. CIN 3 zamanla serviks kanserine dönüşmektedir (Origoni ve ark., 2014).



Şekil 21. Serviks kanserinin oluşum süreci (<http://e-wiki.org>, erişim tarihi: 05.05.2018)

4.3.2. Serviks kanserinin belirtileri

Serviks kanserinin bilinen çok sayıda belirtisi vardır. Bu belirtiler kişinin yaşına beslenme alışkanlıklarına ve sağlıklı yaşam becerilerine göre değişkenlik gösterir. Serviks kanserinde görülen olası belirtiler aşağıda belirtilmiştir.

- ✓ Aşırı pelvik ağrısı,
 - ✓ Cinsel ilişki süresince ağrı,
 - ✓ Regl dönemleri arası birden fazla kanama olması,
 - ✓ Menopoz sonrası kanama
- (<http://www.cuhk.edu.hk/sphpc/hpvselfsampling/en/cc-n-hpv.html>).

4.3.3. Serviks kanseri için risk faktörleri

Serviks kanseri oluşumuna sebep olan risk faktörleri aşağıda belirtilmiştir. (Winkelstein ve ark., 1977);

- ✓ Erken yaşta cinsel ilişki,
- ✓ Birden fazla seks partneri,
- ✓ Cinsel yolla bulaşan hastalıklar,
- ✓ Sigara kullanımı,
- ✓ Zayıflamış immün sistem,
- ✓ Uzun süre doğum kontrol hapı kullanmak (5 ve üzeri yıl),
- ✓ 3 veya daha fazla çocuk doğurmuş olmak ve ilk hamileliğini erken yaşlarda geçirmek.

4.3.4. Serviks kanseri tanı yöntemleri

Serviks kanserinin erken tanısında kullanılan iki yöntem vardır. Bunlar ;

- a. Smear testi: Serviks ve vajen epitelinden dökülen normal hücreler ve hastalık nedeni ile değişmiş hücrelerin incelenmesine dayanan bir testtir (Durusoy, 2014).

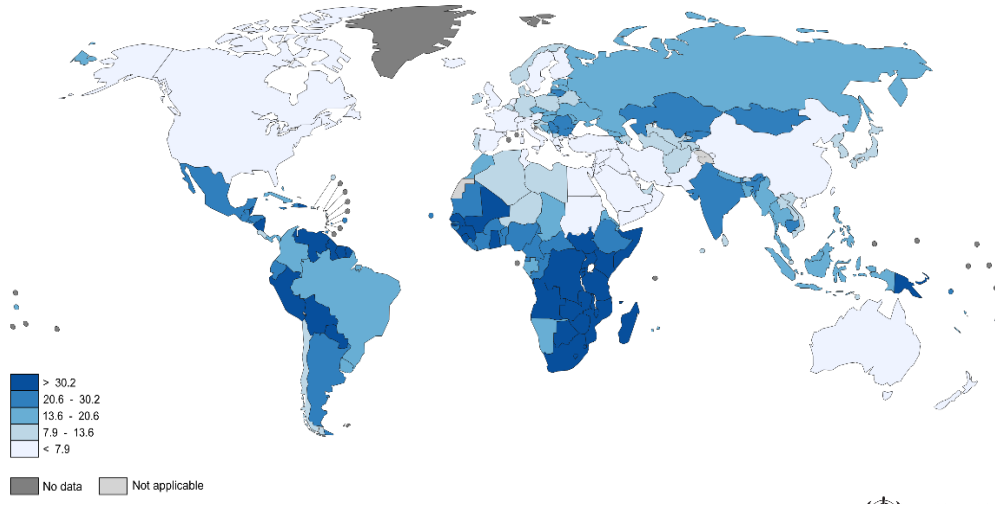
PAP smear testi ile preinvaziv ve kanseröz dönemdeki hücreler endoservikal kanalda saptanmakta ve bu aşamadaki kanser tedavisi ile hücreler kansere dönüşmeden kanser gelişimi önlenmektedir (Demirgöz, 2014).

b. HPV testi: Mevcut tüm servikal tarama testleri içerisinde, HPV testi en objektif ve tekrarlanabilir olanıdır. HPV DNA testinin serviks kanseri ile ilişkisi artık kanıtlanmış olup, serviks kanserli hastaların %99,9'unda HPV DNA varlığı gösterilmiştir (Baran, 2013). Son yıllarda geliştirilen HPV DNA testinin sitolojik veya diğer bilinen tarama yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Örenli, 2015)

4.3.5. Dünya'da ve Türkiye'de serviks kanseri

Serviks kanseri, dünyada, kadınlarda meme ve kolorektal kanserlerin ardından dördüncü en sık görülen kanser olup önemli bir halk sağlığı sorunudur. Yaşa göre düzeltilmiş insidans oranı 14/100 000 olarak tespit edilen kanserin mortalitesi 6,8/100 000 olarak bildirilmiştir. 2012 yılı içerisinde, 528 000 yeni vakanın tanı aldığı, 266.000 hastanın kaybedildiği ve bu oranın tüm kadın kanserlerine bağlı ölümler içerisinde 7,5/100 000 olduğu tespit edilmiştir. Bu ölümlerin yaklaşık %87'si, serviks kanserinin 15,7/100 000'lik insidans oranı ile ikinci sırada görüldüğü az gelişmiş ülkelerde meydana gelmiştir. Bu ülkeler arasında en yüksek oranlara sahip olanlar 100 000 kişi başına 42,7 ile Doğu Afrika; 33,3 ile Malezya; 31,5 ile Güney Afrika ve 30,6 ile Orta Afrika'dır.

Serviks kanseri, Doğu ve Orta Afrika'da kadınlarda en sık görülen kanser olarak raporlanmıştır (Erişim adresi: <http://globocan.iarc.fr>, Erişim tarihi:21.07.2018) (Şekil 22).



Şekil 22. 2012 yılında dünya çapında tahmini servikal kanser insidansı (WHO 2012)

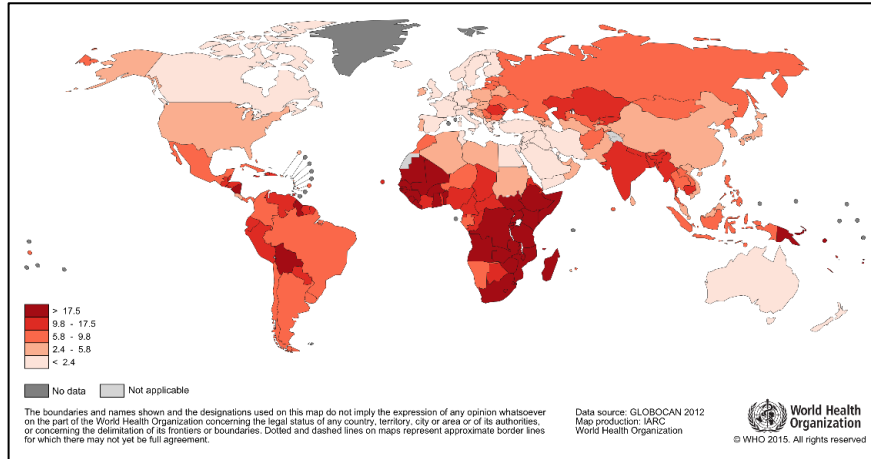
Dünyada kadınlarda serviks kanseri meme kanseri ve kolorektal kanserden sonra dördüncü sırada görülür (Ferly J, 2008). Uzun yıllardır geliştirilen smear tarama testi ile özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde serviks kanseri morbidite ve mortalitesinde yaklaşık %70 azalma görülmektedir. (Kitchener ve ark., 2008) gelişmiş ülkelerde tarama testleri çok yaygın olduğundan serviks kanserinden meydana gelen kayıpların yaklaşık%90'nı az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Dünyada Afrika ülkeleri ve Hindistan ile Orta ve Güney Amerika ülkeleri hastalığın sık görüldüğü bölgeler olarak bilinmektedir. Bu ülkelerin bazılarında yıllık serviks kanseri insidans hızı yüz binde 90 hatta daha üzerindedir.

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı Kanser dairesi 2008 verilerine göre kadınlarda tüm kanserlerin yaşa standardize edilmiş hızı (YSH; Age Standardized Rate, ASR) 100 000’de 172, serviks kanserinin ise 4,2’dir. Yani bir yılda görülen toplam kanserli kadın sayısı yaklaşık 63 148 iken, bunların içinde serviks kanseri olgu sayısı yaklaşık 1691 olup, toplam olgu sayısının %2,7’sini oluşturmaktadır. Mortalite verileri incelendiğinde ise Türkiye’de bir yılda kanserden ölen toplam 24 512 kadın içinde servikal kanserden ölen 556 kadının oranının %2,3 olduğu görülmektedir.

Ülkemizde görülen servikal kanser vakalarının ortalama yaşı 48,7’dir ve ne yazık ki olguların yarısı kür şansının yitirildiği ileri evrede teşhis almaktadır. (Kanser İstatistikleri, 2013). Serviks kanserinin ülkeler arasındaki dengesiz dağılımı üzerinde etkili olan faktörlerin başında sosyoekonomik durum gelmektedir. Ulusal veya

uluslararası eğitim, maddi yaşam koşulları, cinsiyet, sağlık hizmeti ve bu hizmete ulaşmada yaşanan sosyal eşitsizlikler kanser oranlarında farklılığa yol açmaktadır (Wilkinson ve Marmot, 2013).

Serviks kanseri vakalarının neredeyse tamamında bulunan HPV enfeksiyonuna karşı geliştirilen HPV aşısının 2006 yılında kullanıma girmesinin ardından, serviks kanseri için var olan global eşitsizliğin son bulması ve insidans ve mortalitenin azalması yönünde umutlar artmıştır. Yüksek riskli HPV tiplerine karşı immünite gelişmesini sağlayarak, serviks kanserinden korunmada güvenli ve etkin olduğu ispatlanan HPV aşısı ABD, Kanada, Avustralya, İngiltere, Meksika ve Hong Kong gibi ülkeler başta olmak üzere birçok ülkede rutin aşı programına dahil edilmiştir. (Paavonen ve ark. 2009) 2007 yılında Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) kurul kararı ile 9-26 yaş arası kız çocukları üç dozdan oluşan (0, 2 ve 6. Ay) aşı programına alınmışlardır. (Thomas ve ark., 2013) Ne var ki, serviks kanserinin kadın kanserlerinin ilk sırasında yer aldığı Doğu ve Orta Afrika başta olmak üzere Afrika bölgesinde, yüksek maliyetler sebebiyle HPV aşısı rutin uygulamada değildir. Bu ülkelerin çoğu, aşının tek bir dozu için bile ödenek ayıracak bir bütçeye sahip değildirler. (Campos ve ark. 2012) (Şekil 23).



Şekil 23. 2012'de Dünya tahmini servikal kanser ölümleri

Türkiye’de, ülke genelinde serviks kanseri tarama programı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Aile Sağlığı Merkezleri (ASM) ve Toplum Sağlığı Merkezleri (TSM) bünyesindeki Kanser Erken Teşhis, Tarama ve Eğitim Merkezleri (KETEM) tarafından yürütülmektedir. 30-65 yaş arası kadınlara PAP smear taraması yapılmakta, sonuçlar takip edilmekte ve patoloji tespit edilenler ileri merkezlerdeki kadın hastalıkları ve doğum hekimlerine yönlendirilmektedirler. Sorunsuz sonuçlar varlığında ise 5 yıllık aralarla tarama devam etmektedir. Türkiye’de son 1 yıl içerisinde smear testi yaptıran kadınların oranı %10,9 iken hiçbir zaman smear testi yaptırmayan kadınların oranı %69,3 ile oldukça fazladır (Tablo 9) (TÜİK Türkiye Sağlık Araştırması 2016).

Tablo 9. 15 yaş ve üzeri kadınların smear yaptırma durumunun dağılımı (%-2016)

Smear yaptırma zamanı	%
Son bir yıl içerisinde	10,9
1 yıldan çok, 2 yıldan az	7,9
2 yıldan çok, 3 yıldan az	3,6
3 yıldan çok, 5 yıldan az	3,2
5 yıldan fazla	5,1
Hiçbir zaman	69,3

2010 yılı içinde Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre KETEM tarafından 134 039 kadın, diğer sağlık kuruluşları (il ve ilçe devlet hastaneleri, üniversite hastaneleri, eğitim ve araştırma hastaneleri) tarafından ise 1 467 662 kadın serviks kanseri açısından taranmıştır. KETEM tarafından 17 merkezde yapılan 3500 serviks kanseri taramasındaki HPV prevalansı %2,9 olarak belirtilmiştir (Mollahaliloğlu ve ark., 2010) Ülkemizde HPV aşısı 2007 yılında ruhsatlandırılmış ancak rutin aşı takvimine henüz alınmamıştır.

