

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CURCUMA LONGA LINN VE ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE
BİTKİLERİNDEN UÇUCU YAĞ ELDESİ VE BAZI KANSER
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİSİ**

MERVE YÜKSEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEZGİN ÇELİK
EŞ DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ AKIN SEVİNÇ**

İSTANBUL, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe Bitkilerinden Uçucu Yağ Eldesi Ve Bazı Kanser Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkisi**

Merve YÜKSEL tarafından hazırlanan tez çalışması 17.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Öğr.Üyesi Akın SEVİNÇ
Altınbaş Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç Dr. Banu MANSUROĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr.Üyesi Hüseyin SERVİ, Üye
Altınbaş Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 3290 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tezin çalışma konusu, *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden uçucu yağ eldesi, akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve glioma kanser hücre hatlarında uçucu yağların ve roskovitin ilacının sitotoksik etkisi hakkında bilgiler sunmaktadır.

Öncelikle çalışmalarım süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen bana sağlamış olduğu imkanlardan dolayı tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Sezgin ÇELİK ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ'e, Yıldız Teknik Üniversitesi'nde Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na tez konumda ve bilimsel proje yazma hakkında bilgi ve tecrübelerini paylaştığı için teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca lisans dönemim boyunca İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Akademik kadrosundaki tüm değerli hocalarıma, tez çalışmam boyunca deneysel çalışmalarında beni destekleyen Msc. Tuğçe Nur ERALP'e, yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü zorluğu birlikte paylaştığım ve hemşerim Bsc. Buse BAHAR'a, eğitim hayatım sürecinde gerek maddi ve manevi olarak her zaman yanımda varlığını hissettiren başta annem, babam olmak üzere abim Fatih YÜKSEL, ablam Hamide YÜKSEL'e özellikle son 5 yıldır hayatımda olan ailemizin neşe kaynağı yeğenim Mahinur KARAMEŞE ve ablam Asiye KARAMEŞE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2019

Merve YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	5
1.3 Hipotez.....	5
BÖLÜM 2	6
KANSER HASTALIĞI	6
2.1 Tanımı.....	6
2.2 Kanser'in Başlıca Özellikleri.....	12
2.2.1 Büyüme Sinyali Otonomisi.....	13
2.2.2 Anti-Büyüme Sinyallerine Karşı Direnç.....	16
2.2.3 Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz).....	17
2.2.4 Sınırsız Replikasyon Potansiyeli.....	21
2.2.5 Anjiyogenezi indükleme.....	22
2.2.6 İnvazyon ve metastaz.....	23
2.2.7 Enerji metabolizmasının yeniden programlanması.....	25
2.2.8 İmmun sistemden kaçma.....	25
2.3 Epidemiyolojisi	26
2.4 İnsidansı	27
2.5 Meme Kanseri.....	29
2.6 A549.....	30
2.7 HepG2.....	32
2.8 C6.....	33

2.9	<i>Curcuma longa</i> Linn	33
2.10	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	39
2.11	Roskovitin	42
2.12	Uçucu Yağlar	44
BÖLÜM 3		46
MATERYAL METOT		46
3.1	MATERYAL	46
3.2	METOT	49
3.2.1	Çözeltilerin Hazırlanması	49
3.2.2	Kullanılan Yöntemler	50
3.2.2.1	Hidrodistilasyon Yöntemi	50
3.2.2.2	Hücre Kültürü	51
3.2.2.3	MTT Yöntemi	52
BÖLÜM 4		54
SONUÇ VE ÖNERİLER		54
4.1	SONUÇLAR	54
4.1.1	Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağ Sonuçları	54
4.1.2	MTT Yöntemi Sonuçları	54
4.2	ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR		73
ÖZGEÇMİŞ		81

SİMGE LİSTESİ

mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
gr	Gram
μ M	Mikro Molar
n	Mol
Na	Moleküler ağırlık
V	Hacim

KISALTMA LİSTESİ

A549	Lung adenocarcinoma 549
Akt	Protein Kinase B
C6	Glioblastoma Cell
CPD	Siklobutan Pirimidin Dimerleri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetik Sülfoksit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Fetal bovine serum
GDP	Guanin nükleotit DiFosfat
GEF	Guanin nükleotid Değişim Faktörü
GTP	Guanin nükleotit TriFosfat
HepG2	Hepatacelular Carcinoma 2
HRAS	Harvey-Ras
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KRAS	Kirsten-Ras
MAPK	Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
p53	Tümör protein 53
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PBS	Phosphate-buffered saline
Rb	Retinoblastoma
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TGF- β	Transforming Growth Factor
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TSP-1	Trombospondin-1
UV	Ultraviyole
VEGF-A	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü-A

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Normal hücreden kanser hücresi gelişimi [40]..... 7
Şekil 2.2	Hücre döngüsü ilerlemesi ve ana düzenleyici proteinler [41] 9
Şekil 2.3	P53 ve Aurora B arasındaki etkileşim [43] 11
Şekil 2.4	Hanhan ve Weinberg tarafından belirlenen kanserin altı önemli özelliği [52] 12
Şekil 2.5	Ras sinyallemedeki değişiklikler [68]..... 15
Şekil 2.6	Hücre dışından gelen apoptotik sinyalin hücre membranı ile etkileşimi [68] 18
Şekil 2.7	Hücre içi ve hücre dışı kaynaklı apoptotik yollar [68] 19
Şekil 2.8	Telomer kısalması ve p53 aktivasyonu [73] 21
Şekil 2.9	Tümör ilerlemesinin farklı aşamalarında Rho proteinlerinin dahil edilmesi [79]..... 24
Şekil 2.10	Küresel Harita 2015 Yılı 70'in Altında Ölüm Nedeni Olarak Kanser [81] 26
Şekil 2.11	Grafik Tabloları 2018'de (A) Her İki Cinsiyet, (B) Erkek ve (C) Kadın için en sık görülen 10 kanser için vaka ve ölüm dağılımlarını göstermektedir [81] 28
Şekil 2.12	2018'de kadın meme kanserleri için bölgeye özgü görülme ve mortalite yaş-standartlaştırılmış oranların çubuk grafiği [81]..... 29
Şekil 2.13	A549 akciğer kanseri hücre hattı mikroskop görüntüsü [85] 30
Şekil 2.14	CHMP4C sinyallemede strese karşı cevabı [87] 31
Şekil 2.15	HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü [88] 32
Şekil 2.16	C6 glioma kanser hücrelerinin mikroskop görüntüsü [90]..... 33
Şekil 2.17	<i>Curcuma longa</i> Linn bitkisi [91] 34
Şekil 2.18	Curcumin'in kimyasal yapısı ve biyolojik kaynakları [92] 36
Şekil 2.19	Curcuma türlerinin uçucu yağlarındaki kilit uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları [93]..... 37
Şekil 2.20	Curcumin ve diğer doğal analogları [91]..... 38
Şekil 2.21	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe bitkisi [91]..... 39
Şekil 2.22	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe bitkisinin bileşenleri [98] 40

Şekil 2.23	Zencefil, zencefil köksapı ve ana aktif bileşenleri: 6-gingerol, 6-shogaol ve 6-paradol [100].....	41
Şekil 2.24	Roskovitin'in kimyasal yapısı [102].....	43



ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	Bitki çalışmalarında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler..... 46
Çizelge 3.2	Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar 46
Çizelge 3.2	Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar (devamı)..... 47
Çizelge 3.3	Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar 48
Çizelge 3.4	Hücre kültüründe kullanılan kanser hücre hatları..... 48
Çizelge 4.1	Doza bağlı <i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağı ve 10 µM Roskovitin uygulanmış HepG2 hücre hattı MTT sonuçları..... 56
Çizelge 4.2	<i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağının HepG2 hücreleri için IC değerleri..... 57
Çizelge 4.3	Doza bağlı <i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağı ve 20 µM Roskovitin uygulanmış A549 hücre hattı MTT sonuçları 58
Çizelge 4.4	<i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağının A549 hücreleri için IC değerleri.. 59
Çizelge 4.5	Doza bağlı <i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağı ve 30 µM Roskovitin uygulanmış C6 hücre hattı MTT sonuçları 60
Çizelge 4.6	<i>Curcuma longa</i> Linn uçucu yağının C6 hücreleri için IC değerleri 61
Çizelge 4.7	Doza bağlı <i>Zingiber officinale</i> Roscoe uçucu yağı ve 10 µM Roskovitin uygulanmış HepG2 hücre hattı MTT sonuçları 62
Çizelge 4.8	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe uçucu yağının HepG2 hücreleri için IC değerleri..... 63
Çizelge 4.9	Doza bağlı <i>Zingiber officinale</i> Roscoe uçucu yağı ve 20 µM Roskovitin uygulanmış A549 hücre hattı MTT sonuçları..... 64
Çizelge 4.10	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe uçucu yağının A549 hücreleri için IC değerleri..... 65
Çizelge 4.11	Doza bağlı <i>Zingiber Officinale</i> Roscoe uçucu yağı ve 30 µM Roskovitin uygulanmış C6 hücre hattı MTT sonuçları 66
Çizelge 4.12	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe uçucu yağının C6 hücreleri için IC değerleri..... 67

ÖZET

***Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe Bitkilerinden Uçucu Yağ Eldesi ve Bazı Kanser Hücre Hatları Üzerinde Sitotoksik Etkisi**

Merve YÜKSEL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Akın SEVİNÇ

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde kanser hastalığının giderek artış göstermesiyle birlikte literatürde kanser hücre hatları üzerine birçok yayın yapıldığı gözlenmektedir. Farklı tür kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmaların birçoğunda antikanser özellikteki etkin maddenin kanser hücreleri üzerindeki etkisi incelenmektedir. Geçtiğimiz son otuz yılda, kanser ilaçlarının bitki ekstraktlarından elde edildiği gözlemlenmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan bitki kökenli ilaçlar yer almaktadır. En iyi kanser ilaçları olarak bilinen vincristine ve vinblastine, Vinca alkaloidleri olarak adlandırılan *Vinca rosea* (Cezayir menekşesi) bitkisinden izole edilmektedir, bunun yanı sıra taksol ilacının etken maddesi porsuk ağacından elde edilmekte ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardır. Doğal ürünlerin incelenmesi kanser tedavisinde kullanılan yeni ilaçların keşfedilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Bitkilerden hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağlar, özellikle antimikrobiyal aktivite gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler göstermekte ve uzun zamandır çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Bazı uçucu yağların kanser hücreleri üzerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreyi apoptoza götürdüğü belirtilmiştir.

Asya mutfağında yaygın olarak kullanılan *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinin bileşenleri; antikanser, antioksidan gibi önemli özellikler taşımaktadır. *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinin üzerine en çok araştırılma yapılan bileşenleri sırasıyla curcumin ve gingerollerdir.

Kanser hücrelerinde artan proliferasyon potansiyelinin indirgenmesi hücre devrinde rol alan siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK)'ı hedef haline getirmiştir. CDK inhibitörlerinden biri olan roskovitin, CDK'ların ATP bağlanma bölgesine bağlanmak için ATP ile rekabet etmektedir. Roscovitin; hücre döngüsü, kanser, apoptoz ve nörobiyoloji çalışmalarında biyolojik bir molekül olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tez kapsamında kurutulmuş *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden hidrodistilasyon yöntemi ile bitkilerdeki uçucu yağlar elde edilmiştir. Hücre kültürü teknikleriyle; HepG2, A549 ve C6 kanser hücre hatları her biri optimum koşullarda kültüre edilip, MTT yöntemi ile uçucu yağların sitotoksitesisi beş farklı konsantrasyonda 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL olarak değerlendirilmiştir. Bunun yanısıra kemoterapötik bir ajan olan roskovitin yapılı literatür taramasında üç farklı kanser hücre hattının IC₅₀ değerleri için; HepG2 karaciğer kanser hücre hattında 10 µM, A549 akciğer kanseri hücre hattında 20 µM, C6 glioma hücre hattında 30 µM dozları kullanılmıştır.

Deneyisel veriler doğrultusunda; *Curcuma longa* Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağın beş farklı konsantrasyonda HepG2 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 256 µg/mL, A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 448 µg/mL, C6 glioma hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 252 µg/mL'dir. *Zingiber officinale* Roscoe bitki sinden elde edilen uçucu yağın beş farklı konsantrasyonda HepG2 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 153 µg/mL A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 365 µg/mL, C6 glioma hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 60 µg/mL'dir.

Sonuç olarak, kurutulmuş *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden elde edilen uçucu yağların ve roskovitin ajanının HepG2, A549 ve C6 kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Curcuma longa* Linn, *Zingiber officinale* Roscoe, HepG2, A549, C6 ve MTT yöntemi

ABSTRACT

Obtaining Essential Oil From *Curcuma longa* Linn And *Zingiber officinale* Roscoe Plants And Cytotoxic Effect On Some Cancer Cell Lines

Merve YÜKSEL

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Co-Adviser: Asst. Prof. Dr. Akın SEVİNÇ

In recent years, with the increasing number of cancer diseases in the world and in our country, there are many publications on cancer cell lines in the literature. In many studies with different types of cancer cell lines, the effect of the anticancer agent on cancer cells is investigated. In the last thirty years, it has been observed that cancer drugs are obtained from plant extracts. Today, there are plant-based drugs used in cancer treatment. The vincristine and vinblastine, known as the best cancer drugs, are isolated from the plant of *Vinca rosea*, known as Vinca alkaloids, as well as the active substance of the taxol drug derived from the yew tree and are the chemotherapeutic agents commonly used in the treatment of cancer. Examination of natural products has an important role in the discovery of new drugs used in cancer treatment.

Essential oils obtained from plants by hydrodistillation show a wide range of biological activities, especially antimicrobial activity, and have long been used to treat various human diseases. Some essential oils have been shown to inhibit cell proliferation on cancer cells and to lead the cell to apoptosis.

Curcuma longa Linn and *Zingiber officinale* Roscoe plants commonly used in Asian; anticancer, antioxidant as well as important features. The most studied components of

Curcuma longa Linn and *Zingiber officinale* Roscoe plants are curcumin and gingerols, respectively.

Reducing the proliferation potential of cancer cells has led to cyclins and cycline-dependent kinases (CDK) that have been involved in the cell cycle. One of the CDK inhibitors, roscovitine, competes with ATP to bind to the ATP binding site of CDKs. The Roscovitine; It is widely used as a biological molecule in studies of cell cycle, cancer, apoptosis and neurobiology.

In the scope of the thesis, the essential oils in plants were obtained from the dried *Curcuma longa* Linn and *Zingiber officinale* Roscoe plants by hydrodistillation method. Cell culture techniques; HepG2, A549 and C6 cancer cell lines were cultured at optimum conditions and the cytotoxicity of volatile oils by MTT method was measured at five different concentrations of 0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml was assessed as 1000 µg/ml. And also for the IC₅₀ values of three different cancer cell lines in the literature review of roscovitine, a chemotherapeutic agent; HepG2 liver 10 µM in the cancer cell line, 20 µM in the A549 lung cancer cell line and 30 µM in the C6 glioma cell line were used.

According to experimental data; The volatile oil obtained from the *Curcuma longa* Linn plant has an IC₅₀ value of 256 µg/ml on HepG2 liver cancer cells at five different concentrations, the IC₅₀ on A549 lung cancer cells is 448 µg/ml, and the IC₅₀ on C6 glioma cells is 252 µg/ml. The essential oil obtained from the *Zingiber officinale* Roscoe plant has an IC₅₀ value of 153 µg/ml on HepG2 liver cancer cells at five different concentrations, 365 µg/ml on A549 lung cancer cells, and IC₅₀ on C6 glioma cells at 60 µg/ml.