4.4. HPLC Çalışma Prensibi

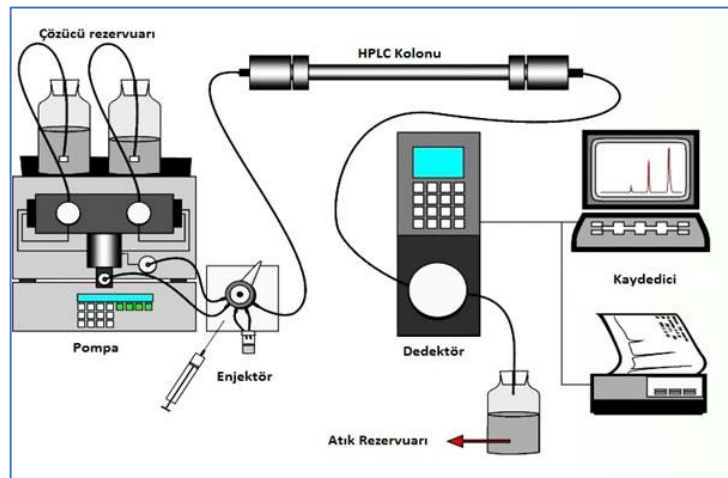
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi olarak adlandırılan yöntem analitik olarak en yaygın kullanılan tekniklerden birtanesidir. HPLC hem nitel hem nicel olarak çalışabilme imkanı sunar. Kromatografik süreçler genel olarak durgun ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanır.

HPLC’de ise hareketli faz olarak sıvılar kullanılır. İlk olarak ayrılması beklenen madde uygun bir çözücüde çözünür ve yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Burada çalışılan maddenin molekül yapısına uygun kolon tercih edilir. Kolondan çıkan maddenin alıkonma süresi hesaplanır.

HPLC yöntemi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında aşağıdaki sebeplerden dolayı diğer yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir.

- Küçük boyutlu paslanmaz kolonların kullanılması
- Yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızı sağlanabilmesi
- Örnek gereksinimlerinin az olması
- Hızlı analiz imkanı sunması
- Yüksek ayırma gücüne sahip olması

Bir HPLC cihazı enjektör, pompa, kolon, dedektör ve kaydedici olmak üzere 5 ana kısımdan oluşur. Bu kısımlar şekil 24’de verilmiştir.



Şekil 24: HPLC cihazının kısımları (inovatifkimyadergisi.com, erişim tarihi: 05.03.2019)

Kromatografik süreç kullanılacak çözeltinin enjeksiyonu ile başlar. Bu aşamada manuel olarak enjeksiyon yapılabileceği gibi otomatik enjeksiyon özelliğine sahip cihazlarda vardır. Enjekte edilen çözelti pompa yardımıyla kolona iletilir. Kolonda dolgu malzemeleri kullanılır. Bu malzemeler genellikle silika veya alüminadır. Bu sabit faz üzerinde çözelti içerisinde bulunan her bir bileşenin tutunma süresi farklılık gösterir.

Kolonun sonuna gelen maddenin verileri dedektör tarafından okunur ve kaydedici bilgisayarda kromatogram halini alır. Çalışmalar sırasında ayırma yöntemine göre hareketli faz seçilir burada her bir hareketli faz için gaz alma (degassing) işlemi yapılır. Gaz alma işlemi yapılmadığında pik genişlemesi gözlenir.

5. MATERYAL ve METOT

5.1. Kullanılan Cihazlar

- ✓ HPLC (Agilent1100)
- ✓ Manuel enjektör
- ✓ Rotaryevaporatör (Heidolph VV 2000)
- ✓ Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
- ✓ Hassas teraziler (SBC 31 (Scaltec))
- ✓ Mikro plaka okuyucu (EPOCH, Biotek)
- ✓ Santrifüj (Hettich Universal 320)
- ✓ CO₂'li inkübatör (MCO-19AIC (UV))
- ✓ Otoklav (Hirayama HV-50L)
- ✓ İnvirt mikroskop
- ✓ -80 0C ve -20 0C dondurucu buzdolapları
- ✓ Çalkalamalı inkübatör (BiosanType Es-20)
- ✓ Derin dondurucu (Beko D9459NM)
- ✓ Su banyosu (GFL 1083)
- ✓ Laminar kabin (Class II BiosafetyCabinet, ESCO)
- ✓ Vorteks (Ika MS2 Minishaker)
- ✓ Etüv (Binder)
- ✓ Ependorf tüp (0.5-2 ml)
- ✓ Falcon tüp (15-50ml)
- ✓ 96'lı wellplate
- ✓ Steril petri kabı
- ✓ 25 cm²'lik sterilflask
- ✓ 0.44 um'liksteril filtre
- ✓ 5 ml'lik steril enjektör
- ✓ Mikro pipetler (5-5000 µl)
- ✓ Pastör fırını (Elektro-Mag)
- ✓ UV-VisibleSpektrofotometre (Shimadzu BioSpec-1601)
- ✓ Punch (6 mm çapında)

5.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma, Aldrich ve Tekkim'den satın alındı.

- ✓ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone)
- ✓ Phosphate Buffered Saline (PBS) (Hyclone)
- ✓ Fetal Bovine Serum (FBS)
- ✓ Dimetilsülfoksit (DMSO)
- ✓ MTT
- ✓ Tripsin-EDTA
- ✓ DPPH çözeltisi
- ✓ Sodyum azid çözeltisi (NaN_3)
- ✓ KH_2PO_4 (potasyum fosfat monobazik)
- ✓ K_2HPO_4 (potasyum fosfat)
- ✓ Sodyum hidroksit (NaOH)
- ✓ Hidroklorik asit (HCl)

5.3. HA Karakterizasyonu

Sigma-Aidrich Co.'den temin edilen HA standardı kullanılarak öncelikle kalibrasyon eğrisi oluşturulması amaçlandı. Bunun için ilk olarak, klasik spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bu yöntemde HA'nın çözünürlüğünün maksimum seviyede olduğu şartlar saptanmaya çalışıldı. Çözünürlüğüne etki eden koşullar arasından sıcaklık ve karıştırma süresi olmak üzere iki değişken üzerinde çalışıldı.

5.3.1. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

HA standardının çözündüğü optimum sıcaklık değerinin bulunması için spektrofotometrik yöntem kullanıldı ve diğer parametreler sabit tutuldu. Bunun için 30, 40, 60, 70 ve 80°C olmak üzere 5 farklı sıcaklık değeri test edildi. Yapılan literatür taraması sonucu en uygun NaOH konsantrasyonunun 0,01 M olduğu belirlendiği için HA stok çözeltisi 1mg/mL olacak şekilde 0,01 M NaOH ile hazırlandı. Her bir sıcaklık değeri için 3 tekrar yapıldı ve elde edilen değerlerin ortalaması alındı.

5.3.2. Karıştırma süresinin belirlenmesi

HA standardının çözündüğü optimum karıştırma süresinin bulunması için 5, 15, 30, 60 ve 90 dakika olmak üzere 5 farklı zaman aralığı denendi. Her bir süre değeri için 3 tekrar yapıldı ve elde edilen değerlerin ortalaması alındı.

5.3.3. HA standart grafiğinin oluşturulması

Optimum sıcaklık ve karıştırma süreleri belirlendikten sonra HA için standart grafiği iki farklı yöntem kullanılarak belirlendi. Birinci yöntemde, 1mg/mL olacak şekilde hazırlanan stok çözeltiden 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 mL alınarak ayrı ayrı 10 mL tamamlandı ve hazırlanan örnekler spektrofotometrede 260 nm'de okunarak kalibrasyon eğrisi çizildi.

Topraktan izole edilecek olan HA'nın karakterizasyonu işlemleri Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (YBSK) ile takip edileceği için HA standart grafiği, YBSK cihazında da çalışıldı. Bunun için, Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarında bulunan Agilent 1100 Serisi YBSK sistemi kullanıldı (Resim 1).

Waters 600 pompa, Agilent 1100 UV dedektör ve degaze edici sistem ile Agilent ChemStation yazılım programı kullanılarak işlemler gerçekleştirildi. Öncelikle HA, belirlenen sıcaklık ve karıştırma sürelerinde 0,01 M NaOH ile çözüldü. Çalışmamızın ilk işlemleri için, Merck marka C18 kolon (4,6 mm çap ve 250 mm uzunluk) seçildi. Mobil faz olarak su-metanol kullanıldı ve 50:50, 70:30, 30:70 olmak üzere 3 farklı oran denendi. Stok çözültiden standart eğrisi oluşturulmak için 20, 40, 50, 80 ve 100 µl olmak üzere 5 hacim alınarak her bir hacim değeri için 3 enjeksiyon yapıldı. Yapılan enjeksiyonlar sırasında çözücüden gelen pikleri bertaraf edebilmek için aynı hacim birimlerinde 0,01 M NaOH yine 3'er kez enjekte edildi. Elde edilen sonuçlara ait kromatogramlar bulgular bölümünde verilmiştir. Bu yöntemle piklerde anlamlı bir ayrışma gözlenemediği için yöntem değişikliğine gidilerek kolonun değiştirilmesine karar verildi.



Resim 1. Agilent 1100 serisi YBSK sistemi

HA'nın yüksek molekül ağırlığı göz önüne alınarak, 7.8 mm x 300 mm çapında ve 10 µ por büyüklüğüne sahip Protein Pak-125 kolonu kullanıldı ve 0,01 M NaOH ile akış hızı 1 ml/dak olarak ayarlandı. Bu kolon, molekül ağırlığı 2000-8000 kDa aralığındaki maddeleri ayırmada kullanılmaktadır. Yapmış olduğumuz bir diğer değişiklik ise pH aralığının 2-8 olması gerektiği için mobil faz olarak su-etanol yerine 0,1 M fosfat tamponu kullanımıdır.

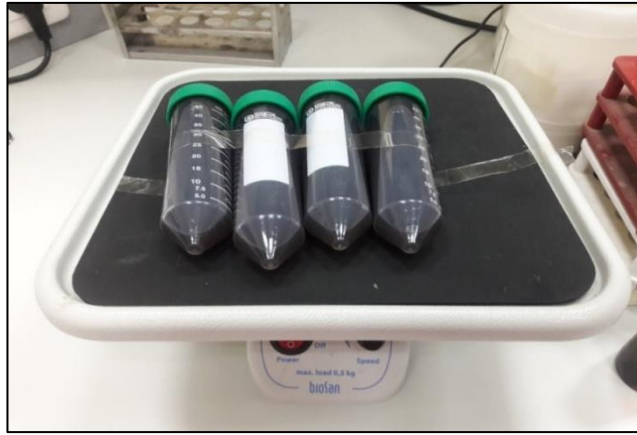
Kolon ve mobil faz seçimi yapıldıktan sonra 1mg/mL olacak şekilde HA stok çözeltisi hazırlandı. Standart HA eğrisi oluşturulması için stok çözeltiden 10, 20, 50, 80 ve 100 µl alınarak enjekte edildi. Çalışmadaki standart hatayı minimuma indirmek ve güvenilirliği yükseltmek için her hacim birimi 3'er kez çalışıldı.

5.4. Toprakta HA İzolasyonu

Tez çalışmasının genel bilgiler kısmında HA izolasyon yöntemleri anlatılmıştır. Bu metodlardan, Kaliforniya Tarım ve Gıda Bölümü (CDFA) tarafından geliştirilen HA4/JC numaralı CDFA metodunda HCl asit kullanıldığı ve analiz sonuçlarında yalnızca HA değerleri tespit edildiği için bu yöntemle izolasyon yapmaya karar verdik.

CDFA metoduyla izolasyon için aşağıdaki işlem basamakları uygulandı.

- ✓ Humik asit içerikli toprak numunesinden 0.2 g alındı ve 50 mL'lik Falcon tüplere aktararak üzerine 50 ml 1N NaOH eklendi.
- ✓ NaOH eklenen toprak örneğini içeren tüpler 30 dk mekanik karıştırıcıda karıştırıldı (Resim 2).



Resim 2. Örneklerin mekanik çalkalayıcıda karıştırılması

- ✓ Süre sonunda örneklerin üzerine 5ml %1 NaOH eklendikten sonra 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj yapıldı. Üstte kalan sıvı (süpernatant) başka bir Falcon tüpüne aktarıldı. Pellet üzerine 10 ml %1 NaOH eklendi, 30 dakika

boyunca mekanik çalkalayıcıda çalkalandı ve 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi (Resim 3).



Resim 3. Örneklerin santrifüjlenmesi

- ✓ Santrifüj sonrası tüplerde bulunan süpernatant daha önceki basamakta alınan süpernatant ile birleştirildi ve pH'sı 1-2 arasına gelene kadar HCl ilave edildi. Daha sonra 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj yapıldı ve üstte kalan sıvı kısım atıldı (Resim 4).



Resim 4. Santrifüj sonrası elde edilen örnekler

- ✓ Tüplerde bulunan pellet üzerine 25 ml saf su (önceden pH'sı HCl yardımı ile 1-2 arasına indirilmiş) eklendi, çalkalandı ve 2000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. 25 ml saf su ekleme, çalkalama, santrifüj ve süpernatantın atılma işlemleri 2 kez daha yapıldı. Pellet 100-110°C'de etüvde 1 gece

bırakılarak kurutuldu (Resim 5). Desikatörde soğutularak tartımı yapıldı. Bu yöntemin yapılması bir örnek için 1 gün sürmektedir.



Resim 5. HA içeren örneğin etüvde kurutulması

Kullanılan örnekte saflaştırma sonucu elde edilen maddenin katı yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

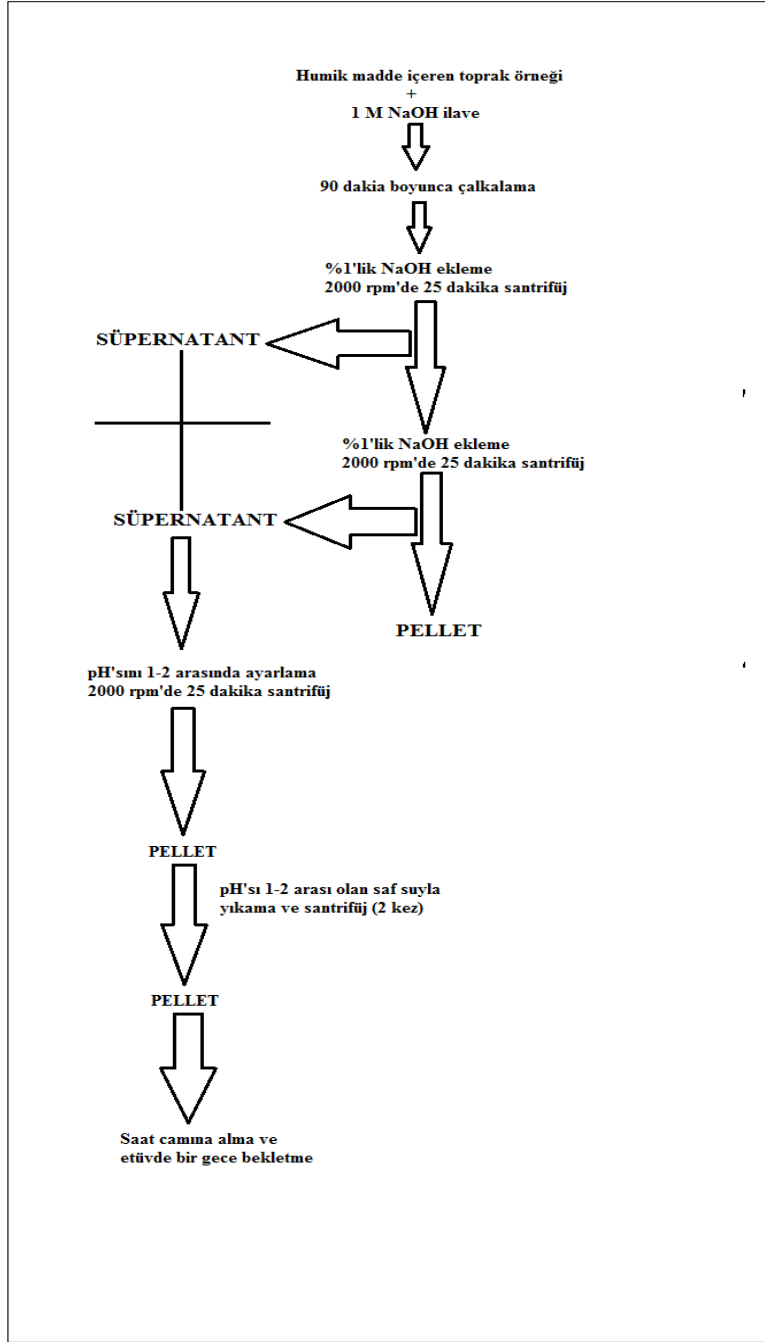
$$\% \text{katı madde} = (m/n) \cdot 100$$

m: etüv sonrası tartılan örnek (g)

n: alınan örnek (g)

Elde edilen HA örneği etüvden alındıktan sonra 0,01 M NaOH ile çözüldü. 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlandı. YBSK ile analiz yapılması için standart için belirlenen koşullarda 20, 50, 80 ve 100 µl olmak üzere 4 hacim birimi 3'er kez olmak üzere enjekte edildi.

Elde edilen sonuçlar kullanılarak örneğe ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Şekil 25'de topraktan hümik asit izolasyonunu gösteren akış şeması verilmiştir.



Şekil 25. HA izolasyonunu gösteren diyagram

5.5. Çözeltilerin Hazırlanması

0,1 M fosfat tamponu: Fosfat tamponu için 1M K_2PO_4 ve 1 M KH_2PO_4 toplam hacim 1000 mL olacak şekilde karıştırıldı.

1M K_2HPO_4 : 17,418 g K_2HPO_4 tartıldı bir miktar saf su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1M KH_2PO_4 : 13,609 g KH_2PO_4 tartıldı bir miktar saf su ile çözülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

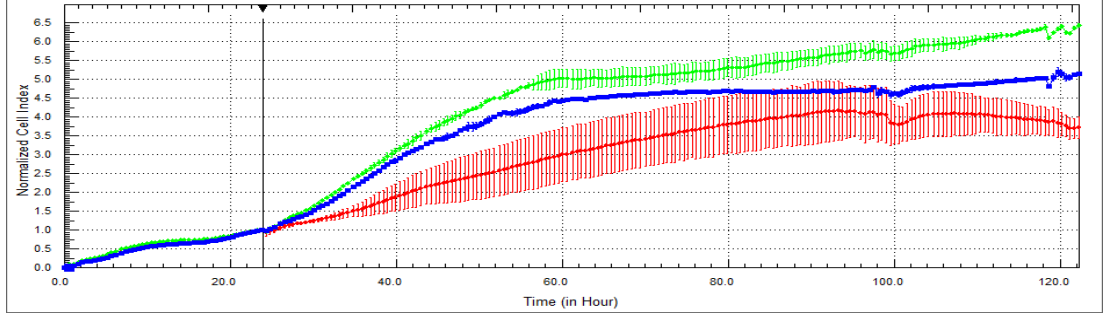
1 M K_2HPO_4 çözeltisinden 61,5 mL, 1M K_2HPO_4 çözeltisinden 38,5 mL alındı ve toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

% 0,05'lik NaN_3 : 0,125 g NaN_3 tartılarak bir miktar saf su ile çözüldü ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

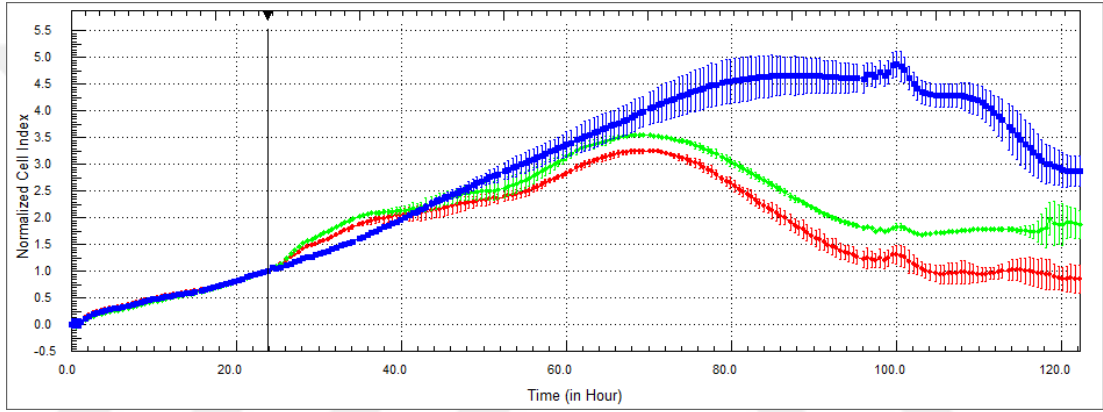
HA standardı: 10 mg HA tartıldı ve 1 mL 0,1 M NaOH ile çözüldükten sonra fosfat tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı.

5.6. İzole edilen HA'nın Antikanserojenik Etkilerinin Belirlenmesi

Anabilim Dalımızda yaptığımız ön çalışmalarda, ticari olarak satın alınmış olan HA'nın 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda insan meme (MCF-7) ve serviks kanseri (HeLa) hücre hatlarında olası antikanserojenik etkilerini incelemiştik. Gerçek zamanlı hücre ölçer cihazında (X- CELLigence RTCA DP, AceaBioscience) yapmış olduğumuz sitotoksite analizleri sonucunda, HA'nın bu iki farklı hücre hattı üzerinde doza bağlı olarak birbiriyle zıt etkiler ortaya koyduğunu belirlemiştik. Şöyle ki, hümkik asit doza bağlı olarak MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunu artırırken HeLa hücrelerinde yine doza bağlı olarak inhibisyona neden olmuştur (Şekil 26). Bu ön çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara dayanarak bu tez çalışmasını planladık.



Şekil 26. MCF-7 hücre üzerine HA'nın zaman ve doza bağlı etkisinin sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği



Şekil 27. HeLa hücreleri üzerine HA'nın zaman ve doza bağlı etkisinin sonucunda gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilen hücre indeksi grafiği

5.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa) ile non-kanserojenik hücre hattı olan fare embriyonik fibroblast (NIH 3T3) hücreleri kullanıldı.

5.7.1. Hücrelerin çözülmesi

Dondurulmuş hücrelerin hızlı bir şekilde çözündürülmesi gerektiği için içerisinde dondurulmuş hücre bulunan ve -80°C 'den alınan kriyotüpler, 37°C 'ye ısıtılmış su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü. Ardından kriyotüp içeriği, içerisinde 10 mL besiyeri bulunan Falcon tüpe yavaş bir şekilde aktarıldı, 1500 rpm'de 4 dk santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pellet flask büyüklüğüne göre uygun miktarda besiyeri ile homojenize edildikten sonra hücreler flaska alındı, 37 °C’de %5 CO₂’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler flask yüzeyini doldurana kadar iki günde bir besiyeri değiştirildi, flask yüzeyi dolduğunda ise hücrelerinin canlılığını devam ettirmek için pasajlama işlemi yapıldı.

5.7.2. Hücrelerin pasajlanması

Flaskta %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanırken öncelikle eski besiyeri uzaklaştırıldı, ardından 1-2 ml 1X’lik PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak amacıyla flaska 1-2 ml %0.05’lik Tripsin-EDTA eklendi, hücreler 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 1-2 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında mikroskopta hücrelerin kalktığı tespit edildikten sonra, flaska Tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı kadar taze besiyeri ilave edildi, hücre-besiyeri içeriği pipet ile homojenize edildikten sonra falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm’de 4 dk santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatant atıldı, pellet 10 ml besiyeri ile homojenize edildi. Tripkan mavi boyası ile sayım lamı kullanılarak hücreler ışık mikroskobu altında sayıldı. Hücre sayımı sonrasında hücre yoğunluğuna göre hücreler flasklara bölündü, çoğalmaları için 37 °C’de % 5 CO₂’lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

5.7.3. Hücre sayısının hesaplanması

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe kondu ve üzerine 90 µl PBS eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak alt ve üst bölmelerdeki hücreler sayıldı, daha sonra bulunan bu sayının yarısı x dilüsyon faktörü (1/10) x 10⁴ şeklinde çarpıldı. Sonuç olarak 1 ml medyumda ne kadar sayıda hücre olduğu bulundu. Böylece ekim yapılacak sayı belirlenip 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 10⁴ hücre transfer edildi.

$$\text{Hücre sayısı (mL)} = \text{Hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon oranı} \times 10.000$$

5.7.4. MTT metodu ile antikanserojenik aktivitenin belirlenmesi

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheniltetrazolium bromid), hücre proliferasyonunu, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir.

Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır. Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur, ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondriyelerinde süksinat-dehidrogenaz (SDH) enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Bu esnada oluşan renk kolorimetrik olarak ölçülür. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. MTT sitotoksititeyi belirlemeyi amaçlayan kantitatif bir yöntemdir ve yaşayan hücrelerin tespit edilmesini sağlar.

HeLa ve NIH3T3 hücre hatlarında Beekman ve arkadaşlarının kullandığı metot modifiye edilerek HA'nın antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırıldı (Beekman ve ark., 1997). MTT deney çalışmaları 96 kuyucuklu kültür plakalarında gerçekleştirildi. Çalışmada MTT kiti (Vybrant) prosedürüne uygun olarak deneyler gerçekleştirildi.

HA'nın antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesinden önce HA'nın içerisinde çözündüğü NaOH'ın çeşitli konsantrasyonları (1, 0.1 ve 0.01N) kullanılarak çözücünün hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gösterip göstermediği belirlendi. Hücreler için en uygun konsantrasyon tespit edildikten sonra antikanserojenik etkiler araştırıldı. Deneyler 3 tekrarlı yapıldı ve 72. saatte sonlandırıldı.

Deneyin yapılışı: MTT yönteminin uygulanmasından 1 gün önce 96'lik plaka kuyularına 1×10^4 hücre ekimi yapıldı. Mikroplaka, 24 saat 37°C ve %5 CO_2 ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Böylece bu yolla medyum içerisindeki terapötik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanması sağlanır. 24 saatlik inkübasyondan sonra seri dilasyonlar halinde hazırlanan örnekler (5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) kuyucuklara eklendi. 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki bütün medyum boşaltıldı, daha sonra kuyucuklar PBS ile yıkandı. Temizlenen her kuyucuğa 100 μl taze medium eklendi. 1 mL PBS eklenerek çözülen MTT boyası vortekslenerek süspansiyon edildi.