As a result, the cytotoxic effects of essential oils and roscovitin agents obtained from dried *Curcuma longa* Linn and *Zingiber officinale* Roscoe plants on HepG2, A549 and C6 cancer cell lines were investigated *in vitro*.

Keywords: *Curcuma longa* Linn, *Zingiber officinale* Roscoe, HepG2, A549, C6 and MTT Assay

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kanser, düzenli olmayan hücre büyümesi ve hücrelerin bulunduğu yerden başka bir yere göçü ile karakterize olan bir hastalık grubudur [1]. Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur. Homeostasis; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı hücre ölümü) ile sürdürülmektedir. Hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması hiperplazi veya neoplaziye neden olur. Hücreler, iki mitoz bölünme arasında geçen süreyi hücre döngüsüyle kontrol etmektedirler. Bu kontrol, hücre ve dokunun bütünlüğünü korumak için hayati öneme sahiptir. Hücre devri mekanizması, bir grup gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerin ifadelerinin artması veya azalması ile hücre proliferasyonu gerçekleşmektedir. Hücrenin normal bir şekilde gelişmesi için hücre çoğalmasını teşvik eden genlerin aktive olması ile onu baskılayan genler arasında bir dengenin olması gerekmektedir [2]. Moleküler düzeyde kanser incelendiğinde, hücre içinden ya da hücre dışından gelen sinyallerin baskılanması veya ifadelerinin artması ile meydana gelmektedir [3].

Son yıllarda kanser hastalığının görülme sıklığının artış göstermesiyle birlikte kanserden korunmak için farklı kaynaklara gidilerek doğal bitkisel özütlerden faydalanılmak istenmektedir. Kanser hücre hatları üzerine yapılan çalışmalarda, antikanser özellikteki etkin bir maddenin kanser hücreleri üzerinde ki etkisi incelenmektedir.

Kanser tedavisinde; kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi yaygın olarak kullanılmaktadır; fakat bu tedavi seçeneklerinin birçok yan etkileri bulunmaktadır [1]. Bu nedenle, araştırmacılar doğal bitkisel kaynaklardan yararlanmaktadırlar. Özellikle anti-kanser, anti-tümörigenez ve anti-imflamatuvar özellikteki etkin maddeler içeren bitkilerden elde edilen bileşenler kanser çalışmalarında kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır [4, 5]. Kemoterapötik ajanlar; bitki kökenli, özellikle meyveler, yapraklar, çiçekler, kökler, likenler ve mantarlardan türetilmektedir.

Bitkiler; binlerce yıldır insan sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bitkilerden; baharat, içecek, kozmetik, boya ve ilaçların bileşenlerinde kullanılmak üzere farklı kısımlarından yararlanılmaktadır [6]. Günümüzde, bitkisel ilaçlara sentetik ilaçlardan daha fazla ilgi duyulmaktadır; çünkü bitkiler, insan sağlığını destekleyebilen doğal aktif bileşikler ihtiva ederler [7].

Geçtiğimiz son otuz yılda, kanser ilaçlarının bitki ekstraktlarından elde edildiği gözlemlenmektedir [8]. En iyi kanser ilaçları olarak bilinen vincristine ve vinblastine, Vinca alkaloidleri olarak adlandırılan *Vinca rosea* (Cezayir menekşesi) bitkisinden izole edilmektedir ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardır [9].

Ülkemizde baharat olarak kullanılan ve Asya'da ise yaygın olarak yetiştirilen *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkileri antikanser özelliği saptanmış çok yıllık bitkilerdir [10]. *Curcuma longa* Linn, Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olup Hindistan, Güneydoğu Asya ve özellikle tropikal ülkelerde doğal olarak yetişmektedir. *Curcuma longa* Linn eski tıbbi metinlerde ve geleneksel Çin tıbbında çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve iyileştirilmesi için faydalı olduğu belirtilmektedir [11]. *Curcuma longa* Linn üzerine yapılan çalışmalar 19.yy itibariyle başlamıştır ve çalışmalar sonucunda *Curcuma longa* Linn'den elde edilen "Curcumin" bileşeninin antiinflamatuvar [12], antioksidan [13], tümörigenez inhibisyonu [14], proapoptotik ve antianjiyojenik [15] gibi birçok özellikleri belirlenmiştir [16]. Curcumin ilk kez 1815'de Vogel ve Pelletier tarafından saf olmayan biçimde ekstrakte edilmiştir, 1870'de Daube tarafından saf ve kristal forma getirilerek [17], Roughley ve Whitting tarafından da 1973'te kimyasal yapısı belirlenmiştir. Curcumin'in ilk farmakolojik incelemesi 1815'de Vogel ve Pelletier tarafından yayınlanmıştır. İnsan hastalıklarında curcumin kullanımına atıfta bulunan ilk makale 1937'de Oppenheimer tarafından yayınlanarak safra yolları

hastalıklarında curcumin etkisini araştırmışlardır [18]. Curcumin, eski Asya tıbbında kullanılan bir hidrofobik fenol olup *Curcuma longa* Linn'den köklerinden izole edilmektedir [19]. Curcumin; antioksidan, antikanser aktiviteleri gibi çeşitli terapötik özellikleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmektedir [16]. Günümüzde antikanser özellikteki bitkinin ekstratlarını kanser hücre hatlarına uygulayarak hücreyi apoptoza götüren çeşitli hücre sinyal mekanizmaları üzerine etkileri incelenmektedir [20]. *Curcuma longa* Linn'den izole edilen curcumin bileşeninin proapoptotik genler, özellikle de *p53* geni üzerindeki etkileri incelenmiştir [17]. Curcumin belirgin kimyasal özelliklerine dayanarak, kanser başlangıcı ve ilerlemesinde aktif rol alan ve kanser ilerlemesini engelleyen çok sayıda hücre dışı ve hücre içi molekül ile etkileşime girer [21]. Bu özellikler arasında; apoptoz, tümör proliferasyonu ve metastazlarda yer alan çeşitli biyolojik yollarla kanser üzerindeki önleyici etkisi önemli düzeyde araştırılmaktadır [14].

Yang ve arkadaşları curcuminin, küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattında apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur [22]. Yapılan bir çalışmada; curcumin, kseno-transplant hayvan modellerinde, insan tümörlerinin büyümesi, curcumin tarafından tek başına inhibe edildiği belirtilmiştir [23]. Banerjee ve arkadaşları, curcuminin hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini, mikrotübül organizasyonunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve meme kanseri hücrelerinde mitotik kontrol noktasını aktive ettiğini bildirmiştir [24]. Curcumin'in bir tür meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün G1 fazında hücre birikmesine neden olduğunu ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yolağının uyarılması yoluyla EZH2'nin curcumin kaynaklı gen ifadesinin azaldığı belirtilmiştir [25]. Memeli hücrelerinin birçoğunda, hücre bölünme sürelerini kontrol eden bir hücre döngüsü (devri) mekanizması bulunmaktadır [26]. Hücreler, iki mitoz bölünme arasında geçen süreyi hücre döngüsüyle kontrol etmektedirler. Bu kontrol, hücre ve dokunun bütünlüğünü korumak için hayati öneme sahiptir. Hücre devri mekanizması, bir grup gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerin ifadelerinin artması veya azalması ile hücre proliferasyonu gerçekleşmektedir. Hücrenin normal bir şekilde gelişmesi için hücre çoğalmasını teşvik eden genlerin aktive olması ile onu baskılayan genler arasında bir dengenin olması gerekmektedir [2]. Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra hücre döngüsü G -S-G (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanmaktadır. Bu süreçte hücreye gelen sinyallerle büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları

sürece istirahat fazı G_0 da durmaktadırlar. G_1 , S, G_2 fazları (Interfaz) hücre siklusunun %90'nını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. Hücre büyümesi G_1 fazında kontrol noktasında bazı genler tarafından koordine edilir. Kontrol noktasında hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır. G_1 fazında kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA replikasyonu için hazırlık yapılmaktadır. RNA ve protein sentezi gerçekleşir. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G_2 fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda protein sentezi gerçekleşir, hücre mitozu hazırlanmaktadır.

Zingiber officinale Roscoe, Zingiberaceae ailesine ait bir bitkidir. Güneydoğu Asya'da ortaya çıkmış ve daha sonra birçok ülkede gıdaya lezzet katmak için bir baharat ve çesni olarak kullanılmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe, çeşitli hastalıklar için bitkisel ilaç olarak yaygın kullanılan bir baharat ve gıda olarak da tüketilebilen bir bitkidir. Dünya genelinde gıdalar ve içeceklerde baharat olarak kullanılan *Zingiber officinale* Roscoe genellikle dispepsi, kolit, mide bulantısı, kusma, gastrit ve diyare gibi sindirim sistemi için bir tedavi edici olarak tıbbi özellikleri ile bilinmektedir [27, 28]. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisi; paradollar, shogaollar ve gingerolar gibi uçucu olmayan çeşitli biyoaktif fenoliklerin önemli bir kaynağıdır [29]. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinin; antiinflamatuvar [30], antioksidan [31], antikanser [32], antianjiyogenezis [33] aktiviteler gösterdiği bilinmektedir ve bu nedenle kemopreventif bir ajan olduğunu göstermektedir [34]. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisini oluşturan fenoliklerin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar ve antianjiyogenezis özellikleri sergilediği gösterilmiştir [35]. *Zingiber officinale* Roscoe, antioksidan ve antiserojenik özelliklere sahip doğal bir bileşeni 6-gingeroldür ve bu bileşen 6-shogaol ile benzer özellikleri sergilemektedir [34]. Kurutulmuş *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinde bulunan 6-shogaol ve 6-gingerol bileşenleri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Mide kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada 6-gingerol ve 6-shogaol bileşenlerinin mide kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir, ayrıca 6-shogaol bileşeninin mitotik arreste neden olduğu ve mide kanseri hücrelerinde caspaz-3/7 yolağını aktive ettiği belirlenmiştir [36]. 6-shogaol tarafından indüklenen epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun inhibe edildiği ve hücresel proliferasyon ve anjiyogenezde rol alan NF- κ B aracılı gen ürünlerinin ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu faktörlerin yumurtalık kanserlerinde tümör hücresi çoğalması, anjiyogenezis ve apoptotik yanıtı etkilediği de gösterilmiştir [37].

1.2 Tezin Amacı

Dünya’da ve ülkemizde kanser hastalığının görülme sıklığının giderek artış göstermesiyle birlikte literatürde kanser hücre hatları üzerine birçok yayın yapıldığı gözlenmektedir. Farklı tür kanser hücre hatlarıyla yapılan çalışmaların bir çoğunda anti-kanser özellikteki etkin maddenin kanser hücreleri üzerindeki etkisi incelenmektedir. Geçtiğimiz son otuz yılda, kanser ilaçlarının bitki ekstraktlarından elde edildiği; antikanser, antitümörigenez ve antiinflamatuvar özellikteki etkin maddeleri içeren bitkilerden elde edilebilen bileşenler, kanser çalışmalarında kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden antikanser özellikteki kimyasal bileşenlerinin ortaya çıkarılması ve bu kimyasal bileşenlerin farklı tür kanser hücre hatları üzerindeki etkinliğine bakılması hedeflenmektedir. Kurutulmuş *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden uçucu yağ tayini hidrodistilasyon yöntemi kullanılarak elde edilmesi ve hücre kültürü teknikleriyle uçucu yağların üç farklı kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir.

1.3 Hipotez

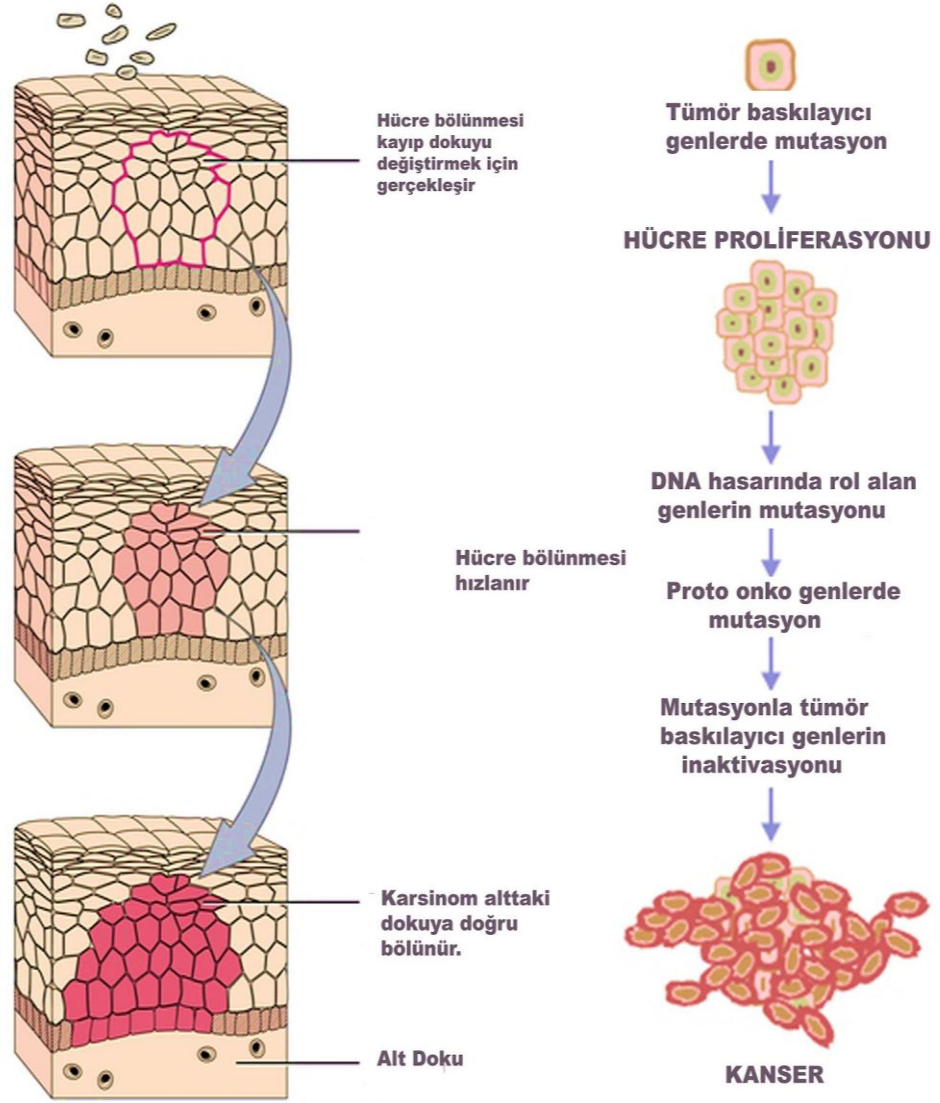
Kurutulmuş *Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden uçucu yağ tayini hidrodistilasyon yöntemi kullanılarak elde edilmesi, bitkilerden antikanser özellikteki kimyasal bileşenlerin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Hücre kültürü teknikleriyle uçucu yağların kanser hücre hatlarına verilmesi, optimum koşullarda çoğalan hücrelere MTT yöntemiyle uçucu yağların kanser hücrelerinde farklı konsantrasyonlardaki hücre canlılığı gözlemlendi. Roskovitin ilacının ve bitkilerden elde edilen uçucu yağlarının herbirinin üç farklı kanser hücre hattında ki sitotoksik etkisi ve IC₅₀ değeri incelenmiştir.