Hazırlanan MTT'den her kuyucuğa 10 µl eklendi ve etüvde 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Dört saat sonunda 10 mL PBS-HCl ile hazırlanan SDS'den her kuyucuğa 100 µl aktarıldı ve plakalar formazon kristallerinin çözülmesi için 12-16 saat süresince inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonunda mikrolakalar, mikrolaka okuyucusunda (EPOCH, Biotek) 570 nm absorbans değerinde ölçüldü.

5.7.5. Gerçek zamanlı hücre ölçer sistemiyle hücre indeksinin belirlenmesi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametresinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu e-plate kullanılmıştır. Öncelikle e-plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl besiyeri eklendikten sonra cihaza konularak "background" ölçümleri yapıldı. Daha sonra HeLa hücreleri için 100 µl besiyerinde 7500 hücre, NIH-3T3 hücreleri için ise 100 µl besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde her bir kuyucuğa ekim yapıldı. Bu işlemin ardında plate'ler 30 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde inkübe edildikten sonra xCELLigence DP cihazındaki yerlerine yerleştirilerek 37°C ve %5 CO₂ ortam şartlarında inkübasyona bırakıldı. E-Plate'lere hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra xCELLigence DP cihazına her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verildi. Hücre ekiminde yaklaşık 24 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde e-plate'lerdeki besiyeri çeşitli konsantrasyonlardaki hümmik asit konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirilerek 120 saat süresince 15 dakika aralıklarla ölçüm alınmaya devam edildi. Konsantrasyona ve zamana bağımlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler bilgisayar ekranına aktarıldı.

5.7.6. Apoptoz deneyleri

HA'nın HeLa hücreleri üzerinde oluşturduğu antikanserojenik etkinin mekanizmasını belirlemek amacıyla apoptoz çalışmaları da yapıldı. Fizyolojik hücre ölümü veya programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, özellikle kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasında büyük bir öneme sahiptir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viralbakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmyc gibi) yer aldığı bilinmektedir.

Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklere neden olur.

Apoptotik hücre ölümünde kaspazlar olarak bilinen sistein proteaz ailesi tarafından yürütülen iki süreç vardır: Kaspaz-8 tarafından başlatılan ekstrinsik yolak ve kaspaz-9 tarafından tetiklenen intrinsik yolakların aktivasyonu ile hücre ölümü tetiklenmektedir. Ekstrinsik ya da intrinsik apoptotik süreçler sonunda en yaygın ölçülen kaspaz aktivitesi kaspaz-3'tür (Özsavcı ve ark. 2011). Biz de çalışmamızda apoptotik mekanizmayı belirlemek için çeşitli biyokimyasal ve morfolojik deneyler gerçekleştirdik.

5.7.7. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonlarının ölçümü

Yine ticari olarak satın alınan kaspaz 3, 8 ve 9 kitleri ile aktivasyon ölçülüp hangi yolak veya yolakların etkili olduğu spektrofotometrik olarak belirlendi. Her 3 kaspaz proteini enzimatik olarak ölçüldü.

Kaspaz-3 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-3 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınan kaspaz-3 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçüldü. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi peptid substrat Acetyl Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilid'in (Ac-DEVD-*p*NA) kaspaz-3 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan *p*-nitroanilid (*p*NA) miktarının 405 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (Şenkardeş ve ark. 2016).

Kaspaz 9 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz 9 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınan kaspaz-9 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçülecektir.

Peptid substrat Ac-LEHD-*p*NA kaspaz-9 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan *p*NA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-9 aktivitesi hesaplanacaktır.

Kaspaz -8 Kolorimetrik Analizi: Kaspaz-8 enzim aktivitesi ticari olarak satın alınan kaspaz-8 deney kitinde belirtilen yöntem ile ölçüldü. Peptid substrat Ac-IETD-*p*NA kaspaz-8 tarafından parçalandıktan sonra serbest kalan *p*NA'nın ortaya çıkarttığı renk şiddeti 405 nm de spektrofotometrik olarak ölçülerek kaspaz-8 aktivitesi hesaplandı.

5.7.8. Mitokondri membran potansiyelinin belirlenmesi

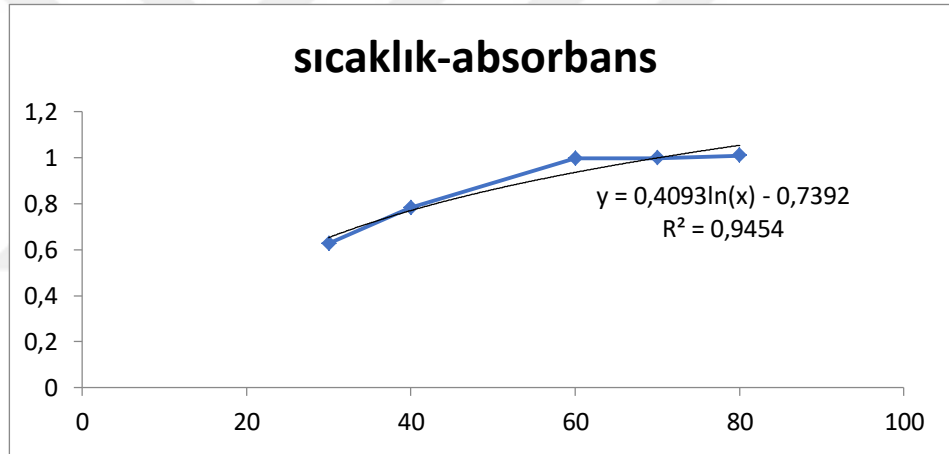
Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybı, JC-1 mitokondri membran potansiyeli belirleme kiti (MitoPT™ JC-1 Assay Kit, ImmunoChemistry) kullanılarak belirlendi. Sağlıklı hücrelerde JC-1 boyası mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve bu kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir.

Membran potansiyelinin belirlenmesi amacıyla hücreler 5×10^6 hücre/mL olacak biçimde kültür kaplara eklendi ve etkinin hemen gözlenmesini belirlemek amacıyla $100 \mu\text{g/mL}$ dozda HA ile 4 saat süresince inkübasyona maruz bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 15 mL'lik Falkon tüplere aktarıldı. Daha sonra 800 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz atıldı ve hücre pelleti üzerine 1 ml 1X JC-1 solüsyonu eklenerek hücreler iyice süspande edildi ve tekrar hücre flasklarına aktarıldı. Hücre süspansiyonu içeren flasklar 37°C ' de, % 5 CO_2 inkübatöründe 15 dakika inkübe edildikten sonra yine tüplere aktarılarak 800 rpm' de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 2 ml assay buffer eklenerek yıkama işlemlerine geçildi. Bu işlem toplamda 2 kez tekrarlanacaktır. Daha sonra hücreler uygun tamponda süspande edilerek siyah renkli plakalara aktarıldı ve florespektrofotometrede analiz edildi.

6. BULGULAR

6.1. Optimum sıcaklık değeri

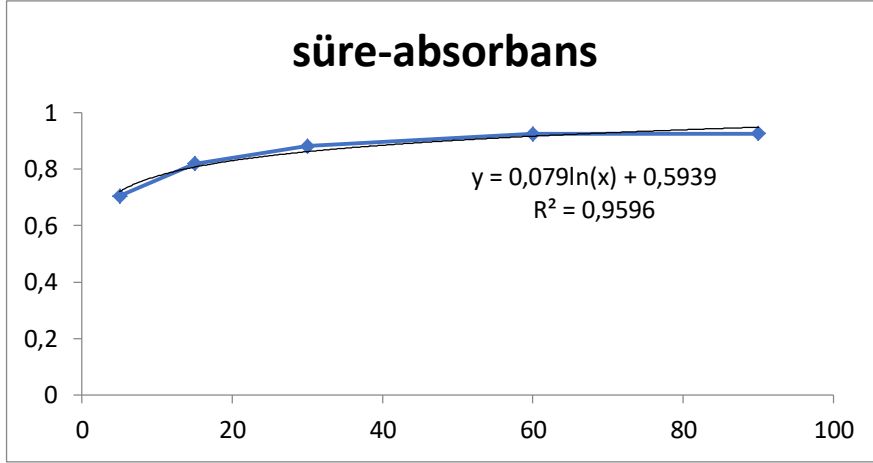
Her bir sıcaklık değeri için güvenilirliği artırmak ve standart hatayı minimuma indirmek amacıyla 3 tekrar yapıldı. 30, 40, 60, 70 ve 80°C olmak üzere çalışılan 5 farklı sıcaklık değeri için elde edilen sonuçlar kullanılarak grafik hazırlandı (Şekil 28). Grafikten de anlaşılacağı üzere, maksimum absorbandsın sağlandığı 60°C optimum sıcaklık değeri olarak belirlendi. 70 ve 80 °C'de anlamlı artışlar olmadığı için bu sıcaklıklar dikkate alınmadı.



Şekil 28. Optimum sıcaklık eğrisi

6.2. Optimum karıştırma süresi

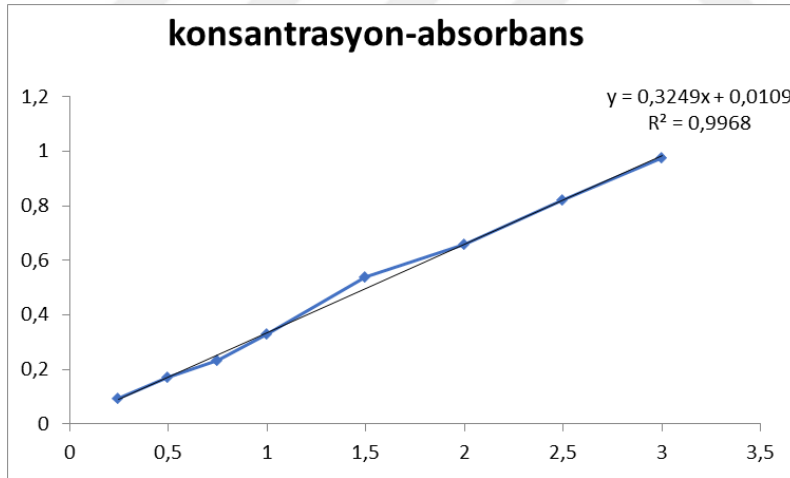
Her bir karıştırma süresi değeri için güvenilirliği artırmak ve standart hatayı minimuma indirmek amacıyla 3 tekrar yapıldı. 5, 15, 30, 60 ve 90 dakika olmak üzere çalışılan 5 farklı karıştırma süresinden elde edilen değerler kullanılarak Grafik 2 hazırlandı ve grafikten yararlanılarak optimum karıştırma süresi 60 dakika olarak belirlendi.



Şekil 29. Optimum karıştırma süresi eğrisi

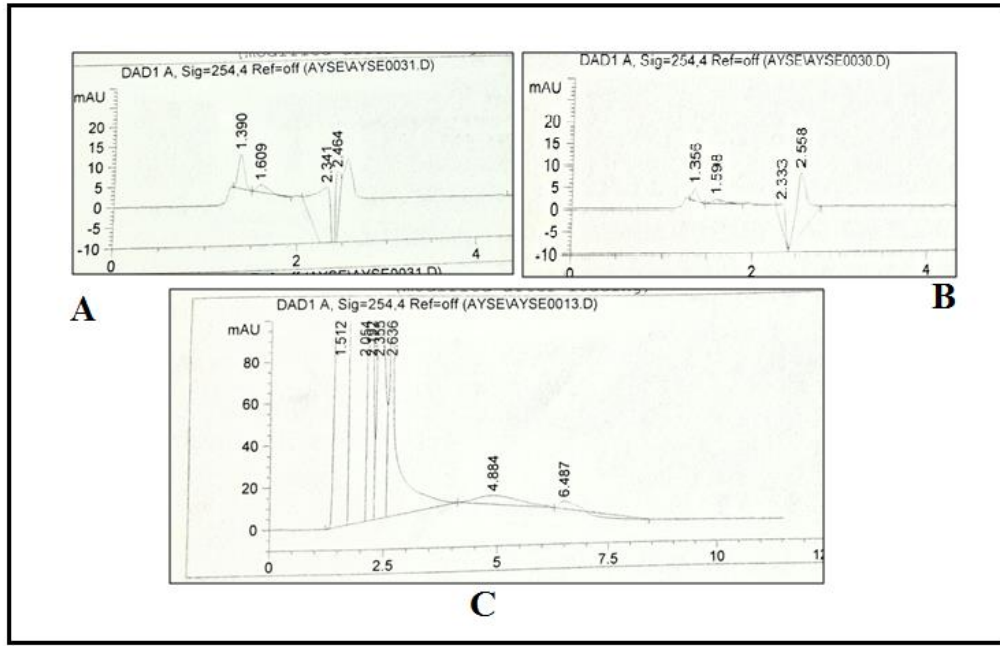
6.3. Standart HA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Standart HA kalibrasyon eğrisi iki farklı metot ile çalışılarak elde edildi. Optimum sıcaklık ve karıştırma süresinde 8 farklı HA konsantrasyonu hazırlanıp, absorbansları spektrofotometrede okunarak Grafik 3’de verilen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.