KANSER HASTALIĞI

2.1 Tanımı

Tüm organizmalar hem doku hem de hücresele düzeyde tanımlanmış bir boyuta ve şekile sahiptir. Vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler fakat, bu yetenekleri sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Normal koşullarda hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde gerçekleşmektedir [38]. Kanser hücresele düzeyde genetik bir hastalık olup hücrelerin işlevini kontrol eden özellikle de büyüme ve çoğalma ile ilgili genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [1]. Kanser hücreleri, vücuttaki iç dengenin düzensizliğinden kaynaklanan kontrol edilemeyen sınırsız bölünme potansiyeline sahiptirler [39].

KANSER GELİŞİMİ



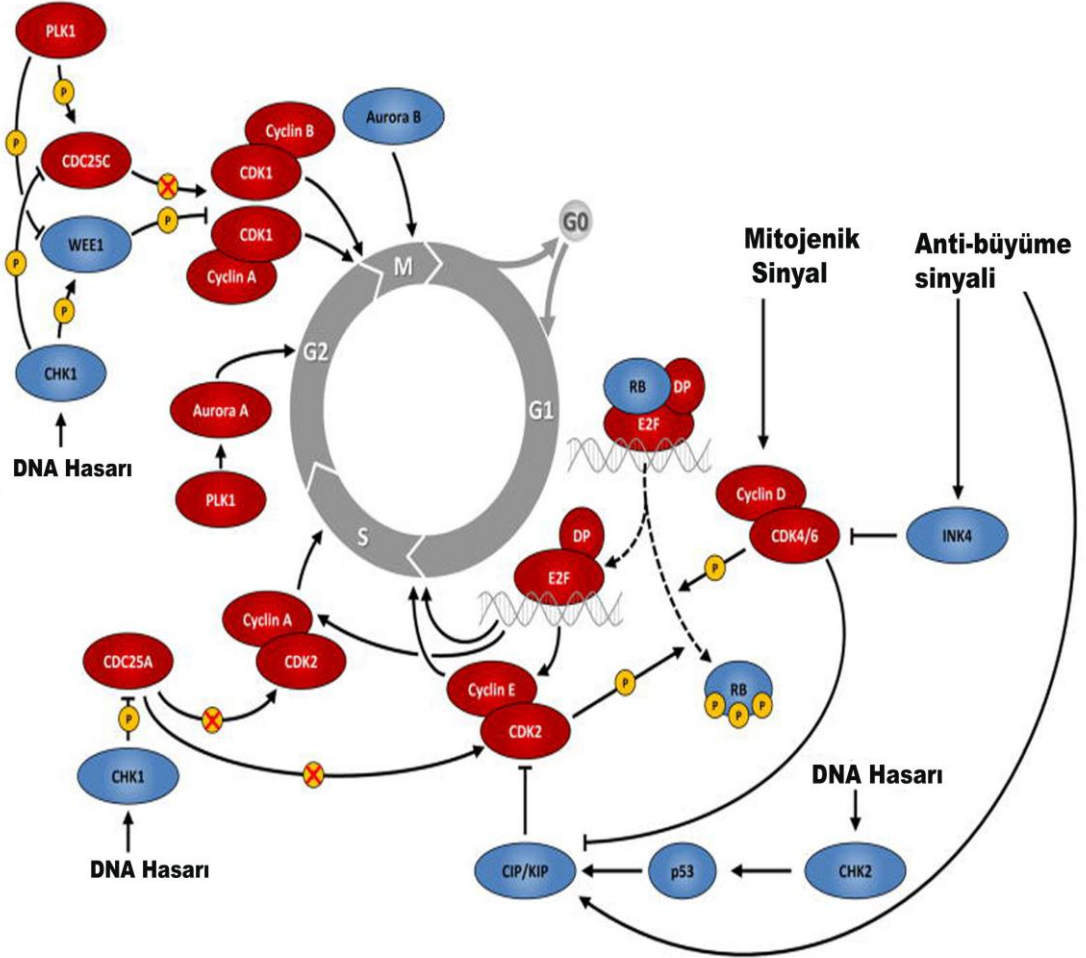
Şekil 2.1 Normal hücreden kanser hücresi gelişimi [40]

Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur. Homeostasis; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı hücre ölümü) ile sürdürülmektedir. Hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengenin bozulması hiperplazi veya neoplaziye neden olur.

Memeli hücrelerinin birçoğunda, hücre bölünme sürelerini kontrol eden bir hücre döngüsü (devri) mekanizması bulunmaktadır [26]. Hücreler, iki mitoz bölünme arasında geçen süreyi hücre döngüsüyle kontrol etmektedirler. Bu kontrol, hücre ve dokunun bütünlüğünü korumak için hayati öneme sahiptir. Hücre devri mekanizması, bir grup gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerin ifadelerinin artması veya azalması ile hücre proliferasyonu gerçekleşmektedir. Hücrenin normal bir şekilde gelişmesi için hücre çoğalmasını teşvik eden genlerin aktive olması ile onu baskılayan genler arasında bir dengenin olması gerekmektedir [2]. Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G-S-G (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücreye gelen sinyallerle büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı G₀ da durmaktadırlar. G₁, S, G₂ fazları (Interfaz) hücre siklusunun %90'nını kapsar ve 16-24 saat sürer. Hücre büyümesi G₁ fazında kısıtlayıcı nokta (R point) tarafından koordine edilir. Kontrol noktasında hücre duracak veya hücre siklusunu tamamlayacaktır. G₁ fazında kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA replikasyonu için hazırlık yapılmaktadır. RNA ve protein sentezi gerçekleşir. S fazında ise DNA sentezlendikten sonra, G₂ fazında hücre büyümeye devam eder aynı zamanda RNA sentezi protein sentezi gerçekleşir, hücre mitozla hazırlanmaktadır.

Mitojenik sinyaller, esasen retinoblastoma proteinini (RB) fosforile ederek ve ardından transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesi tarafından transkripsiyonunu aktive ederek, G₁ fazından S fazına ilerlemesini destekleyen siklin ve sikline bağlı kinaz komplekslerini (CDK'ler) aktive eder. Büyümeyi önleyici sinyaller, INK4 ve CIP / KIP ailelerinin CDK inhibitörlerini yukarı doğru düzenleyerek G₁-S ilerlemesini antagonize eder. S fazı ve G₂ fazından mitoz haline (M fazı) geçiş, Polo benzeri kinaz 1 (PLK1) ve Aurora kinazlar (Aurora A/B) gibi çeşitli diğer proteinlerle birlikte siklin-CDK kompleksleri tarafından kontrol edilir. Hücreler ayrıca hücre döngüsünden çıkıp geri dönüşümlü veya kalıcı bir hücre döngüsü durdurma (G₀ fazı) girebilir.

Ek olarak, DNA hasarı bazı özel proteinler tarafından algılanır ve G1 fazındaki kontrol noktası kinaz 2 (CHK2) ve p53 veya S veya G2 fazındaki kontrol noktası kinaz 1 (CHK1) yoluyla hücre döngüsü durmasını tetikler. Kırmızı ve mavi ovaler, sırasıyla hücre döngüsü ilerlemesinin pozitif ve negatif düzenleyicilerini belirtir [41].

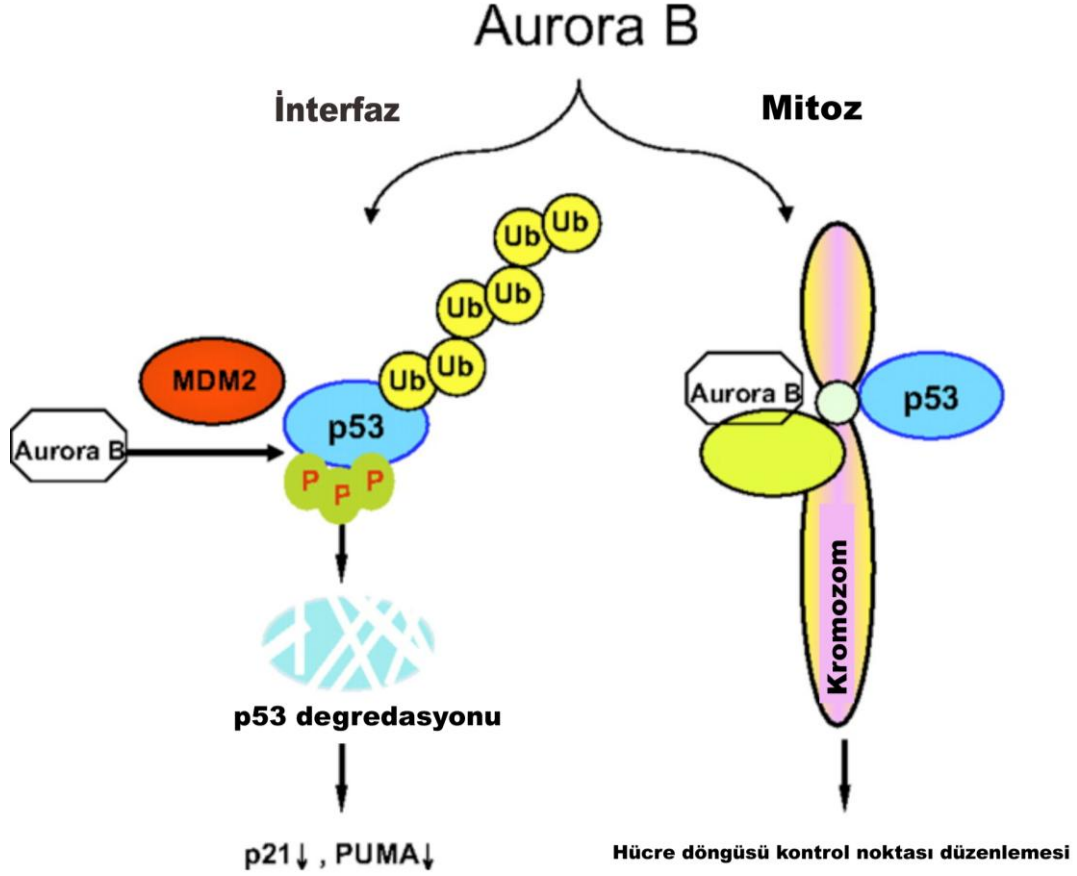


Şekil 2.2 Hücre döngüsü ilerlemesi ve ana düzenleyici proteinler [41]

CDC25, hücre bölünme döngüsü 25; CIP, CDK ile etkileşime giren protein; G1, aralık 1; G2, aralık 2; CDK4 inhibitörü INK4; KIP, kinaz inhibe edici protein.

Aurora kinaz ailesi hücre siklusunu G/M kontrol noktasından sonra mitoz kontrol noktasında ve sitokinezin sonuna doğru rol oynamaktadır. Aurora kinazlar düzenli hücre bölünmesi için gereklidir. Aurora kinazların kromozom dizilimi, kromozom ayırımında ve sitokinesisde önemli rolleri vardır. Aurora kinaz ailesi, insan kanserlerinde sıklıkla aşırı eksprese edilen ve kanser hücrelerinde kromozomal instabilite gelişimini içeren onkojenik transformasyona dahil olan önemli mitoz düzenleyicileridir. İnsanlarda, kinaz ailesinin üç üyesi arasında, Aurora A, B ve C, sadece Aurora-A ve B, mitotik hücre bölünmesi için somatik hücrelerde önemli düzeyde eksprese edilir. Kanser ilişkili fenotiplerin gelişimi ile ilgili hücresel yollarda Aurora-A ve B, antikanser tedavisi için potansiyel hedefler olarak araştırılmaktadır. Aneuploidi olan tümörlerde Aurora kinazın fazla ekspresyonu ve sentrozom amplifikasyonu belirlenmiştir. Aurora A kinaz p53 gibi tümör baskılayıcı proteinleri fosforilleyerek onların aktivitelerini de düzenlemektedir. Aurora A ve B'nin Ras yolağı aracılığı ile hücre transformasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle Aurora kinaz inhibitörleri ile hücre siklusu bloke edilerek kanser tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır [42].

İnterfazda, Aurora B, p53'ü fosforile eder, p21 ve PUMA gibi hücre döngüsü / apoptoz düzenleyicilerin ifadesini düzenleyen MDM2 aracılı ubiquitinasyon ile degrade olmasına neden olur. Metafazda, Aurora B sentromer bölgesinde p53 ile birleşerek kontrol noktasını düzenlerler [43].



Şekil 2.3 P53 ve Aurora B arasındaki etkileşim [43]

Moleküler düzeyde kanser incelendiğinde, hücre içinden ya da hücre dışından gelen sinyallerin baskılanması veya ifadelerinin artması ile bu sinyallere cevap oluşturmaktadırlar [3]. Kansere neden olan ajanların (karsinogenez) birçoğu DNA’da mutasyonlara sebep olmaktadır. Karsinogenezde rol oynayan en önemli faktörler arasında beslenme, sigara ve çevresel faktörler yer almaktadır. Güneş’den gelen ultraviyole (UV) ışınlar karsinogenettir [44].

Ozon tabakasını geçerek yeryüzüne ulaşabilen UV ışınları, UVA (320-400 nm) ve UVB’dir (280-320 nm) [45]. UVB ışını epidermal hücrelerde, DNA hasarına neden olarak özellikle de siklobutan pirimidin dimerlerine (CPD) etki ederek kanser gelişimine yol açabilmektedir [46]. UVB, DNA hasarına yol açan CPD ve 6-4 fotoluminesans (6-4PP) üretir. Bu fotonlar, DNA sarmalının yapısını, transkripsiyonu ve replikasyonunu etkileyebilir [47].

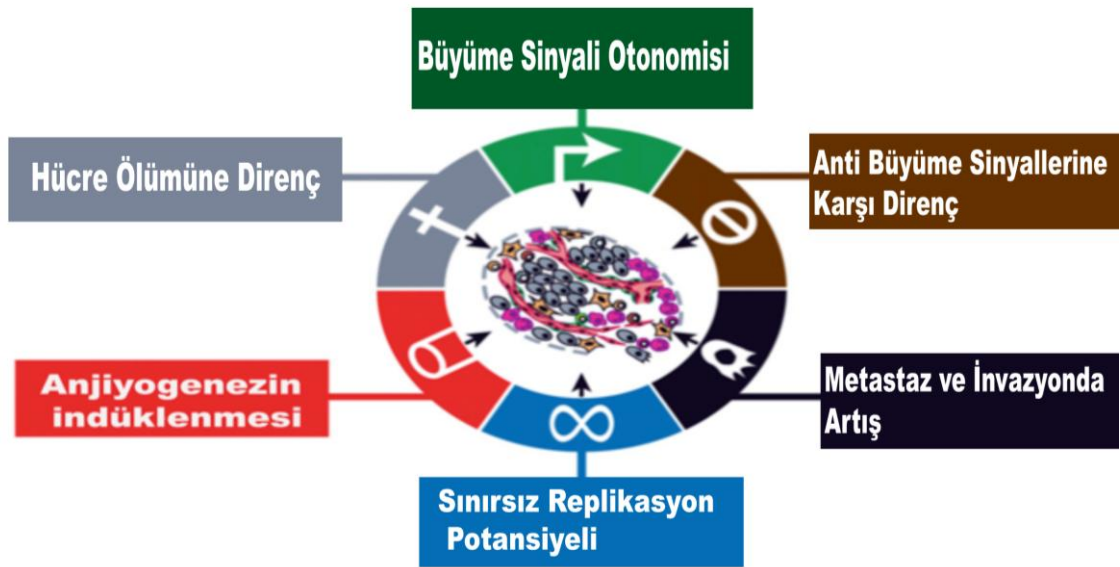
Eğer bu ürünler DNA onarım mekanizmasıyla tamir edilmezse, UV-parmak izi mutasyonu olarak bilinen C> T veya CC> TT mutasyonları meydana gelir [48].

Transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, UVA radyasyonunun melanom oluşumunda melanom varlığında oksidatif DNA hasarından kaynaklandığı, UVB radyasyonunun melanom oluşumunda melanin pigmentine ihtiyaç duymadan doğrudan DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir [49].

BRAF mutasyonları, cilt kanserinde en yaygın mutasyona uğrayan (%50-70) genidir, *BRAF*^{V600E} en yaygın mutasyondur ve genellikle melanomda öncül olarak ortaya çıkar [50]. *BRAF* geni, UV'ye maruz kalan melanomdaki en yaygın mutasyondur ve ikinci en yaygın mutasyon *NRAS* genindedir [51].

2.2 Kanser'in Başlıca Özellikleri

2000 yılında Hanhan ve Weinberg tarafından kanserin altı önemli özelliğini belirlendi. Bunlar; proliferatif sinyallemeyi sürdürmek, büyüme sinyalleri engelleyicileri, apoptotik hücre ölümünde bozukluklar, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenez, invazyon ve metastazın kanserde olduğunu belirttiler [52]. Son on yıldaki kavramsal ilerleme, kanserin bu altı özelliğine ortaya çıkan iki yeni özellik eklemiştir; enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün sistemden kaçma olarak belirtilmiştir [53].



Şekil 2.4 Hanhan ve Weinberg tarafından belirlenen kanserin altı önemli özelliği [52]

2.2.1 Büyüme Sinyali Otonomisi

Kanser hücrelerinin en temel özelliği, kronik proliferasyonu sürdürme yeteneklerinin olmasıdır. Normal dokular, hücre büyümesi ve bölünmesi için hücre döngüsünde büyümeyi teşvik edici sinyallerin üretimini ve salımını düzenli bir şekilde kontrol eder. Böylelikle hücre sayısının bir homeostazı sağlanır ve normal doku mimarisi ve fonksiyonunun korunması gerçekleşir. Hücre büyümesinin yanı sıra hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi düzenleyen hücre içi sinyal yoluyla sinyaller vermeye devam eder; genellikle bu sinyaller hücre sağkalımı ve enerji metabolizması gibi diğer hücrenin biyolojik özelliklerini etkiler [54]. Normal hücreler bölünebilmek için dışarıdan büyüme faktörü sinyaline gerek duyar. Kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildir. Kanser hücreleri, proliferatif sinyalleme bir dizi alternatif yolla sürdürme kabiliyetini kazanabilirler: Bunlar, otokrin proliferatif stimülasyon ile sonuçlanan, konik reseptörlerin ekspresyonu yoluyla cevap verebilecekleri büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler.

Alternatif olarak, kanser hücreleri, kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak, tümörle ilişkili stroma içinde normal hücreleri uyarmak için sinyaller gönderebilir. Kanser hücreleri bu sinyalleri serbest bırakırlar ve sinyaller büyük ölçüde, tipik olarak hücre içi tirozin kinazları içeren hücre yüzeyi reseptörlerini bağlayan büyüme faktörleri tarafından iletilir [55]. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve EGF-ligand bağlanması ve Akt, JAK / STAT veya ERK gibi down regüle sinyalleşme araçları tarafından aktivasyon yoluyla hücre çoğalması ve hareketliliğinden dolayı önemli bir role sahiptir [56]. Kanser hücrelerinin alternatif splicing manipülasyonu yoluyla adaptasyonunun tipik bir örneği, ekson 4 bir ek varyantının karakterizasyonu ile örneklendirilmiştir; birkaç kanserde (gliomalar, prostat ve yumurtalık kanseri) bulunur, ancak normal dokularda yoktur. Eksik ekzon işlevi, yapısal olarak aktif olan ve çoğalmayı teşvik eden bir reseptöre dönüşür [57]. Benzer şekilde, *BRAF*'ın alternatif splicingi kanserde ve tedavisinde kritik bir yere sahip olabilir. *BRAF*, aktif Ras tarafından kontrol edilen bir kinazdır ve melanomların %450'sinde mutasyona uğrar (*BRAF*^{V600E}) [58]. Mutant *BRAF*'a karşı etkili inhibitörler geliştirilmiştir ve klinikte kullanılmaktadır (örneğin, vemurafenib), ancak tedaviye direnç önemli bir sorundur. *KRAS*, hücre çoğalması, farklılaşması ve göçünde merkezi bir rol oynayan Ras GTPaz ailesinin üyelerinden biridir. *KRAS*'da ki

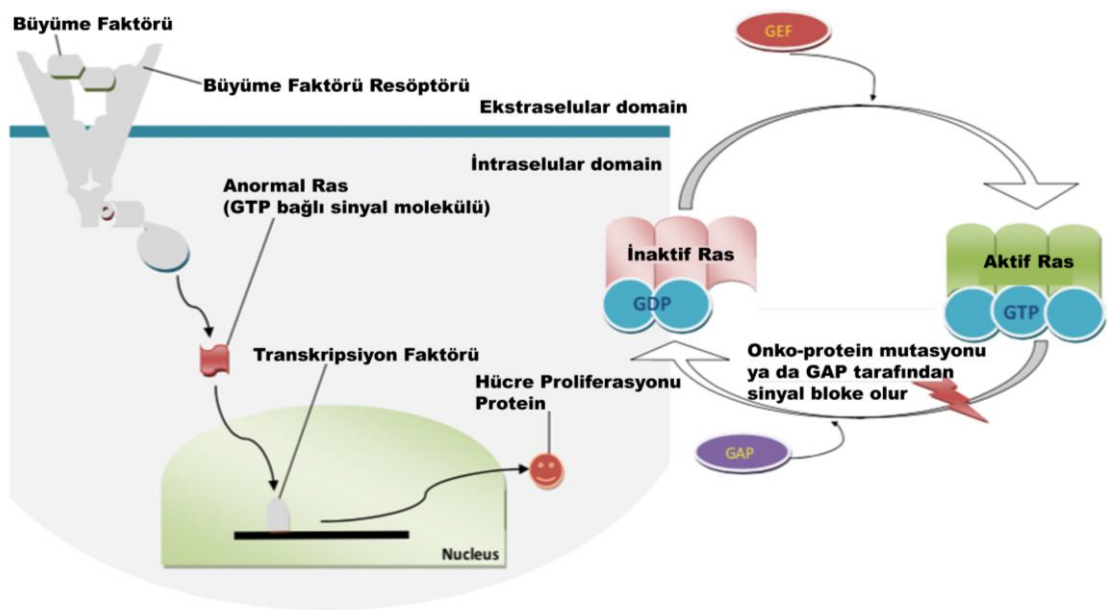
birçok mutasyon birçok kanserle ilişkilendirilir ve en belirgin şekilde ise kolon kanseri neden olmaktadır [59].

İnsan tümörleri sıklıkla nokta mutasyonla aktive olan Ras proteinlerini eksprese eder. İnsan kanserinde en sık mutasyona uğrayan genlerdeki mutasyonlar, tüm tümör tiplerinin yaklaşık %30'unda ve kolorektal kanserin %50'sinde gerçekleşir[60]. Üç farklı Ras proto onkogen izolatu Harvey-Ras (*HRAS*), Kirsten-Ras (*KRAS*) ve nöroblastoma-Ras (*NRAS*) olarak adlandırılır. Farklı Ras genlerindeki mutasyonların (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*) farklı kanserlerde yaygın olduğu bulunmuştur. Örneğin, *KRAS* mutasyonları pankreas, kolorektal, endometrial, biliyer, akciğer ve servikal karsinomlarda daha sık görülürken, *NRAS* ve *HRAS* mutasyonları sırasıyla melanomlarda ve idrar kesesi kanserinde bulunur. Ras, küçük bir GTP bağlayıcı proteindir. Ras mutasyonları, Ras'ın sınırsız bir sinyal üretmesi için aktive edilmesini sağlayarak, tümör oluşumunun etkisini arttırmak için GTPaz aktive edici proteinlere (GAP'ler) karşı Ras'ı duyarsızlaştırır. Ras aktivitesi GTP hidrolizi ile kontrol edilir ve GTP'ye bağımlı form etkili bir enzim gibi davranırken, GDP'ye bağlı form etkisizdir [61]. GEF ve GAP proteinleri, Ras ailesine bağlı küçük GTPaz enzimlerinin aktivitesini kontrol ederek hücresel fonksiyonları düzenleyen proteinlerdir. Genel olarak GEF'ler, GTP'nin GTP'den uzaklaşmasına izin vererek GTPazlara bağlı proteinlerdir; GAP, GTP hidrolizini artıran G proteinlerinde GTP hidroliz aktivitesidir. Ras ailesi proteinleri, hücre içindeki çeşitli proteinleri etkileyen ve konformasyonlarını ve fosforilasyonlarını değiştirerek hücre içi sinyal iletimini tetikleyen, iki konformasyon arasındaki GTP'ye bağlı veya GDP'ye bağlı formlara müdahale eder. Ras proteinleri, GEF veya GAP'yi aktive ederek RAL ve RHO gibi diğer benzer küçük G proteinlerini düzenler. Bu şekilde, Ras'ın hücre iskeletinde değişikliklere neden olduğu ve onkojenik Ras'ta yaygın olan hücre şekli, yapışma ve göçle sonuçlandığı düşünülmektedir [62].

Ras'ın hücre içi sinyal trafiğindeki rolü; normal ve malign hücrelerde hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve sağkalımını düzenlemek için önemli bir sinyal dönüştürücü işlevi görür. Kirsten ve Harvey tarafından sıçan sarkomu virüslerinde keşfedilen RAS proteinlerinin, hücre proliferasyonuna dahil olan önemli sinyal yollarının aktivitesini kontrol etmede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [63]. Tümör hücresinde aktive edilmiş Ras proteini; hücre proliferasyonunun deregülasyonu, programlanmış hücre ölümü ve istila ve anjiyogenez indüklemeye yeteneğine sahiptir. Çalışmalarda *KRAS*, *HRAS* ve *NRAS* proteinlerinin önemli düzeyde eksprese edildiği,

KRAS proteininin çok sayıda farklı hücre tipinde eksprese edildiği ve bu genden yoksun farelerde yapılan çalışmalarda normal gelişiminde aktif bir rol aldığı, *HRAS* ve *NRAS*'ın yaptığı gibi önemli bir rol oynamadığı belirtilmiştir [64].

Ras / Raf / MEK / ERK kaskadı, ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan bir serin / treonin protein kinazı olan MAPK için önemli bir sinyal yoludur. Bu basamak, transkripsiyon faktörlerini aktive ederek gen ekspresyon seviyelerini düzenler. MAPK sinyal yolu, normal hücrelerde olduğu gibi birçok kanser hücresinde çoğalma için gerekli olan RAF, MEK ve ERK proteinlerinden oluşur [65, 66]. Büyüme faktörü ile aktive olan reseptör tirozin kinazların ürettiği sinyalleri normal hücrelerde çekirdeğe ileterek gen ekspresyonunun aktivasyonunu indüklerler. Hücre dışı ve hücre içi uyaranlarla aktive edilebilirler ve değiştirilmiş gen ekspresyonuna ek olarak bir etki yaratabilirler [67]. Tümör hücrelerinde, reseptör tirozin kinazların veya Ras'ın onkojenik aktivasyonunun bir sonucu olarak MAPK sinyali sıklıkla artmaktadır. Bu MAPK yolu, her biri bir MAP kinazı (ERK1/2 gibi), bir MAPK kinazı (MEK1/2 gibi) ve bir MAP kinaz kinazı (RAF1, ARAF veya BRAF gibi) içeren yaklaşık 6 benzer proteinden oluşur. Hücrenin içinden veya dışından G-proteinlerinin aracılık ettiği hormonlardan ve sitokinlerden aldığı sinyaller; bu kinazlar fosforilasyon ile aktive edildiğinde, sinyal iletimi, hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre farklılaşması veya spesifik hücre fonksiyonlarını uyarak çekirdeğe aktarılır [65].



Şekil 2.5 Ras sinyallemedeki değişiklikler [68]

Ras, çeşitli sinyal yollarında hayati önem taşır ve ikili anahtar olarak işlev görür. Aktif olmayan bir durumda GDP (Guanin nükleotit DiFosfat) ve aktif halde GTP'yi (Guanin nükleotit TriFosfat) aktif halde (GF sinyalleşmesini uyardığında) bağlar. Aktif olmayan Ras, GEF (Guanin nükleotid Değişim Faktörü) tarafından GTP'nin GTP'si değiştirilerek aktive edilir. Bu adım kısa sürelidir, çünkü Ras, kendinden GTPase aktivitesine sahiptir, yani GTP'yi GDP'ye hidrolize eder (bir fosfat grubu çıkarılır), böylece aktif olmayan duruma geri döner. Bu GTPase aktivitesi GAP (GTPase-aktive edici proteinler) tarafından tetiklenir. GTPase fonksiyonunu bloke eden mutasyonlar veya onkoproteinler, Ras'ı sürekli aktif sinyalleşme durumunda kısıtlar [68]. Ras proteini hücrel büyüme, bölünme ve farklılaşmayı düzenleyen mekanizmalar açısından kilit bir role sahiptir. Hücre siklus ilerlemesi ve bölünmesi, mitozu, yani mitojeni destekleyen sinyal moleküllerinin uyarılmasıyla sağlanır [69]. Bu sinyaller genellikle hücrel Ras aktivitesinin uyarılmasına neden olan büyüme faktörleridir. Ras, hücre döngüsü ilerlemesini uyarıcı önemli bir proteindir. Proteinler, hücre döngüsündeki MAPK yolu ile G1'den S fazına geçişte rol oynayan CDK2 düzenleyicileri olan siklin E ve A'nın ifadesini kontrol eder. CDK2'nin düzenlenmesi, siklin E ve A'nın ekspresyon seviyelerinin yanı sıra p27Kip1 olarak adlandırılan bir inhibitörün mevcudiyeti ile düzenlenir [64].

2.2.2 Anti-Büyüme Sinyallerine Karşı Direnç

Normal hücreler, büyüme engelleyen sinyallere homeostasi sağlamak için cevap verirken, kanser hücreleri büyüme engelleyen sinyallere cevap vermez. Pozitif etki gösteren büyüme uyarıcı sinyalleri indüklemeye ve sürdürmeye özelliğinin yanı sıra, kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenleyen güçlü programları da oluşturması gerekir; bu programların çoğu, tümör baskılayıcı genlerin hareketlerine bağlıdır. Normal hücrelerin anormal proliferasyonu için sinyallere direnç göstermesi ve durdurulması önemli olduğu kadar, büyüme süpresörlerini sıkı bir şekilde düzenlemek de aynı derecede önemlidir [53, 70]. Hücre büyümesini ve çoğalmasını sınırlandırmak için birçok tümör baskılayıcı genler keşfedilmiştir. Bu genlerin birçoğu, farelerde kazanım ya da fonksiyon kaybı deneyleri yoluyla iyi huylu tümör baskılayıcıları olarak doğrulanmıştır. En iyi bilinen tümör baskılayıcıları, p53 ve retinoblastoma (Rb) proteindir. p53, birçok hücrel strese ve hasara yanıt olarak hücre döngüsü tutulmasını koordine eden bir transkripsiyon faktörüdür. p53 ve Rb proteini, fonksiyon kaybı birçok

kanserin gelişimiyle bağlantılı iki onko-supresif proteindir. Her ikisi de hem hücre döngüsünün hem de apoptozun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır [71].