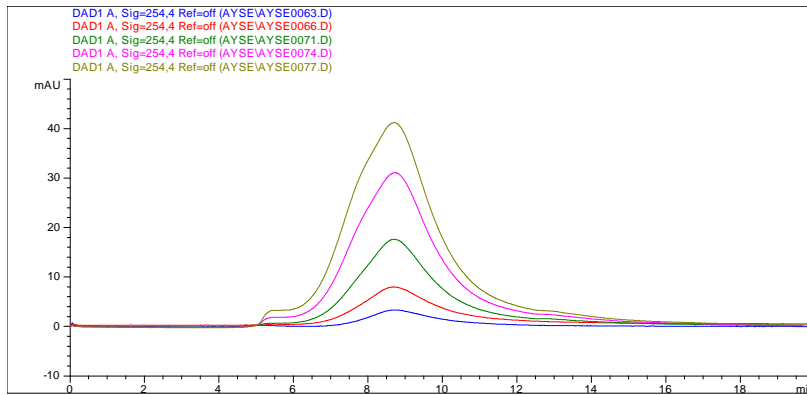
Şekil 30. Spektrofotometrik HA kalibrasyon eğrisi

İkinci yöntem YBSK kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için ilk olarak belirlenen sıcaklık ve karıştırma sürelerinde HA 0,01 M NaOH ile çözüldü ve 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlandı. Bu çalışmada öncelikle Merck marka C18 kolon dolgu malzemesi içeren ve boyutları 4,6x250 mm olan kolon kullanıldı. Mobil faz olarak su-metanol seçildi ve 50:50, 70:30, 30:70 olmak üzere 3 farklı oran denendi. Bunun sonucunda elde edilen kromatogramlar şekil 31’de verildi.



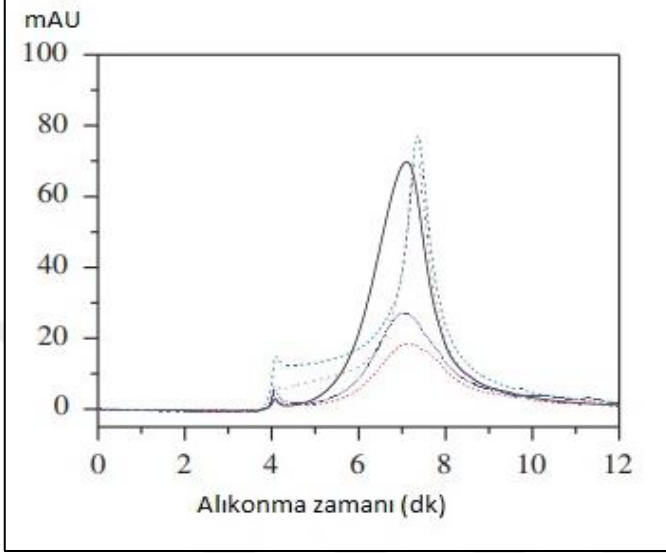
Şekil 31. Standart HA'nın farklı mobil fazlarda verdiği piklere ait kromatogramlar A)30:70 MeOH:Su B)70:30 MeOH:Su C) 50:50 MeOH:Su

C18 kolonu kullanarak yaptığımız deneylere ait kromatogramlar incelendiğinde piklerin düzgün olarak ayrılmadığı belirlendiği için farklı bir YBSK yöntemi uygulanmasına karar verildi. Yapılan ilk deneyde kullanılan YBSK kolonu uygun olmadığı için kolon değişikliğine gidilmiş ve protein PAK 125 kolonu seçilmiştir. Ayrıca bu kolona uygun fosfat tamponu mobil faz olarak kullanılmıştır. Yapılan deneyde 10, 20, 50, 80 ve 100 mL olmak üzere 5 farklı hacim birimi çalışılmıştır. Kullanılan bu hacim birimleri 3'er kez enjeksiyon edilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 32'de artan hacim birimlerine göre sunulmuştur.



Şekil 32. Standart HA'nın değişen hacim birimleri için elde edilen kromatogramlar

Deney sonucunda elde edilen kromatogramlar incelendi tek bir pik gözlemlenmesi ve bu pikin literatürde bulunan HA pikleri (Şekil 33) ile uyum gösterdiğinin belirlenmesinden sonra standart HA'nın kalibrasyon grafiği çalışılmaya başlandı (Brondi ve ark. 2016).



Şekil 33. Literatürde bulunan standart HA eğrisi

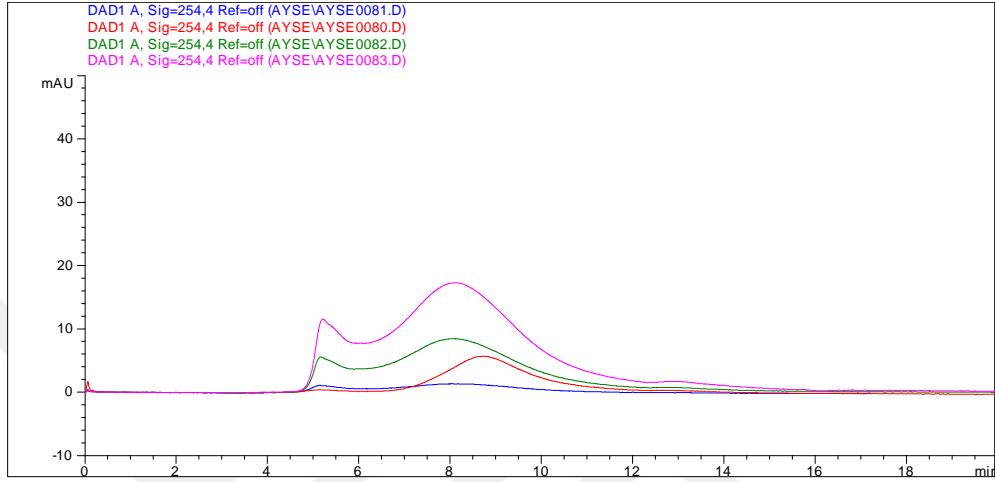
Yapılan HPLC çalışması sonucu HA için standart eğrisi oluşturulmuştur ve şekil 34'de verilmiştir. R^2 değeri 0,9914 olarak bulunmuş çalışmanın güvenilirliği ispatlanmıştır.



Şekil 34. HA standart eğrisi

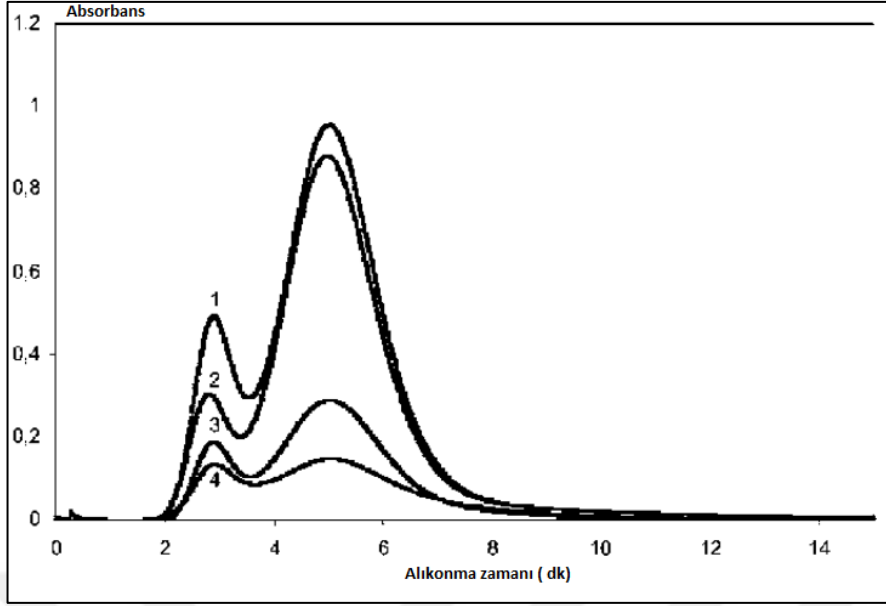
6.4. Toprakтан İzole Edilen HA Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Etüvden alınan HA örneği 0,01 M NaOH ile çözülmüş ve 1mg/mL olacak şekilde stok çözelti hazırlanmıştır. 10, 50, 80 ve 100 µl olmak üzere farklı hacimlerde alınan örnekler 3'er kez enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 35'de verilmiştir.



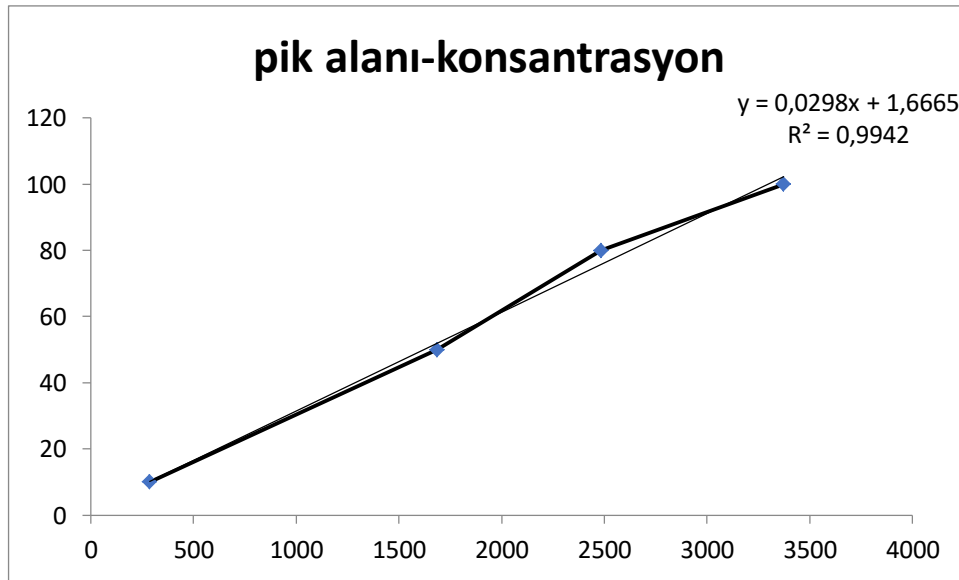
Şekil 35. Toprak numunesi HA kromatogramı

Kullanılan toprak örneğinden elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, HA standardı ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. HA standardına oranla piklerin daha geç gelmesi YBSK ile çalışırken genellikle rastlanılan durumlardandır. Ayrıca elde ettiğimizi kromatogramların, yapılan başka bir çalışmada çeşitli toprak türlerinden HA izolasyonu yapılırken elde edilen ve Şekil 36 'da verilen kromatogramlar ile uyumluluk gösterdiği de tespit edilmiştir (Lyubomirova V. ve arkd. 2011).



Şekil 36. Farklı toprak türlerinden izole edilen HA'ya ait kromatogram örneği

Toprakтан izole edilen HA örneğinin YBSK ile analizi sonucu elde edilen kromatogramın, standart HA ve literatür ile uyumlu olduğu belirlendikten sonra kalibrasyon eğrisi çizildi. Elde edilen grafik şekil 37'de verilmiştir.



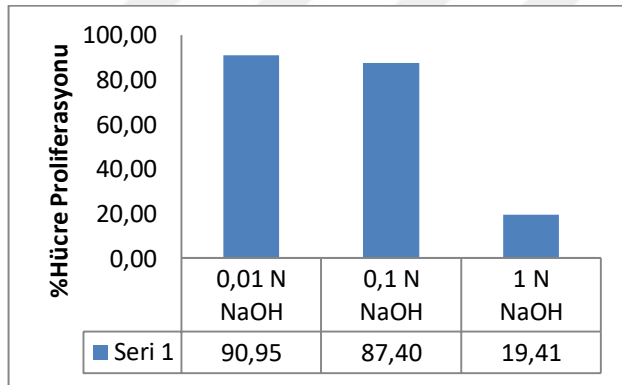
Şekil 37. Toprakтан izole edilen HA'ya ait kalibrasyon grafiği

6.5. HA'nın Antikanserojenik Aktivitesine ait Bulgular

Çalışmamızda hem standart HA hem de topraktan izole edilen HA örneğinin saflığını belirledikten sonra HeLa hücreleri üzerindeki antikanserojenik; NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğini belirlemek için MTT yöntemini kullandık. Buna ek olarak, gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı kullanarak da bu etkinliğin farklı bir yöntem ile de kanıtlanması amaçlandı.