2.2.3 Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz)

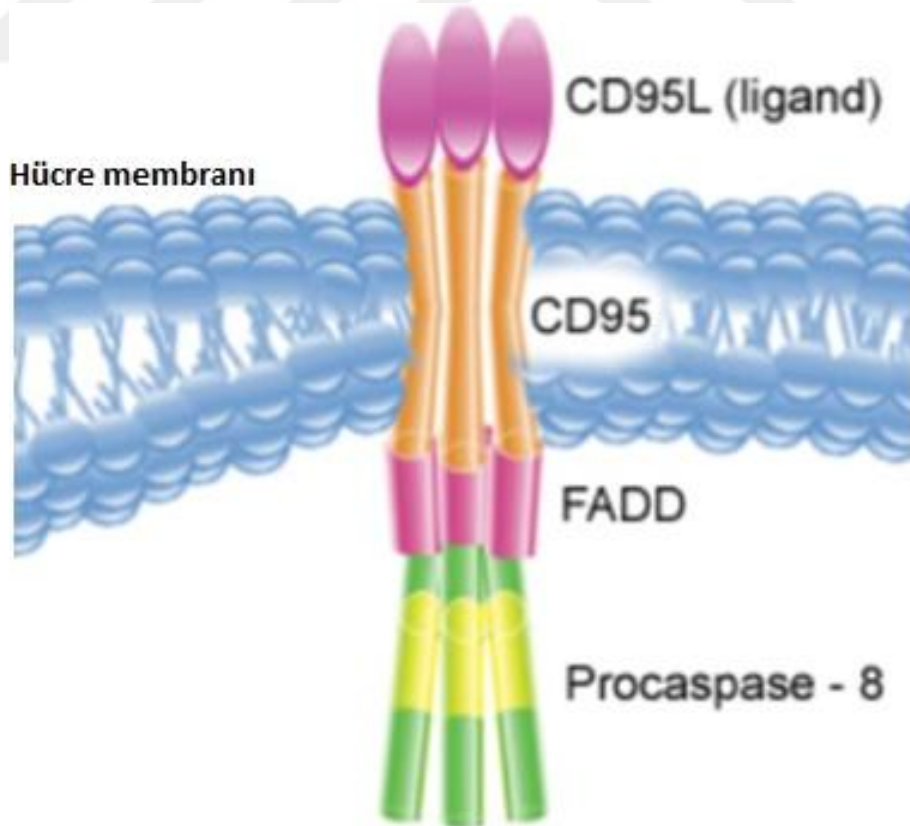
Apoptoz, Yunanca'da apo(=ayrı) ve ptozis(=düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından “fizyolojik hücre ölümü” ifadesi olarak tanımlanmıştır. Apoptotik hücre ölümü normal büyüme ve gelişimin bir parçasıdır. Örneğin, insan parmaklarının veya ayak parmaklarının şekillendirilmesi hücrelerin apoptozisinden kaynaklanmaktadır. Doku homeostazı, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasında bir dengedir, o dokudaki hücre sayısı nispeten sabittir. Bu denge bozulursa hücreler; daha hızlı bölünür, kanser gelişimine neden olabilmektedir [68].

Nöronlar gibi terminal olarak farklılaşmış hücrelerde, apoptoz indüksiyonu, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif koşullarda görüldüğü gibi ölümcül sonuçlara neden olabilir. Bu karmaşık doku homeostazının düzensizliği birçok kanser türünde ortaya çıkmıştır. Örneğin, belirli pankreas adenokarsinom tipleri, antiapoptotik yolların aktivasyonunu gösterir. Programlanmış hücre ölümü olan apoptozdan kaçınma, çoğu olmasa da kanser türlerinin en büyük belirleyici özelliği olarak ifade edilmektedir. Tümörlerin gelişimi, sadece aşırı hücre çoğalması olarak değil, aynı zamanda hücre ölümünde bir azalma olarak da görülebilir.

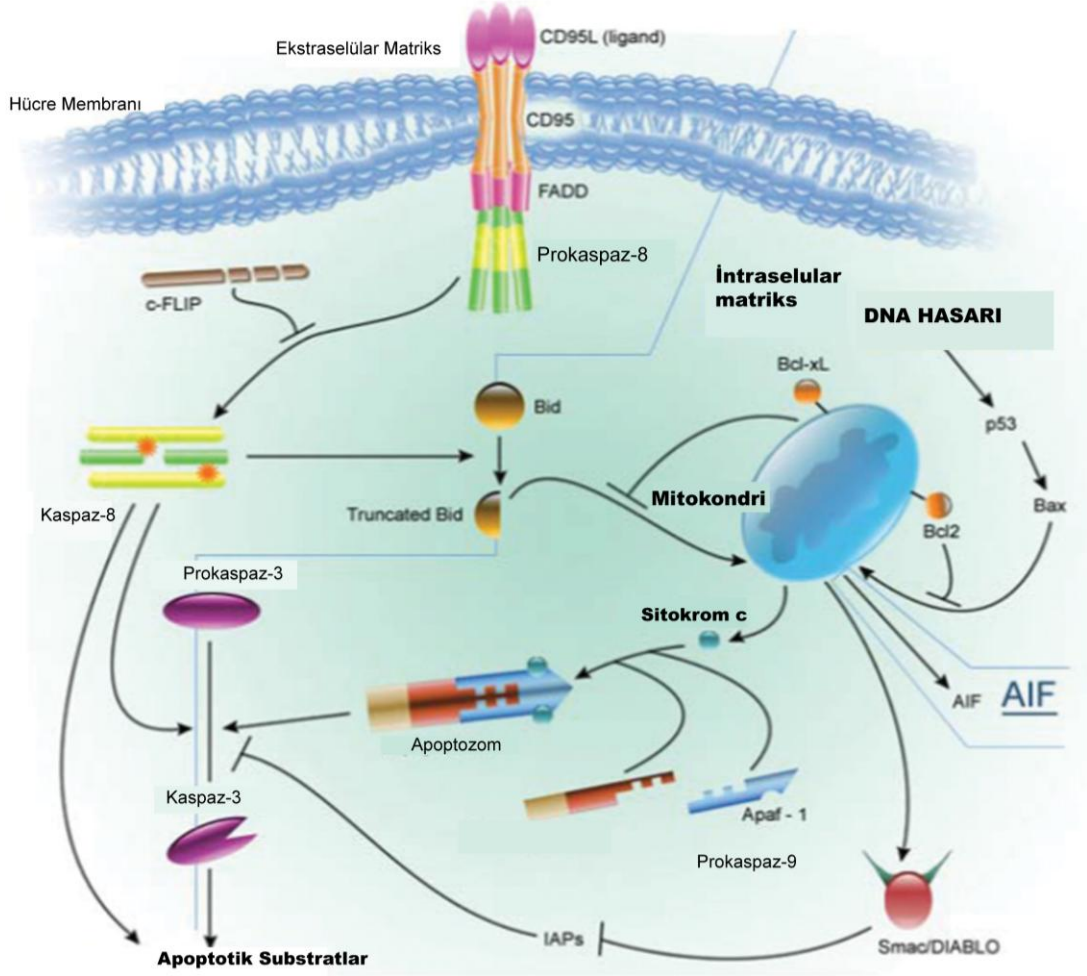
Programlı hücre ölümü olan apoptozun mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak; büyüme faktörleri, onkogenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Apoptozu etkileyen uyaranların bazıları şu şekilde sıralanabilir; büyüme faktörleri, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), TGF- β (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar vb. Bunlardan özellikle proto-onkogenlerin (c-myc gibi) çoğunun apoptozun regülasyonunda yer aldığı kanıtlanmıştır. Apoptozun indüksiyonu iki geniş kategoride basitleştirilebilir: A) Pozitif sinyallerin kaybı: Büyüme faktörleri gibi büyümeyi teşvik edici faktörlerin yoksunluğu apoptozu tetikleyebilir. Örneğin, erken gelişimde, sinir büyüme faktöründen yoksun olan nöronlar apoptoz nedeniyle ölürlür.

B] Negatif sinyallerle indüksiyon: Ölüm ligandları gibi bazı ligandların bağlanması hücre içi apoptotik sinyalleşmeyi tetikleyebilir. Alternatif olarak, hücre içi sinyallerde apoptozu aktive edebilir. Örneğin, apoptoz genellikle bir hücrenin onarılmasının ötesinde hasar gördüğünde, bir virüsle enfekte olduğunda veya besin, oksijen yoksunluğu gibi stresli koşullar geçirdiğinde ortaya çıkar. Bu hücre dışı veya hücre içi sinyaller apoptozu çok spesifik ve koordineli bir şekilde aktive eder.

Hücre dışı apoptotik sinyale tipik olarak ölüm veya sağkalım faktörlerini bağlayan hücre yüzeyi reseptörleri aracılık eder. Örneğin, bir endojen ligand (CD95L) hücre zarı üzerindeki CD95 reseptörlerine (Fas reseptörleri olarak da adlandırılır) bağlandığında ölüm sinyalleri aktive edilir. Diğer örnekler arasında Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α), TNF reseptörlerine bağlanır veya FAS ligandı, hücre zarı üzerindeki FAS reseptörlerine bağlanır. Hücre dışı matristen ve hücre-hücre yapışma proteinlerinden gelen sinyallerin kaybı da hücrelerde apoptozu uyarır. Apoptozu ortaya çıkaran hücre içi sinyaller, bir hücrenin aerobik güç merkezi olan mitokondri üzerinde birleşir. Bcl-2 familyasının üyeleri gibi sitozolik proteinler, bazı apoptotik efektör proteinlerin sitozol içine salınmasına izin vererek mitokondriyi hedefler [68].



Şekil 2.6 Hücre dışından gelen apoptotik sinyalin hücre membranı ile etkileşimi [68]



Şekil 2.7 Hücre içi ve hücre dışı kaynaklı apoptotik yollar [68]

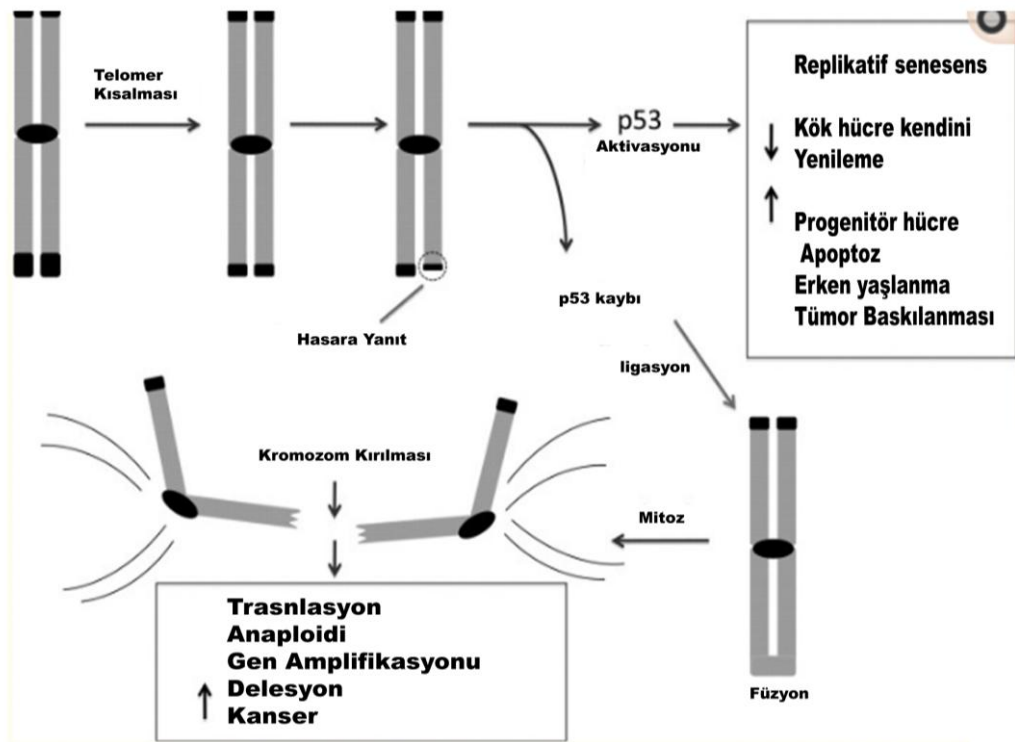
Hücre dışından gelen sinyaller, ligandın (örneğin CD95L) reseptörüne (CD95) bağlanmasıyla tetiklenir. Reseptörün bu aktivasyonu, sırayla DED'yi (DED - Ölüm Efektör Bölgesi) aktive eden FADD'nin (FADD - Fas ilişkili ölüm domaini) aktivasyonuna yol açar. DED aktivasyonu, doğrudan veya efektör kaspazlar (kaspaz-3) ile apoptoza yol açan başlatıcı kaspaz 8 yoluyla apoptozu başlatır. Aktif kaspaz-8, SMAC/DIABLO'nun salınması için mitokondriye translokasyon yapan BID'yi tBID'ye ayırır. SMAC / DIABLO, kaspaz 3 yoluyla apoptotik indüksiyonla sonuçlanan IAP'leri (IAP - apoptoz inhibitörü) serbest bırakır. Hücre içi apoptotik yolak, mitokondride çeşitli uyarılarla başlatılır. a) p53 proteinlerinden gelen DNA hasarı, apoptozun BCL2 tarafından baskılanmasını gidererek, zar geçirgenliğine ve sitokrom c (Cyto c), SMAC/DIABLO, AIF (apoptosis-indükleyici faktör) salınımına neden olur. b) Sitokrom c, kaspaz 9'u aktive etmek için APAF1 (APAF-1 - apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) ile etkileşime girerek, diğer kaspazların aktive edilmesiyle apoptozu oluşturur. AIF, DNA degradesyonuna neden olur [68].