6.5.1. Çözücünün etkisi

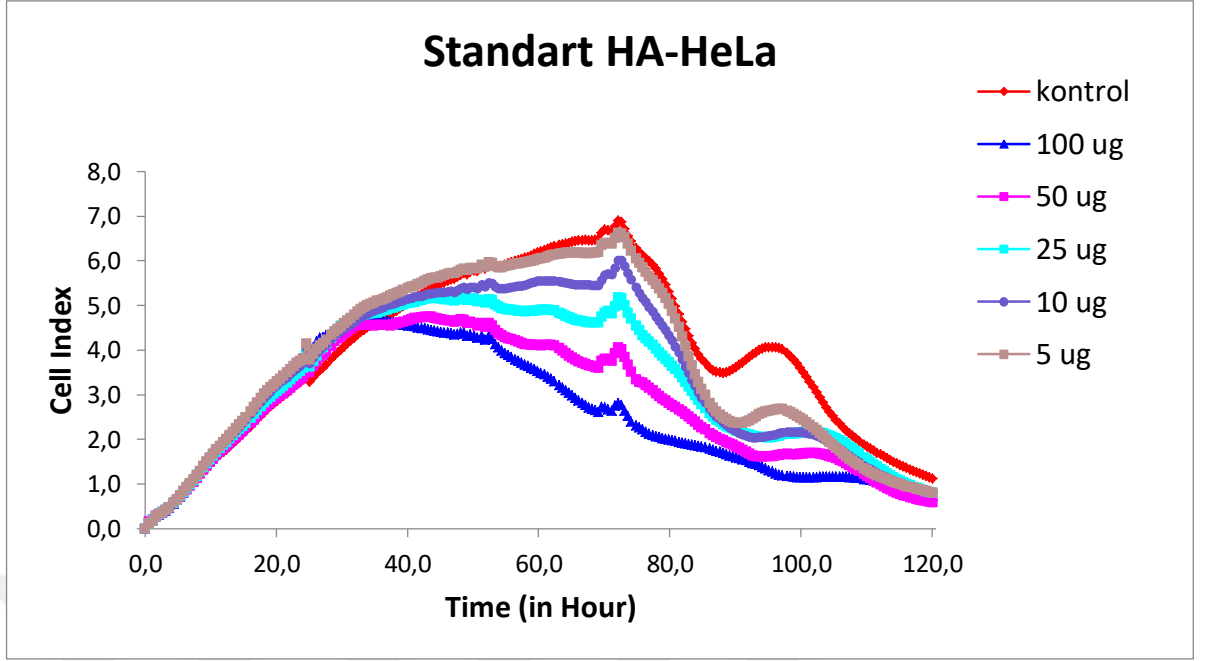
MTT ve Gerçek zamanlı hücre ölçer cihazı ile aktivite ölçümüne başlamadan önce her iki örneğin çözündüğü NaOH'nin hangi konsantrasyonda daha güvenli olduğu belirlendi. Her iki yöntemin sonucunda 1N NaOH'nin hücreler üzerinde sitotoksik etkili olduğu; 0,01 N NaOH'nin de hem 1 N NaOH hem de 0,1 N NaOH'ye oranla daha güvenilir olduğu belirlendi (Şekil 38). Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak örnekler 0,01 N NaOH ile hazırlandı.



Şekil 38. Çözücünün farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkisi

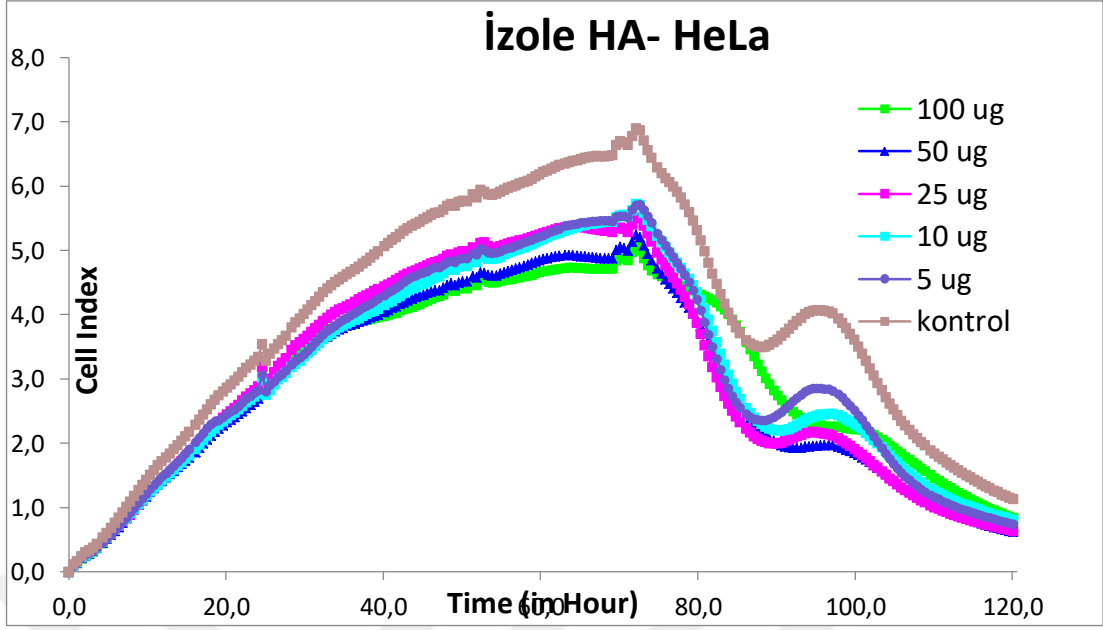
6.5.2. HA'nın antikanserojenik ve sitotoksik aktivitesi

Yapılan MTT analizler sonucunda, standart HA'nın HeLa hücreleri üzerinde antiproliferatif etkili olduğu ve 72 saat sonunda IC₅₀ değerinin 82,46 µg olduğu ortaya konuldu. Diğer taraftan, gerçek zamanlı hücre ölçer cihazından alınan ölçümlerde IC₅₀ değeri 74,59 olarak belirlendi (Şekil 39).



Şekil 39. Standart HA'nın HeLa hücre indeksi üzerine etkisi

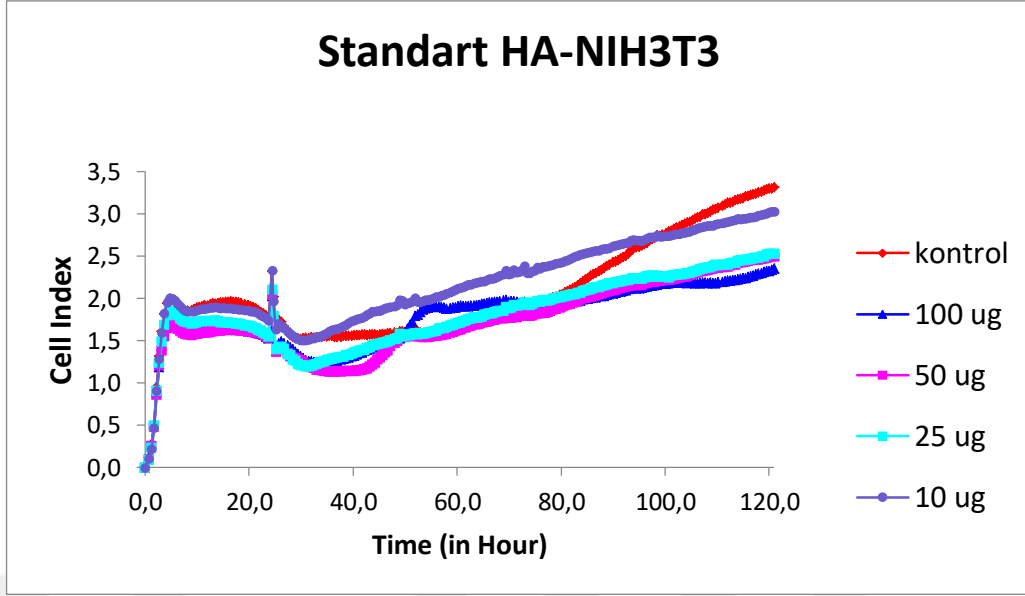
İzole HA'nın HeLa hücreleri üzerinde antiproliferatif etkili olduğu 72 saat sonunda IC_{50} değerinin MTT analizi ile 72,46 μg olduğu ortaya konuldu. Diğer taraftan, gerçek zamanlı hücre ölçer cihazından alınan ölçümlerde IC_{50} değeri 83,52 olarak belirlendi. (Şekil 40).



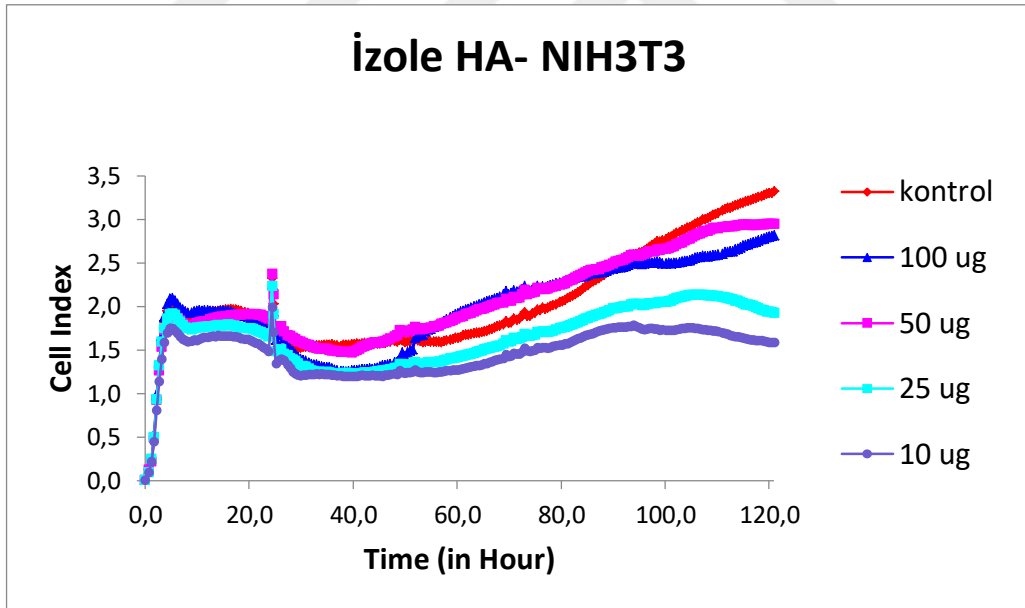
Şekil 40. İzole edilen HA'nın IC50 değerleri

Standart ve izole HA'nın HeLa hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini belirledikten sonra, non-kanserojenik fare embriyonik fibroblast hücreleri (NIH3T3) üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırıldı. Yaptığımız MTT analizleri sonucunda, standart HA'nın NIH3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlendi. RTCA analizi ile yaptığımız deneylerde bu sonuçlarımızı doğruladı (Şekil 41).

İzole HA'nın NIH3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisiyle ilgili de benzer sonuçlar elde edildi. Hem MTT hem de RTCA analizleri sonucunda izole HA'nın non-kanserojenik hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlendi (Şekil 42).



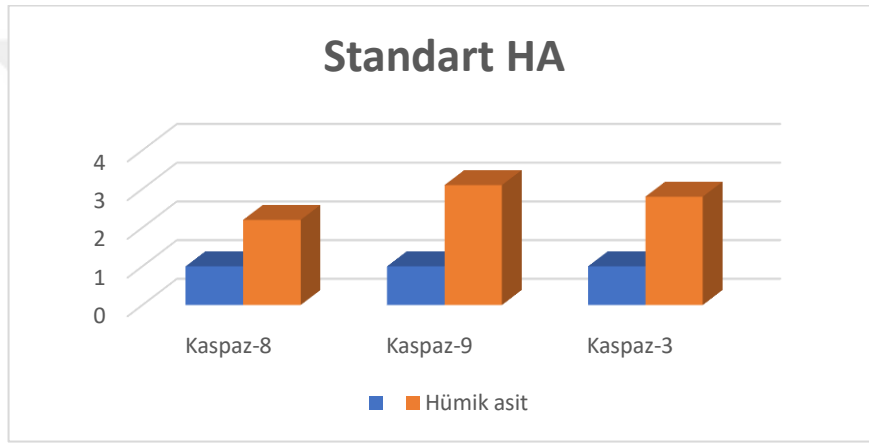
Şekil 41. Standart HA'nın NIH3 T3 hücre indeksi üzerine etkisi



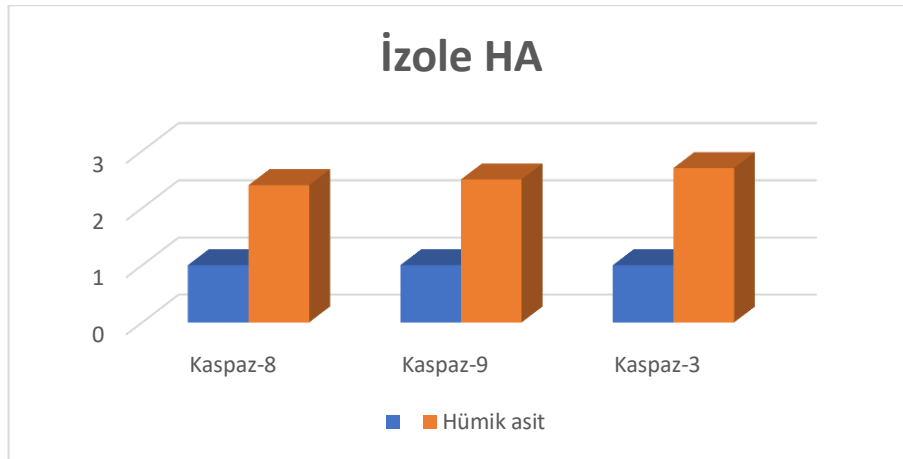
Şekil 42. İzole HA'nın NIH T3 hücre indeksi üzerine etkisi

6.5.3. HA'nın Apoptotik Yolak üzerine Etkileri

Standart ve izole HA'nın hücreler üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirdiğini belirlemek için apoptotik mekanizmayı araştırdık. Çalışmamızda apoptozun dış yolağını başlatan kaspaz-8 enzim aktivitesini; iç yolağı başlatan kaspaz-9 enzim aktivitesini ve her iki yolağın aktivasyonu sonucu tetiklenen kaspaz-3 enzim aktivitesini kolorimetrik kitlerle belirledik. Yapmış olduğumuz ölçüm sonucunda hem standart HA hem izole HA'nın hücre ölümünü iç ve dış yolağı aktifleyerek gerçekleştirmiş olduğunu belirledik (Şekil 43 ve Şekil 44).



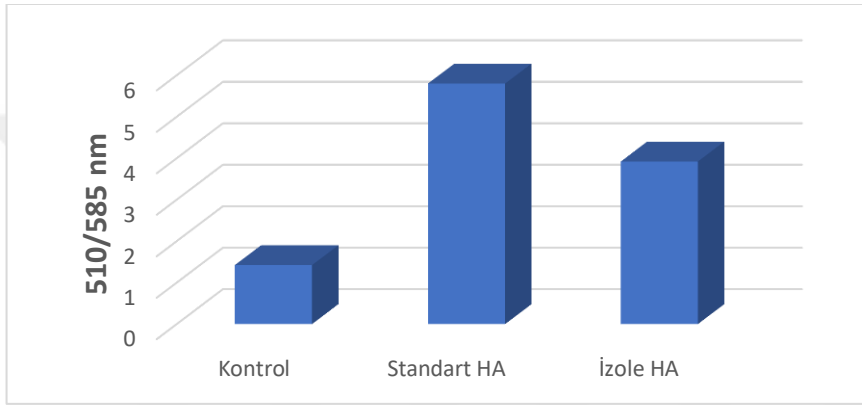
Şekil 43. Standart HA ile tetiklenen apoptotik mekanizma



Şekil 44. İzole HA ile tetiklenen apoptotik mekanizma

Apoptoz esnasında mitokondri membran potansiyeli kaybını da belirlemek istedik. Bu deneyden elde ettiğimiz sonuçlar da standart ve izole HA'nın, kaspaz-9 bağımlı mitokondriyal yolağın aktivasyonuna yol açtığını ortaya koymuştur. Sağlıklı

hücrelerde JC-1 boyası mitokondride agregatlar şeklinde toplanır ve bu kırmızı floresan bir renk verir. Apoptotik hücrelerde ise mitokondri membran potansiyeli çökmüş olduğundan JC-1 boyası mitokondri içinde toplanamaz ve sitoplazmada monomerik formda kalarak yeşil floresan bir renk verir. Yeşil/kırmızı (510 nm/585 nm) oranının artması membranın depolarizasyonunu göstermektedir. Spektroflorometre ile yapmış olduğumuz analizler sonucunda standart HA'nın HeLa hücrelerinde mitokondri membran depolarizasyonunu kontrole kıyasla yaklaşık 4 kat arttırdığı; izole HA'nın ise yaklaşık 3 kat arttırdığını belirledik (Şekil 45).



Şekil 45. Standart ve izole HA'nın mitokindri membran potansiyeline etkisi

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser günümüzde tıp dünyasının en çok üzerinde çalıştığı hastalıklardan biridir. Artan teknoloji kullanımı, sedanter yaşam tarzı, yoğun stres ve genetik mutasyonlar gibi çeşitli faktörler, geçmiş yıllara göre kansere yakalananların sayısında oldukça belirgin bir artış meydana getirmiştir. Kanser hastaları uygulanan kemoterapi ve radyoterapi protokollerinin yaratmış olduğu yan etkilerden dolayı, sağlık kuruluşlarının önerdiği tedavilerin dışında alternatif tedavilere yönelmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde insanların en çok yöneldiği tedavi şekillerinden biri doğal kaynaklı terapilerdir.

Toprak ve su diğer canlıların olduğu gibi insanların da önemli yaşamsal kaynaklarını oluşturur (Nebel, 1990; Çobanoğlu, 2001). Toprağın yapısının bilinmesi toprak yapısının iyileştirilmesi ve yetiştirilen ürün kalitesi açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda toprağın yapısında bulunan doğal maddelerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu da ortaya konulmuştur.

Toprağın doğal yapısında bulunan ve toprağın en verimli kısmını oluşturan hümik maddeler aynı zamanda insan sağlığı için potansiyel bir ilaç adayıdır. Hümik maddeler, moleküler yapısı henüz tam olarak aydınlatılamayan ve dolayısıyla üzerinde çok fazla sayıda çalışma bulunmayan maddelerdir (Pena-Mendez ve ark., 2005). HA'nın kimyasal yapısı net olarak belirlenemediğinden miktarını tam olarak belirleyecek analitik bir yöntem de bulunmamaktadır. En çok kullanılan yöntemler olan "Humatların Humik ve Fulvik Bileşenlerine Ayrılması" ve CDFFA yöntemlerinde HCl kullanılmakta ve analiz sonuçlarında yalnız HA değerleri tespit edilebilmektedir.

Çalışmamızda da HA tayini için kullanımı en çok tercih edilen CDFFA yöntemi kullanılmış ve elde edilen izolatlarda HA karakterizasyonu yapılmıştır. HA karakterizasyonu için öncelikle spektrofotometrik yöntem kullanılmış fakat ayırımın net olarak ortaya konulmadığı belirlendiği için YBSK yöntemine geçilmiştir. Bu aşamada Sigma-Aldrich firmasından temin edilen saf HA standart olarak kullanılmıştır. HA ile yapılan yeterli literatür çalışması olmadığı için çözündüğü optimum sıcaklık, çözücü konsantrasyonu ile karıştırma süresi için gerekli olan koşullar denendi ve HA'nın 0,01 M NaOH'de, 60°C' de ve 60 dakikada maksimum

çözünürlüğe ulaştığı bulundu. Yapılan literatür çalışmalarında, HA için bulunan optimum çözünme değerlerinin literatür ile de uyumlu olduğu belirlendi.

YBSK ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilen alıkonma sürelerinin diğer çalışmalara göre bazı farklılıklar gösterdiği belirlendi. Bu farklılığın sebebinin kullandığımız mobil fazdan kaynaklandığını düşünüyoruz. Sonuç olarak, elde edilen izolatin standart HA ile benzerlik gösterdiği, dolayısıyla HA fraksiyonu olarak tanımlanabileceği belirlenmiştir.

Hümkik maddelerin molekül yapısının amino asitli, amino şekerli, peptidli ve aromatik gruplarla bağ kurmuş alifatik bileşikli kompleks aromatik makromoleküller olduğu bilinmektedir (MacCarthy, 1989). Sahip olduğu bu grupların çeşit ve fazlalığı hümkik maddelerin biyolojik etkinliğinden sorumludur.

Yapılan çalışmalar hümkik maddelerin antiproliferatif, immunmodülatör (Joone ve ark., 2003), antiinflamatuvar (Rensburg, 2015) ve antiviral etkilere sahip olduğunu göstermiştir. İlaç endüstrisinde hümkik asit pekçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni, Avrupa'da eski zamanlardan beri tedavi amaçlı olarak kullanılan turba banyolarıdır. Günümüzde doğal kil maskeleri ve çamur banyoları da özellikle romatizmal ve deri hastalıklarının tedavisinde tercih edilmektedir.

Güçlü bir hümkik madde kaynağı olarak kabul edilen "mumie" İbn-i Sina'nın "el-kanun fi't-tıb" adlı eserinde, tümörleri ve sivilceleri yok etmede kullanılan bir madde olarak yazılmıştır. Ayrıca "mumie" Asya herbal tıbbında açık yaralarda, kemik kırık ve çıkıklarında da kullanılmaktadır.

Diğer taraftan, literatür incelendiğinde HA ile ilgili çalışmaların, özellikle Tayvan'da görülen ve etiyojisinden HA'nın sorumlu tutulduğu bir hastalık olan "Siyah ayak sendromu"nda yoğunlaştığı göze çarpmaktadır (Lu, 1990). Hseu ve ark. (2002), HA'nın doz ve zaman bağımlı (50-200 µg/mL) olarak endotel hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiğini, bu hücrelerde oksidatif stresi arttırdığını ve apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir. Yine aynı araştırmacı grubunun yapmış olduğu başka bir çalışmada, HA'nın yine doza bağlı (25-200 µg/mL) olarak damar düz kas hücrelerinin hücre siklusunu G1 fazında durdurduğu ve apoptozu uyararak hücre ölümüne neden olduğu rapor edilmiştir. Siyah ayak sendromunda sıklıkla

karşılaşılan aterosklerozun gelişiminde bu mekanizmanın etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Hseu ve ark., 2009).

HA'nın normal hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisinin ortaya konulması kanserdeki rolünün belirlenmesiyle ilgili çalışmaların artmasıyla sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda HA'nın oksidatif stresi indükleyerek kansere sebep olduğu ileri sürülmüştür. Fakat yapılan çalışmalarda tam olarak bir konsensüs de sağlanamamıştır. Şöyle ki; Yang ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada HA'nın doz bağımlı olarak (50-400 µg/mL) lösemi hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde antiproliferatif etkili olduğu ve apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir. Yine bu çalışmada, lösemi hücrelerinde Bax protein seviyelerinin ve kaspaz-3 aktivitesinin arttığı ve dolayısıyla mitokondri bağımlı apoptotik mekanizmanın aktive olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde Yen ve ark (2007) da HA'nın doza bağlı olarak HIT-T15 hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne neden olduğu ve bu hücrelerde insülin salınımının bozulduğunu göstermişlerdir.

Diğer taraftan, Lee ve ark (2009), ticari olarak satın almış oldukları HA ile yapmış oldukları çalışmada, HA'nın 25, 50 ve 100 µg'lık dozlarında 24 ve 48 saatlik süre boyunca akciğer kanseri hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediğini belirlemişlerdir. İlginç olarak, 24 ve 48 saat süresince inkübe edilen 50 ve 100 µg'lık dozlarda, A549 hücrelerinin migrasyon, adezyon ve invazyonunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde, Ting ve ark (2010), 48 saat HA ile muamele ettikleri HeLa ve SiHa serviks kanseri hücrelerinde antiproliferatif ve apoptotik etkinin görülmediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar HA'yı Arsenikoksit ile kombine uyguladıklarında bu hücrelerde oksidatif stresi ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

Yine çok yakın bir zamanda yayınlanan başka bir çalışmada, HA'nın meme kanseri üzerine etkisi araştırılmıştır (Aykaç ve ark., 2018). Bu çalışmada; MCF-7 hücre hattı üzerinde 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/mL olmak üzere 5 farklı HA konsantrasyonu MTT yöntemiyle çalışılmıştır. Sonuç olarak MCF-7 hücrelerinde 24 ve 48 saat inkübasyon yapılan hücrelerde sitotoksik aktivitenin 50 ve 100 µg HA dozlarında meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu tez çalışmasına başlamadan yapmış olduğumuz ön denemelerde biz HA'nın hiçbir dozunda MCF-7 hücrelerine

karşı bir sitotoksik etki elde edemedik. Bu nedenle Aykaç ve ark., (2018) çalışmasıyla ön bulgularımız birbiriyle uyuşmamaktadır.

Yukarıda verilen çalışmalar incelendiğinde HA'nın doz ve zaman bağımlı olarak antiproliferatif ve apoptotik etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Özellikle 24 ve 48 saat inkübasyon süresince herhangi bir etki elde edemeyen çalışmalarla bizim çalışmamız büyük benzerlik taşımaktadır. Şöyle ki; biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada hem standart HA hem de izole HA'nın antiproliferatif etkisinin 72 saatten önce gerçekleşmediğini belirledik ve hücreleri doza bağlı olarak 72 saat süresince muamele ettik. Elde ettiğimiz sonuçlar hem standart hem de izole HA'nın Hela hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini ve bu etkisinin apoptotik mekanizmanın tetiklenmesi sonucu oluştuğunu belirledik. Bu sonuçlarımız Yang ve ark (2004) nın yaptığı çalışmayla da benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada da lösemi hücrelerinde, HA'nın doz ve zaman bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini ve bu etkisini apoptozu uyarak gerçekleştirdiğini kaspaz-3 enzim aktivitesini ölçerek göstermişlerdir.

Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, HA'nın serviks kanseri için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşünüyoruz. Fakat literatürde birbiriyle çelişkili çalışmaların bulunmasından dolayı, bizim çalışmamızı destekleyecek başka çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

8. KAYNAKLAR

Aykaç A, Becer E, Okcanoğlu T, Güvernir M, Süer K, Vatansever S. Hüyük asidinin insan meme kanseri üzerine sitotoksik etkisinin araştırılması. Proceeding 2018, 2, 1565. Near East University Cyprus.

Adams JM, Cory S, Life or death decisions by the Bcl-2 family. Trends in Biochemical Sciences. 2001;26: 61-66.

Abbasi N, Shaw H, Rigel D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. JAMA 2004; 292:2771.

Adrain C, Martin J, The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome c. Trends in Biochemical Science. 2001; 26:390-7.

Armstrong B, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. Journal of Photochemistry and Photobiology B. 2001; 63:8.

Adler L. Textbook Primary malignant growth of the lungs and bronchi. 1. St. Ed. New York. New York 1912. P.32-35.

Allen N, Beral V, Casabonne D, Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. J Natl Cancer Inst 2009; 101:296.

Brownson R, Novotny TE, Perry MC. Cigarette smoking and adult leukemia. A metaanalysis. Arch Intern Med 1993; 153:469.