Bu proteinler, IAP'lere (apoptoz proteinlerinin inhibitörü) bağlanan ve bunları devre dışı bırakan, dolayısıyla apoptozun ilerlemesine izin veren SMAC'leri (ikinci mitokondri türevli kaspazların aktivatörü) içerir. Bir başka önemli protein, dış mitokondriyal zardan MAC (Mitokondriyal Apoptoz-indükleyen Kanal) adı verilen bir kanaldan salınan sitokrom c'dir. Sitosolde, sitokrom c Apaf-1 ve ATP ile bağlanır, bu da apoptozom olarak bilinen bir protein kompleksi oluşturmak için pro-kaspaz-9'a bağlanır. Apoptozomun oluşumu, apoptozun nihai geri dönüşümsüz aşamasıdır, burada kaspaz-9 kaspaz-3'ün uygulayıcılarını aktive eder [68]. Çoğu durumda, antikanser tedavileri sonucunda yaygın ölüm etkisi bir sistein proteazı ailesi olan kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspazlar, aktif olmayan proformlar olarak sentezlenir ve aktivasyon üzerine aspartat kalıntılarının yanına ayrılırlar. Kaspazların birbirini aynı sekanslarda bölünerek harekete geçirebilmesi gerçeği, kaspaz aktivitesinin bir proteaz kaskadı vasıtasıyla amplifiye edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Kaspazlar, sitoplazmada veya nukleusda, apoptotik hücre ölümünün morfolojik özelliklerinin çoğuna yol açan çok sayıda farklı substratı parçalamaktadır. Örneğin, polinükleozomal DNA fragmentasyonuna, DNA'yı bağlayan endonükleaz CAD (kaspazla aktive olan DNaz inhibitörü), ICAD'ın (kaspazla aktive olan DNaz inhibitörü) bölünmesi aracılık eder [72]. Transgenik modelleri kullanan birçok çalışma apoptotik yolağın değişen bileşenlerinin tümör ilerlemesinin dinamiklerini çarpıcı şekilde etkileyebileceğini açıkça göstermektedir. Bu makinenin, etkisizleştirilmesinin tümör gelişimi sırasında kilit bir faktör olduğu düşünülmektedir.

Kanser hücreleri, apoptozu birçok yönden atlayabilir. En yaygın yöntem, proapoptotik düzenleyicilerin kaybına neden olan p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonlarını içerir. Tüm insan kanserlerinin yarısından fazlası (karsinomların %80'inden fazlası), p53 proteininin inaktivasyonunu gösterir. p53 ayrıca, strese cevap olarak hücre döngüsünde ki önemli rolü nedeniyle "hücrenin koruyucusu" olarak da bilinir. p53'ün asıl rolü bir DNA hasar sensörüdür ve DNA hasarına tepki olarak DNA onarım yollarını veya apoptozu aktive eder. p53 proteininin herhangi bir fonksiyon kaybı, apoptozun bozulmasına neden olur.

2.2.4 Sınırsız Replikasyon Potansiyeli

Kanser hücrelerinde telomerlerin uzunluğu korunur. Telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur. Telomerler, DNA'nın heksanükleotit sekanslarıdır (6 baz çiftinin kısa tekrarları) ve lineer bir kromozomun her bir ucu, bu tekrarların binlerce kopyasını içermektedir. Örneğin, insanlarda tekrar dizisi TTAGGG'dir. Bu diziler protein kodlamamaktadır. Bununla birlikte, uçtaki füzyonu önleyerek lineer kromozomların korunmasında hayati bir rol oynarlar ve ayrıca DNA'yı nükleazlar tarafından bozulmaya karşı korurlar. Hücre bölünmesi sırasında DNA, hücre döngüsünün S fazı sırasında replike olmaktadır. Bununla birlikte, her DNA replikasyonu turundan sonra, her kromozomun uçlarından telomerin kısa bir sekansı (50-100 baz çifti) kaybolur. Bu kısalma, DNA sentezinden sorumlu olan enzimin, DNA polimerazının, DNA dizisinin bir ucundaki (3'uçlar) 50-100 baz çiftini kopyalayamamasıdır. Sonuç olarak, her DNA replikasyonu turu, bu dizilerin bozulmasına ve daha kısa kromozomlara yol açar. Her kromozomun sınırlı sayıda bu telomer tekrarları olduğu için, art arda replikasyon döngüleri, genetik değişikliklere ve hücre ölümüne kadar telomerlerin sürekli aşınmasına neden olur. Bu nedenle, her normal hücre, telomer uzunluğu ile belirlenen sınırlı bir ömre sahiptir [73].



Şekil 2.8 Telomer kısalması ve p53 aktivasyonu [73]

Kanser hücreleri telomer uzunluklarını, DNA baz çiftlerinde herhangi bir kayıp olmadan sürdürmektedir. Kanser hücrelerinin telomer uzunluklarını korumak için kullandıkları ana strateji telomeraz adı verilen bir enzimi aktive etmektir. Kanserlerin hemen hemen %85-90'ında aktif bir telomeraz vardır. Telomerazlar kodlama yapmayan heksanükleotit, telomerik DNA'nın uçlarına tekrarlar, böylece gerekli uzunlukları kritik eşiğin üstünde tutar ve sınırsız çoğaltma kapasitesine izin verir. Kanser hücrelerinin aksine, aktif olarak normal hücrelerin bölünmesi, son derece düşük veya saptanamayan bir telomeraz seviyesine sahiptir. Telomeraz bu hücrelere *in vitro* enjekte edilirse, sınırsız bir şekilde bölünmeye devam eden hücrelere dönüştürülür [74].

2.2.5 Anjiyogenezi indükleme

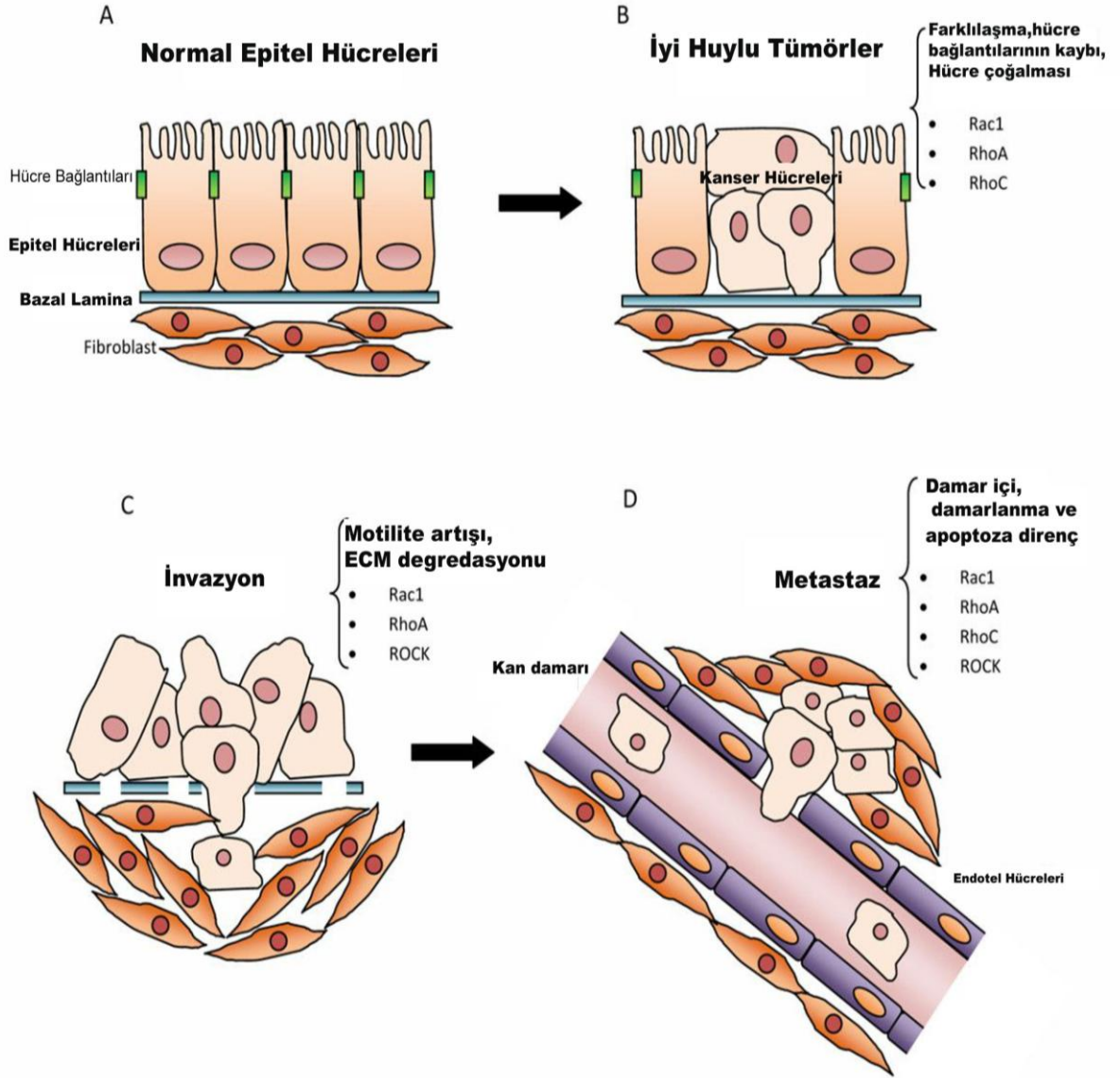
Embriyogenez sırasında; vasküler yapı gelişimi, yeni endotel hücrelerinin oluşumu ve bunların mevcut damarlardan filizlenmelerini (anjiyogenez) içerir. Bu morfogenezin ardından normal damarlanma büyük ölçüde sessizleşir. Yetişkinlerde, yara iyileşmesi ve kadın üreme döngüsü gibi fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak, anjiyogenez geçici olarak mevcuttur. Buna karşılık, tümörün ilerlemesi sırasında, bir "anjiyojenik anahtar", hemen hemen her zaman aktive olur ve sürekli hale gelebilir, bu da normal olarak sakin damarların sürekli genişleyen neoplastik büyümelerin sürdürülmesine yardımcı olan yeni damarların filizlenmesini sağlar. Normal hücreler oksijen ve besin sağlamak için kan damarlarına bağımlıdır. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, yeni kan damarlarının oluşması tümör sağkalımı ve yayılması için gereklidir [75].

Anjiyogenik uyarıcılar ve engelleyiciler arasında bulunan dengedeki değişim anjiyogenik değişimi aktive eder. Anjiyojenik anahtarın, anjiyogenezi indükleyen veya baskılayan faktörlerin olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir. Bu anjiyojenik düzenleyicilerin bazılarının vasküler endotel hücreler tarafından indükleyici veya inhibe edici hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan proteinlerin olduğu gösterilmektedir. Anjiyogenez indükleyicileri ve inhibitörlerinin iyi bilinen prototipleri, vasküler endotel büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve trombospondin-1'dir (TSP-1). VEGF-A geni, embriyonik ve postnatal gelişim sırasında ve daha sonra endotel hücrelerinin homeostatik hayatta kalmasının yanı sıra yetişkinlerde fizyolojik ve patolojik durumlarda, yeni kan damarı büyümesini düzenleyen ligandları kodlar [76].

2.2.6 İnvazyon ve metastaz

Kanser hücrelerinin vücudun diğer yerlerine gitmesi kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Kanserden ölümlerin %90'ından ise metastaz gelişimi sorumludur. Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Bu durum; anjiojenez, invazyon, migrasyon-motilite ve proliferasyon gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi kompleks olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir. İlk olarak, tümör hücreleri yeni damar oluşumunu uyarırlar ve sonra komşu hücrelerle olan bağlarını kopararak primer tümör dokusundan ayrılırlar. Tümör hücreleri daha sonra hücre dışı matrikse geçerek burada ilerlerler ve çevre dokulara ulaşırlar ya da dolaşım sistemine geçip uzak dokuları işgal ederler. Bu sayede yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürürler. Metastazın önemli bir basamağı olan tümör invazyonu kompleks ve dinamik bir olaydır. Tümör hücre invazyonu, her bir aşamasında farklı moleküllerin görev aldığı çeşitli alt basamaklardan oluşur. İlk aşama kanser hücresinin primer tümörden ayrılmasıdır. Bu basamak hücre adezyon moleküllerinden E-Cadherin'le ilgilidir [38].

Rho GTPazlar, hücre hücre iskeleti organizasyonu, göç, transkripsiyon ve proliferasyonda rol oynayan küçük GTP bağlayıcı protein ailesini temsil eder. Rho GTPazlar, aktif olmayan, GDP'ye bağlı bir formda veya aktif bir GTP'ye bağlı biçimde mevcut olan hassas moleküler anahtarlar olarak çalışmaktadır. Bunlar esas olarak hücre iskeleti düzenlemeleri ve hücre hareketliliği ile ilgilidir [77]. Aynı zamanda hücre çoğalması, transformasyonu ve farklılaşması ile ilgili GTP hidrolitik aktivitesine sahiptirler. GDP'nin GTP'ye değişimi ve böylece Rho GTPaz'ların aktivasyonu, çok sayıda büyüme faktörü reseptörünün, integrinin, sitokin reseptörünün ve kaderinlerin down regülasyonu guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF'ler) tarafından katalize edilir. Rho GTPaz'lar, farklı GEF'ler tarafından aktive edilebildiklerinden, farklı hücre dışı sinyallerden anahtar birleştiren moleküllerdir [78].



Şekil 2.9 Tümör ilerlemesinin farklı aşamalarında Rho proteinlerinin dahil edilmesi [79]

A) Normal epitel hücre polaritesinin korunması. B) İyi huylu tümörler: Bir tümör başlatıldıktan sonra Rho proteinleri, farklılaşma, büyüme ve hücre polaritesi kaybını uyarak tümör gelişimine katkıda bulunabilir. C) Lokal olarak invaziv tümörler: Rho proteinleri, hücre hücre ve hücre matrisi yapışmasını değiştirerek tümör gelişimine katkıda bulunabilir, Rho proteinleri, tümör hücrelerinin invaziv olmasına izin verir. D) Uzak bölgeye metastaz: Tümör hücrelerinin endotel hücre katmanlarını geçmesi için Rho ve ROCK gerekir. RhoC, anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunu teşvik ederek, tümörün vaskülerizasyonunda bir artışa yol açar [79].

2.2.7 Enerji metabolizmasının yeniden programlanması

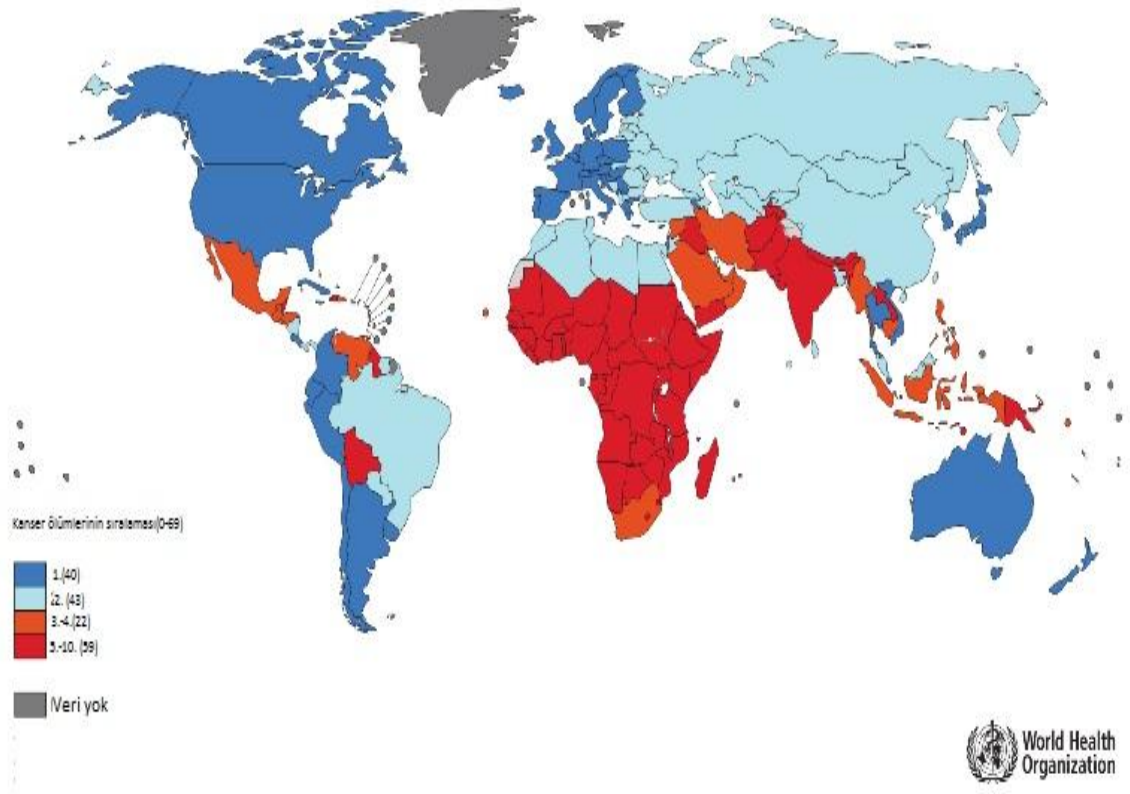
Aerobik koşullarda, normal hücreler glikozu işlemiden geçirir, önce sitozolde glikoliz yoluyla piruvata dönüştürülür ve mitokondride karbondioksite kadar indirgenir. Anaerobik koşullar altında glikoliz tercih edilir ve nispeten az miktarda piruvat oksijen tüketen mitokondriya gönderilir. Oksijen varlığında bile, kanser hücreleri, enerji metabolizmasını büyük ölçüde sınırlandırarak, glikoz metabolizmasını ve dolayısıyla enerji üretimini yeniden programlayabilirler [53].

2.2.8 İmmün sistemden kaçma

Birçok kanserde, malign ilerlemeye, etkili bir antitümör tepkisi ve tümör eliminasyonuna müdahale eden derin immün baskılanması eşlik eder. İlk olarak, bağışıklık gözetiminden kaçmanın çoğu, tümör hücrelerinde meydana gelen değişikliklere (tümör antijenlerinin kaybı, insan lökosit antijen moleküllerinin kaybı vb.) olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, bastırmanın, tümörlerin normal immün düzenlemeyi kendi avantajlarına çevirme kabiliyetinden geldiği açıkça anlaşılmıştır. Tümör mikro ortamı, tümör antijenine özgü yardımcı ve sitotoksik T hücrelerinin genişlemesini önleyebilir, bunun yerine proinflamatuvar sitokinlerin ve diğer faktörlerin üretimini teşvik ederek bağışıklık sistemini inhibe eden bastırıcı hücre popülasyonlarının birikmesine neden olabilir. Son 30 yılda immüno onkoloji alanındaki büyük kavramsal ve teknik gelişmeler kanser tedavisi için yeni immünoterapötik yaklaşımlar geliştirme bilgi ve tekniklerini sağlamıştır. Bunlar, tümör mikro ortamındaki inhibe edici yolları ve inhibe edici hücreleri bloke ederek tümör immünitesini artıran metotları içerir (örn., Sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen-4, programlanmış ölüm 1 veya ligand programlı ölüm ligand 1 veya düşük doz kemoterapisine karşı antikörler). Organizma, tümör hücrelerini oldukça anormal hücreler olarak algılar ve immün yanıtları ve eliminasyonu aktive eder. Tümör hücreleri, immün hücrelerin tanınmasını ve imha edilmesini önlemek için inanılmaz bir mekanizma geliştirmiştir. Tümörlerde iyi bilinen bir immün kaçınma mekanizması olan olağandışı HLA moleküllerinin tümör hücrelerinin yüzeylerinde ki ifadesidir (örneğin immüno-uyumlu hücreleri inhibe eden HLA-G). HLA-G normal dokularda eksprese edilmez ve çeşitli tümör tiplerinde yüksek oranda eksprese edilir [80].

2.3 Epidemiyolojisi

Günümüzde bulaşıcı olmayan hastalıklar küresel ölümlerin birçoğundan sorumludur. 21. yüzyılda kanser, dünyanın her ülkesinde yaşam beklentisini artıran en önemli engel ve ölümün önde gelen nedeni olarak yer alması beklenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2015'teki tahminlerine göre, kanser 172 ülkenin 91'inde, 70 yaşından önce ölümlerin önde gelen nedenidir ve 22 ülkede üçüncü sırada yer almaktadır [81].



Şekil 2. 10 Küresel Harita 2015 Yılı 70'in Altında Ölüm Nedeni Olarak Kanser [81]

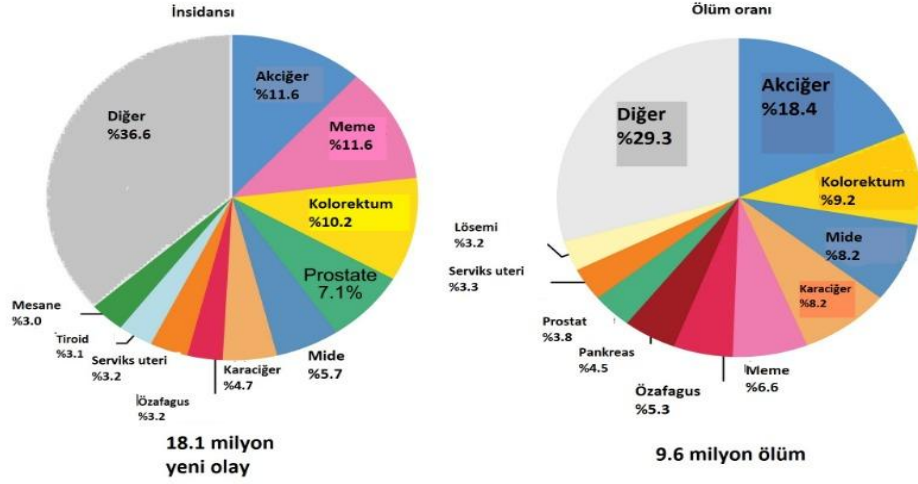
2.4 İnsidansı

Dünya çapında 20 kanser türü ile ilgili coğrafi etkenlere bağlı olarak Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından incelenen kanserin, insidansı ve mortalitesi hakkındaki veriler üzerine GLOBOCAN 2018 raporu hazırlanmıştır. 2018'de 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.6 milyon kanser ölümü (melanom dışı cilt kanseri hariç 9.5 milyon) olacağı tahmin edilmektedir. Her iki cinsiyette de akciğer kanseri en sık görülen kanserdir (%11,6). Toplam vakaların ve kanser ölümünün önde gelen nedeni, kadın meme kanseri (%11.6), prostat kanseri (%7.1) ve kolorektal kanser (%6,1); insidans ve mortalite için kolorektal kanser (%9.2), mide kanseri (%8.2) ve karaciğer kanseri (%8.2) takip etmektedir. Akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen kanser ve kanser ölümünün önde gelen nedenidir, bunu takiben prostat, kolorektal kanseri, karaciğer ve mide kanseri (mortalite için) takip etmektedir. Kadınlarda, ise meme kanseri en sık rastlanan kanser olup, kanser ölümünün önde gelen nedenidir, bunu kolorektal ve akciğer kanseri (insidans) takip etmektedir. Serviks kanseri hem insidans hem de mortalite için dördüncü sırada yer almaktadır. En sık teşhis edilen kanser ve kanser ölümünün önde gelen nedeni, ekonomik gelişme derecesine, sosyal ve yaşam şekli faktörlerine bağlı olarak, ülkeler arasında ve her ülkede büyük ölçüde değişiklik göstermektedir [81, 82].

Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artış göstermektedir. Dünya genelinde hızlı nüfus artışı ve yaşlanma ile kanserin önde gelen ölüm nedeni olarak, birçok ülkede öne çıkması kansere göre; inme ve koroner kalp hastalığının mortalite oranlarında belirgin düşüşlerini kısmen yansıtmaktadır [81].

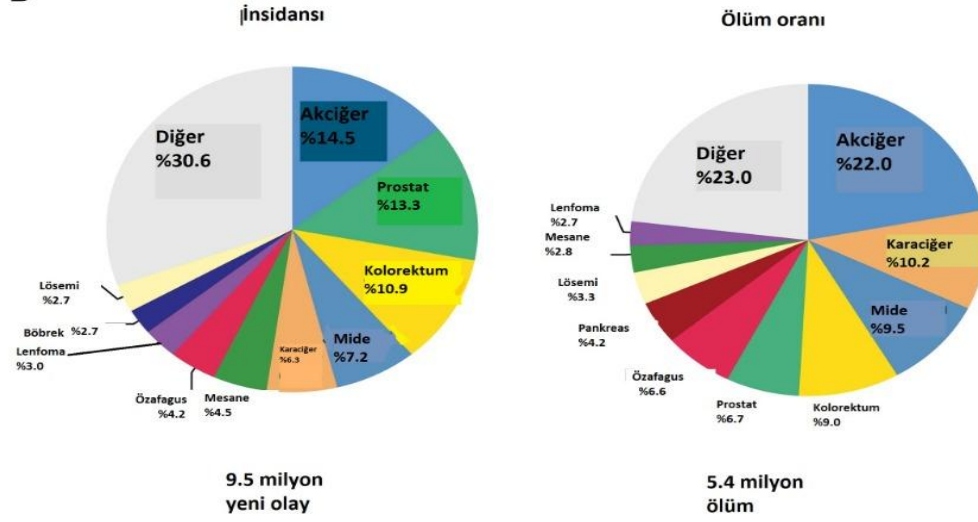
A

HER İKİ CİNSİYET İÇİN



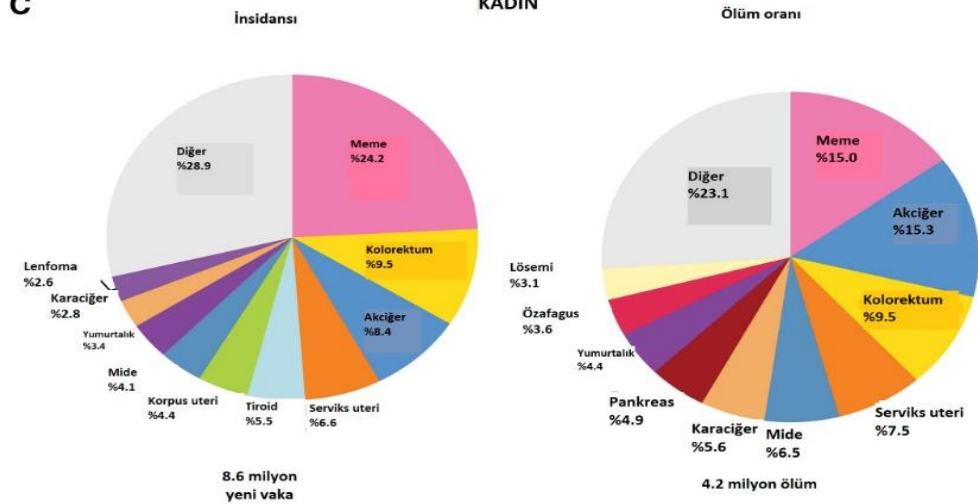
B

ERKEK



C

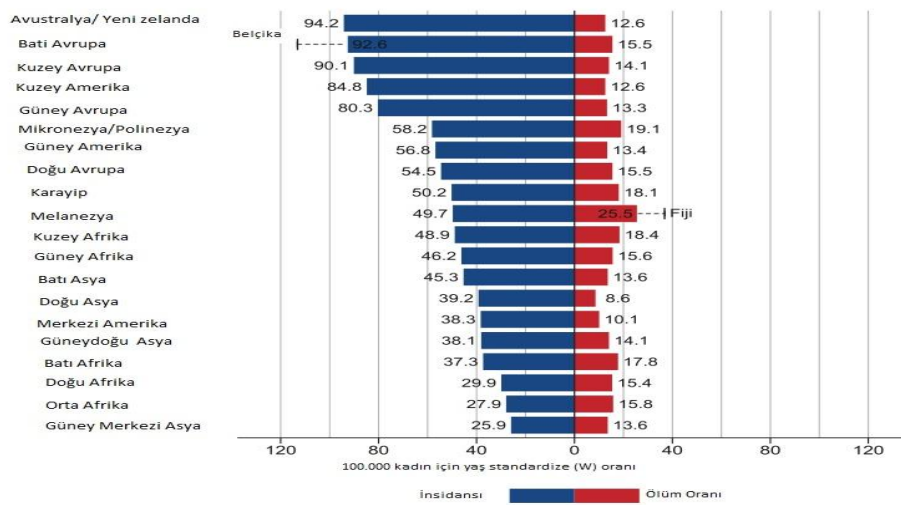
KADIN



Şekil. 2.11 Grafik Tabloları 2018'de (A) Her İki Cinsiyet, (B) Erkek ve (C) Kadın için en sık görülen 10 kanser için vaka ve ölüm dağılımlarını göstermektedir [81]

2.5 Meme Kanseri

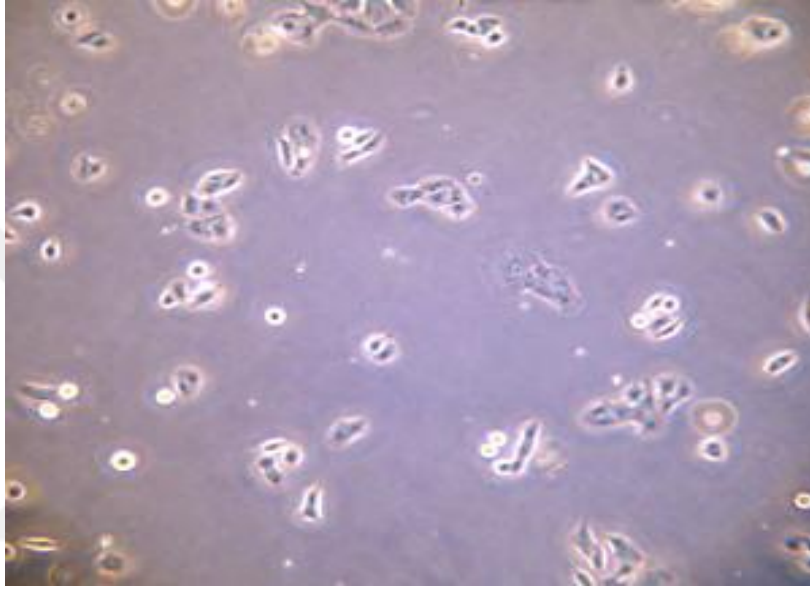
Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri en sık görülen kanserdir. Asya ve Batı ülkelerinde en sık görülen kanser türü ve ikinci en yaygın kanser ölüm nedenidir [83]. Genellikle bir hastalık olarak adlandırılır, ancak birçok meme kanseri türü vardır. Meme kanserleri, invaziv olmayan (*in situ* karsinomlar) ve invaziv (infiltrasyon) olmak üzere 2 ana tipe ayrılabilir [84]. Birinci tip, hem duktal hem de lobüler epitelde ortaya çıkabilir, ancak altta yatan bazal membrana etki etmeden gelişmektedir. İkinci tip kanallarda veya lobüllerde başlayabilir, ancak daha sonra çevre göğüs dokusuna yayılmaktadır. Dünya çapında, 2018'de teşhis edilen kadın meme kanseri vakaları yaklaşık 2.1 milyon olarak tahmin edilmektedir ve bu oran kadınlarda 4'te 1'inde kanser vakasının gerçekleşeceği ön görülmektedir. Hastalık, ülkelerin büyük bir çoğunluğunda en sık teşhis edilen kanserdir ve aynı zamanda 100'den fazla ülkede kanser ölümünün önde gelen nedenlerinden biridir. Bazı istisna ülkeler mevcuttur; Avustralya / Yeni Zelanda, Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika (akciğer kanserinden önce gelir) ve Sahra altı Afrika'daki birçok ülke (yüksek rahim ağzı kanseri oranları nedeniyle). Meme kanseri insidans oranları Avustralya / Yeni Zelanda, Kuzey Avrupa (örneğin, İngiltere, İsveç, Finlandiya ve Danimarka), Batı Avrupa (Belçika [en yüksek küresel oranlara sahip], Hollanda ve Fransa), Güney Avrupa'da en yüksektir (İtalya) ve Kuzey Amerika. Mortalite açısından, meme kanseri oranları daha az değişkenlik göstermektedir; bu oran Fiji'nin dünya çapında en yüksek ölüm oranlarına sahip olduğu Melanezya'da tahmin edilen en yüksek ölüm oranına sahiptir [81].