Baran M. Meme ve serviks kanseri konusunda kadınların bilgi ve bilinç düzeyleri. Yüksek Lisans Tezi. Beykent Üniversitesi, sosyal bilimler enstitüsü, işletme yönetimi anabilim dalı. İstanbul, 2017.

Bellamy C, Malcomson R, Harrison D, Wyllie A. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Seminar in Cancer Biol. 6: 3-16, 1995.

Beasley R, Hwang L, Lin C, Chien C. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2:1129.

Bleeker-Rovers C, Vos F, Kleijn E. A prospective multicenter study on fever of unknown origin: the yield of a structured diagnostic protocol. *Medicine (Baltimore)* 2007; 86:26.

Bower J, Ganz P, Desmond K. Fatigue in breast cancer survivors. Occurrence, correlates, and impact on quality of life. *J Clin Oncol* 2000; 18:743.

Campos N, Kim J, Castle P, Ortendahl J, O'shea M, Diaz M. Health and economic impact of HPV 16/18 vaccination and cervical cancer screening in Eastern Africa. *International Journal of Cancer*. 2012;130(11):2672-84.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85-95.

Colditz G, Ryan C, Dart C. Lifestyle Behaviors Contributing to the Burden of Cancer. In: Fulfilling the Potential of Cancer Prevention and Early Detection. Curry S, Byers T, Hewitt M (Eds), The National Academies Press, Washington, DC 2003. P:100-155.

Chene A, Donati D, Orem J, Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease: new insights on the interaction between *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol* 2009; 19:411.

Çobanoğlu Z, Çağatay G. Toprak Kirliliği ve Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No:40. 2001. Ankara.

Diñçol K. Kemoterapide Temel Prensipler. İn: Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN; eds. *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*;2000:34-47.

Demirgöz Bal M. Kadınların PAP smear testi yaptırma durumlarının sağlık inanç modeli ölçeği ile değerlendirilmesi. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2014; 4:133–8.

Durusoy EE. Preinvaziv ve invaziv servikal lezyonlarda Human Papillomavirus tiplerinin prevalansının saptanması. Uzmanlık Tezi. Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. 2014.

- Erdurur E. Hüyük Maddeler ve Uygulama Alanları. Lisans bitirme tezi. Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Sakarya, 2009.
- Futreal P, Kasprzyk A, Wooster R, Stratton M. Cancer and genomics. *Nature*. 2001. 6822: 850-2.
- Foster I. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography journal*. 2008; 14: 144-9.
- Feinendegen L. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol* 2005; 78:3.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. GLOBOCAN 2012. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 .
- Fearson E. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997; 278: 1043-50.
- Gewies A. Introduction to apoptosis. *Cancer research*. 2003; 1-26.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Science*. 2007. P.37-43.
- Greaves M, Maley C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.
- Goudas LC, Bloch R, Gialeli-Goudas M, The epidemiology of cancer pain. *Cancer Invest* 2005; 23:182.
- Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP, 2007. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, 56, 1134-52.
- Guimarães C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*. 2004 May;271(9):1638-50. Hudson T. J. International network of cancer genome projects. *Nature* 464, 993- 998 (2010).
- Hyde L, Hyde C. Clinical manifestations of lung cancer. *Chest* 1974; 65:299.
- Harris T, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature reviews Clinical oncology* 7, 251-265 (2010).
- Hseu YC, Lin E, Chen JY, Liua YR, Huang CY, Lu FJ, Liao JW, Chen SC, Yang HL. Humic acid induces G1 phase arrest and apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells. *Environ Toxicol*. 2009; 24(3):243-58.

Hung-Chic Ting, arsenik trioksit konsantrasyonuna bağlı olarak hümik asit konsantrasyonunun insan servikal kanser hücreleri üzerine etkisinin in vivo ve in vitro araştırılması. Trends Biochem Science. 2005. P.32-40.

İçli F, Akbulut H. Onkolojiye Giriş. İn. Biberoglu K, Süleymanlar G ve ark. İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi;2005:2007-2014.

Joone G, Dekker J, Van Rensburg E. Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. Z. Naturforsch. 2003; 58:263-267.

Jemal A. Global cancer statistics. CA. A cancer journal for clinicians 61, 69-90 (2011).

Karl U. HPV and cervical cancer, Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 74:sup244, 59.

Karaca TD. İnsan meme kanseri hücre kültüründe Nerium oleander bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi. S.A.Ü. Fen Bilimleri Estitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008, Sakarya (Danışman: Yrd. Doç. Dr. Kenan Tunç).

Koh D, Wang H, Lee J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97. Br J Dermatol 2003; 148:1161.

Kannan K, Jain S. Oxidative stress and apoptosis Louisiana State University Health Sciences Center in USA, 2000.

Keane R, Kraydieh G, Lotocki J, Bethea S, Krajewski J, Reed W. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol. (2001);60: 422-429.

Kural O. Türkiye Linyitlerinde Humik Asit Dağılımının İncelenmesi. İTÜ Maden Fakültesi.1978. Doktora Tezi, s. 99.

Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Molecular Cell Biology. 4.edition: WHF reeman and Co, NewYork, 2000. P:755-800.

Lou J, Lenke L, Ludwig F, O'Brien M. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36: 683-690, 1998.

Lee WJ, Lu FJ, Wang SF, Chen YR, Tseng TH. In vitro enhancement effect of humic acid on the progression of lung cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2009;181(3): 463-471.

Macdonald F, *Molecular biology of cancer*, Chapter 1. Editor: Georgia Bushell and Harriet Milles. Ppp:4- 6. ISBN:1-8599-6247-5. 2004.

Marton K, Sox H, Krupp J. Involuntary weight loss: diagnostic and prognostic significance. *Ann Intern Med* 1981; 95:568.

Mollahaliloğlu S, Başaran B, Eryılmaz Z. Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı; 2010.

Mızrak D ve Akbulut H, Kanser Hastası ve Açlık, *Türk Onkoloji Dergisi*, 2015;30(3): 152-157.

Morrow G, Andrews P, Hickok T, Fatigue associated with cancer and its treatment. *Support Care Cancer* 2002; 10:389.

Morrow M. The evaluation of common breast problems. *Am Fam Physician* 2000; 61:2371.

MacCarthy P. Suffet, "In Aquatic Humic Substances: Influence in Fate and Treatment of Pollutants: *Advances in Chemistry Series 219*," American Chemical Society, pp.1-898, 1989.

Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Nature Publishing Group.* 2004; *oncogen*23:2757-2765.

Nowak M, Komarova N, Sengupta A. Mutation–selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *Journal of Theoretical Biology*, 2003; 223: 433–450.

Nelson David L, Micheal M. Cox, *Lehninger Principle of biochemistry*, sf 469 America, 2008.

Özsavci D, Ersahin M, Sener A, Bingol-Ozakpinar Ö, Toklu HZ, Sener G, Yegen B. (2011). The Novel Function of Nesfatin-1 as an Anti-inflammatory and Antiapoptotic Peptide in Subarachnoid Hemorrhage-induced Oxidative Brain Damage in Rats. *Neurosurgery*, 68 (6): 1699-1708.

Örenli G. İlköğretim ikinci kademedeki öğrenim gören kız öğrencilerin annelerinin rahim ağzı kanseri ve HPV aşısı konusunda bilgi tutum davranışları. Yüksek Lisans tezi. Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme Yönetimi Anabilim Dalı, Hastane ve Sağlık Kurumları Yönetimi Bilim Dalı; 2013.

Özenoğlu S, Dinçsoy AB, Taghidizaj A, Yılmaz E, Cansaran-Duman D, Aydoğdu G, Aras S, Derici D. Liken sekonder bileşiklerinin farklı insan kanser hücre tipleri üzerine antikanserojenik etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2013; 70-4: 215-226.

Öndağ Cabadak H. İnsan periferik kan ve fibroblast hücre kültürlerinin sinkronizasyonu ve sinkronize hücre kültürlerinden kromozom analizi ve karyotip hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 1987.

Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler J, Chow S, Apter D, Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of double-blind, randomised study in young women. *Lancet* 2009;374(9686):301-14.

Pal D, Nayak AK. Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010; 1-5.

Pena-Mendez E, Havel J, Patocka J. "Humic substance-compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine," *Applied Biomedicine*, vol. 3. pp. 13-24, 2005.

Ringer D, Schnipper LE. Principles of Cancer Biology. In: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds. *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*; 2001:21-35.

Reed S. Cell Cycle. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; eds. Cancer. 8 th Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams, Wilkins;2008:79- 92.

Raaschou-Nielsen O, Andersen Z, Beelen R. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013; 14:813.

Rapp K, Schroeder J, Klenk J, Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145,000 adults in Austria. *Br J Cancer* 2005; 93:1062.

Stratton M, Campbell P, Futreal P. The cancer genome. *Nature* 458, 719- 724 (2009).

Schwartz S, Cohen S, Dailey S, Clinical practice guideline: hoarseness (dysphonia). *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 141: S1.

Speights V, Johnson M, Stoltenberg P, Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. *South Med J* 1991; 84:575.

Sparks D, Environmental Soil Chemistry, Academic Press, San Diego, 82, 2003.

Spierings D, Vellenga E. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831; 2004.

Shan L, Songshu X, Hongxiang C, Manying Z, Zhifang C, Yuehua L, Yanshan G. The receptor for activated protein kinase C promotes cell growth, invasion and migration in cervical cancer, *international journal of oncology*, 2017.

Sasco A, Secretan M, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 2004; 45 Suppl 2: S3.

Spirtas R, Heineman E, Bernstein L, Malignant mesothelioma: attributable risk of asbestos exposure. *Occup Environ Med* 1994; 51:804.

Stevenson F, Humus chemistry: genesis, composition, reactions. Wiley-Interscience, 1982, New York, USA.

Şenkardeş S, Özakpınar ÖB, Özşavcı D, Şener A, Çevik Ö, Küçükgülzel ŞG. Synthesis of Diflunisal thiazolidinones as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 16(10):1266-1274, 2016).

Thorn K, Goldenberg W, Youngerand S, Weber E. *Humic and Fulvic Acids Isolation, Structure and Environmental Role*, ACS Symposium Series, 651, p. 299, 1996.

Tarhanİ. *Hümik Maddelerin Bazı Biyokimyasal Kaynaklardan Ekstraksiyonu ve Akış Enjeksiyon Sistemleriyle Tayin Metotlarının Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Selçuk Ünivesitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2011.

Thomas TL, Strickland O, Diclemente R, Higgins M. An opportunity for cancer prevention during preadolescence and adolescence: stopping human papillomavirus (HPV)-related cancer through HPV vaccination. *J Adolesc Health* 2013;52(Suppl 5):60-8.

Tan H, ve Falcon R. Effect of Fulvic and Humic Acids in Nitrification, Part 1: in Vitro Production of Nitrite and Nitrate. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1987; 18(8):835-853.

Ting HC, Yen CC, Chen WK, Chang WH, Chou MC, Lu FJ. Humic acid enhances the cytotoxic effects of arsenic trioxide on human cervical cancer cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010; 29(2):117-125.

Winkelstein W, Sacks S, Ernster V, Selvin S. Correlations of incidence rates for selected cancers in the nine areas of the Third National Cancer Survey. *Am J Epidemiol.* 1977; 105:407- 409.

Wilkinson R, Marmot M, eds. *Determinants of Health: The Solid Facts*. 2nd ed. Copenhagen, Denmark: World Health Organization, Regional Office for Europe; 2003.

Vogelstein A, Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: Reed Sİ. *Cell Cycle*. In De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; *Cancer*. 8 th Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins; 2008:79- 92.

Rensburg C, Dekker J, Weis R, Smith L, Schneider J, Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy* 48: 2015;138-143

Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. 2003; 36: 131-149.

Vermeulen K, Berneman ZN, VanBockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003; 36: 165-75.

Yıldırım S. Kanser tanısı ile izlenen hastaların yakınlarının kanser ile ilgili başvurdukları bilgi kaynaklarının değerlendirilmesi. D.E.Ü. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2015, İzmir (Danışman: Prof. Dr. İlhan Öztop).

Yang HL, Hseu YC, Hseu YT, Lu FJ, Lin E, Lai JS. Humic acid induces apoptosis in human premyelocytic leukemia HL-60 cells. *Life Sci*. 2004, 27;75(15):1817-1831.

Yen CC, Lu FJ, Huang CF, Chen WK, Liu SH, Lin-Shiau SY. The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies. *Toxicol. Lett*. 2007; 172:91-105.

Zeegers MP, Swaen GM, Kant I, Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med* 2001; 58:590.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ayşe	Soyadı	DEMİR AKTAŞ
Doğum Yeri	Eyüp	Doğum Tarihi	19.03.1993
Uyruğu	T.C.	Tel	0(546)8636135
E-mail	Ayşe.demir.ktu@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2014
Lise	Suadiye Hacı Mustafa Tarman Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
öğretmen	MEB	2017-.....

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	orta	orta	orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
40,0								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puam	65,00		
(Diğer) Puam			

Bilgisayar Bilgis

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	İyi
Microsoft Office Power Point	İyi
Microsoft Office Picture Manager	İyi
Microsoft Office Excell	İyi
Paint	İyi