Şekil 2.12 2018'de kadın meme kanserleri için bölgeye özgü görülme ve mortalite yaş-standardlaştırılmış oranların çubuk grafiği [81]

2.6 A549

A549 akciğer kanseri hücre hattı 58 yaşındaki Kafkas kökenli bir erkeğin akciğer epitel hücrelerinden kültüre edilmiştir. Adenokarsinomik alveolar bazal epitel hücreleri normal bir akciğerdeki hücre tipi; yassıdır, suyun, elektrolitlerin ve diğer maddelerin alveollerin yüzeyi boyunca yayılması görevini gerçekleştirir. p53 hotspot mutasyonlarını içeren bir hücre hattı olduğu için küçük hücreli olmayan akciğer kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

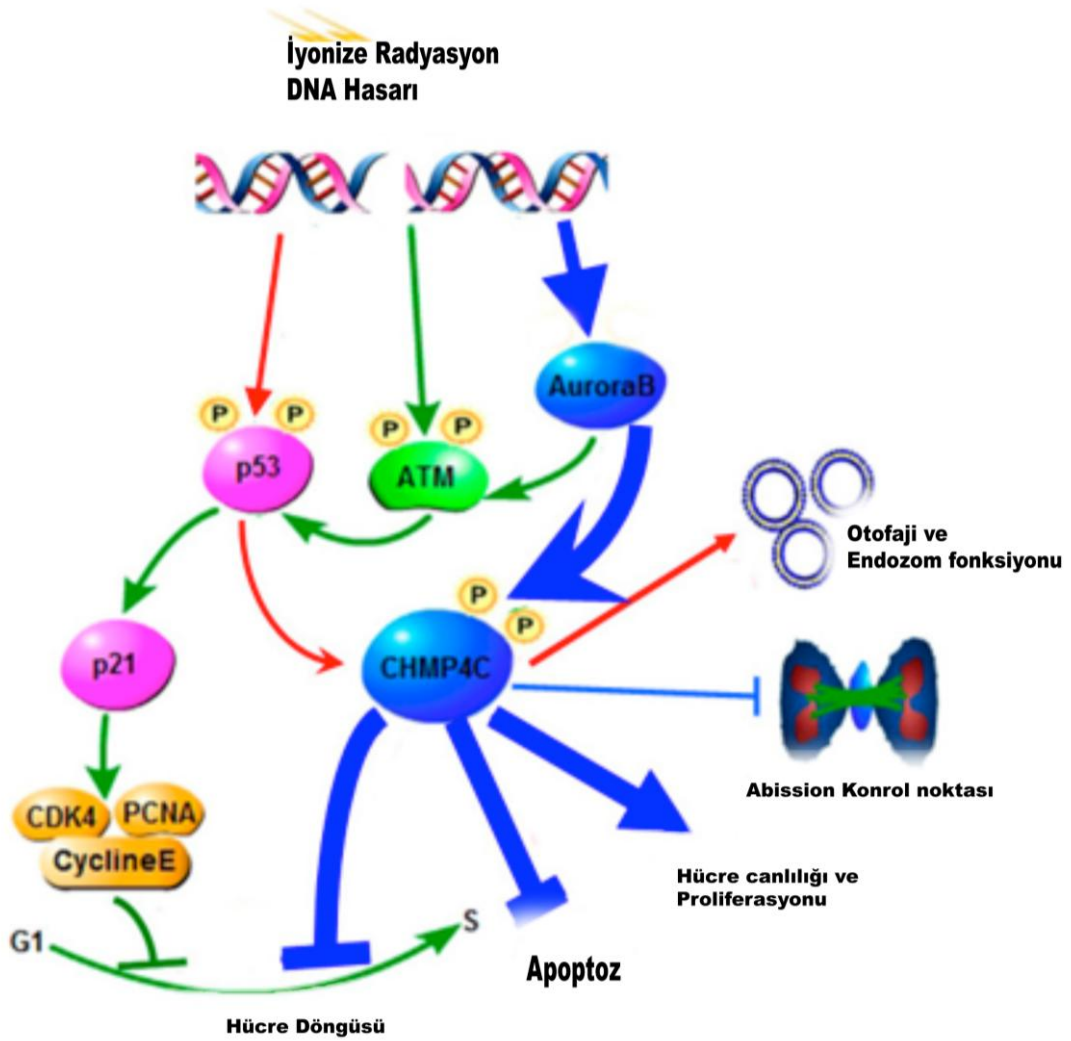


Şekil 2.13 A549 akciğer kanseri hücre hattı mikroskop görüntüsü [85]

İnsan akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olarak sınıflandırılan insan tümörleri arasında yüksek derecede invaziv ve en kötü huylu olandır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve mevcut terapötik strateji, radyasyon ve/veya kemo-tedaviyle birlikte cerrahiyi içerir. Radyasyon direnci, akciğer kanseri radyoterapisinin ciddi sonucudur ve radyo-terapötik etki için kritik bir engel teşkil eder. Bu nedenle, radyasyon direncinden nasıl kaçınılacağı ve tedavi etkinliğini nasıl arttıracacağı büyük bir zorluktur. İyonize radyasyon DNA hasarını başlatır ve hücresel genomik kararsızlığa ve genetik bilgi birikimine yol açan hücre siklusu ilerlemesini durdurur. Li ve arkadaşlarının 2016'da yaptığı çalışmada A549 akciğer kanseri hücre hattını kullanarak; DNA hasar stresine cevap olarak, ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış kinaz (ATM) ve Rad3 ile ilişkili protein (ATR) aktive edilip AT ve ATR, hücre döngüsü ve siklin bağımlı kinazlar (Cdks) aktive ederek hücre bölünmesi kontrolünde yer aldıklarını

belirlemişlerdir. Hücre bölünmesinde, CHMP4C tarafından düzenlenen çok önemli bir sitokinetik abscission kontrol noktasının bulunduğunu, bu durumun DNA hasarının birikmesini önlediğini tespit etmişlerdir. CHMP4C abscission zamanlamasını Aurora B'nin fosforillenmesi ile kontrol edilmektedir.

Radyasyona bağlı Aurora B ekspresyonu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde CHMP4C fosforilasyonunu arttırarak, hücre döngüsü kontrol noktası ve hücrel canlılığın yanı sıra apoptoza direnç sağladığını belirtmişlerdir [86].



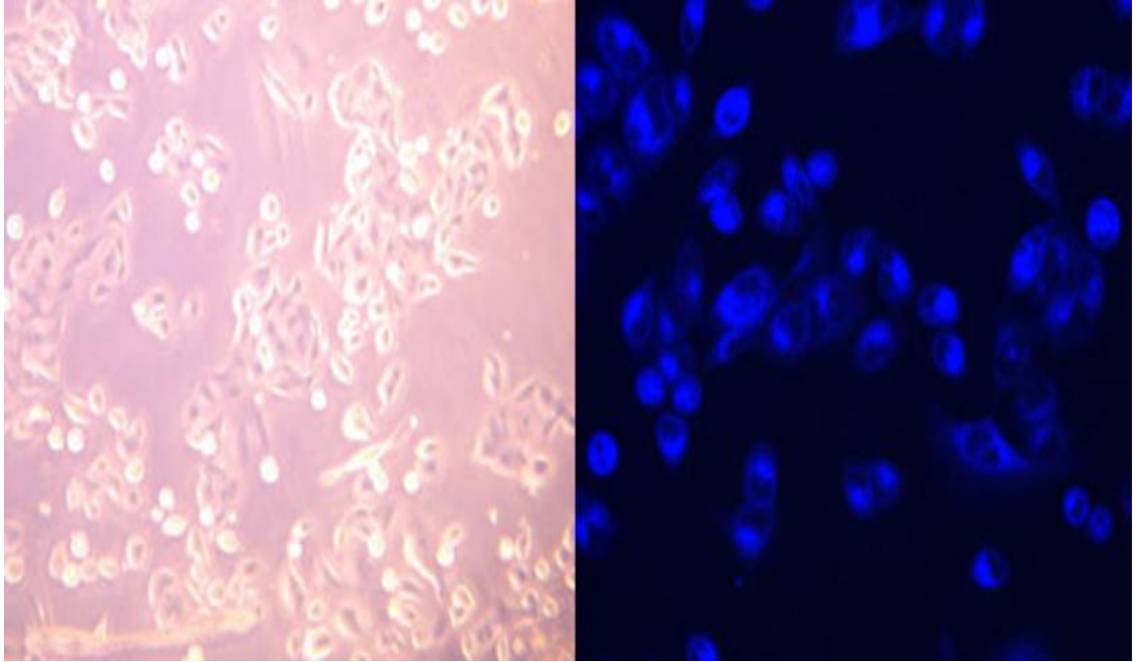
Şekil 2.14 CHMP4C sinyallemesinin strese karşı cevabı [87]

CHMP4C, abscission zamanlama kontrol noktasını ve hücre döngüsü ilerlemesini düzenlemek, hücrenin hayatta kalmasını ve hücre canlılığını arttırmak ve apoptoza (Mavi oklar) karşı koymak için Aurora B tarafından fosforile edilir. Ataksi telanjiektazi mutasyonlu kinaz (ATM), mitozda Aurora B'ye bağlı şekilde aktive edilir (Yeşil oklar).

p53, otofajiyi ve endozom üretimini (Kırmızı oklar) geliştirmek için CHMP4C'yi transkripsiyonel olarak düzenler. p21, p53'ün hedef genidir ve G1 ila S kontrol noktasında işlev görür (Yeşil oklar) [87].

2.7 HepG2

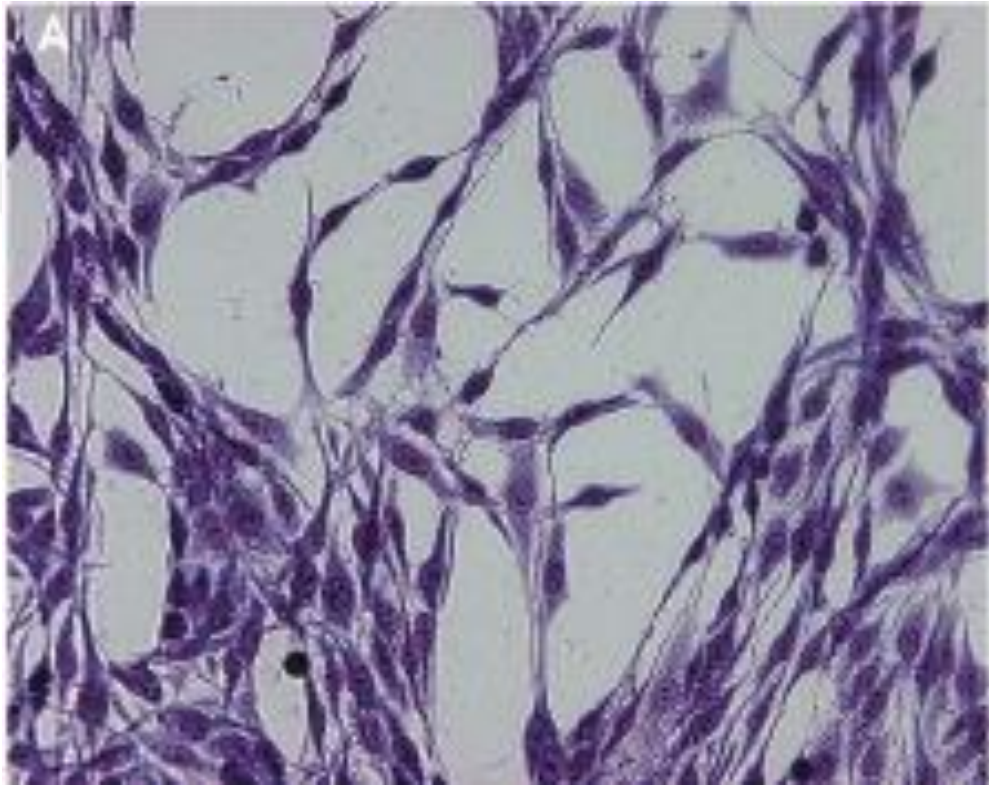
HepG2, bir hepatoselüler karsinoması olan 15 yaşında bir Kafkas erkeğinin karaciğer dokusundan türetilmiş insan karaciğer karsinomu hücrelerinden oluşan bir hücre hattıdır. Hepatoselüler karsinom, dünya çapında en yaygın beşinci kanserdir. HepG2 hücrelerinin morfolojisi epiteldir. HepG2 hücreleri büyük ölçüde başarıyla büyütülebilir ve transferrin, fibrinojen, plazminojen ve albümin gibi birçok plazma proteinini salgılar. İnsan büyüme hormonu ile uyarılabilirler. HepG2 hücreleri, tek tabaka halinde ve küçük topaklarda büyüyen, yapışık, epitel benzeri hücrelerdir.



Şekil 2.15 HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü [88]

2.8 C6

N-nitrosometilüre enjeksiyonları ile indüklenen sıçan glial tümörleri kültüre alınarak çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen birkaç hücre suşu arasında bir klon, omurgalıların beyne özgü olan S-100 proteinini içermektedir. Sabit faz kültürleri, üssel olarak büyüyen hücrelere göre hücre başına yaklaşık on kat daha fazla S-100 proteini içerir. Yenidoğan farelere enjekte edildiğinde, S-100 üreten hücreler, S-100 proteini içeren bir glial tümör olarak büyütülmektedir [89].



Şekil 2.16 C6 glioma kanser hücrelerinin mikroskop görüntüsü [90]

2.9 *Curcuma longa* Linn

Curcuma longa Linn, Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olup Hindistan, Güneydoğu Asya ve özellikle tropikal ülkelerde doğal olarak yetişir. *Curcuma longa* Linn ve *Curcuma* cinsinin diğer bazı türleri; Hindistan, Endonezya, Hint Halk Cumhuriyeti, Asya ülkeleri, Hawaii, bazı Pasifik Adaları da dahil olmak üzere Güney Asya ormanlarında yabani olarak yetişmektedir.

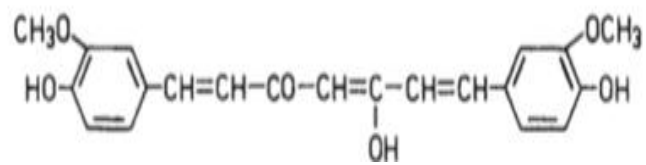
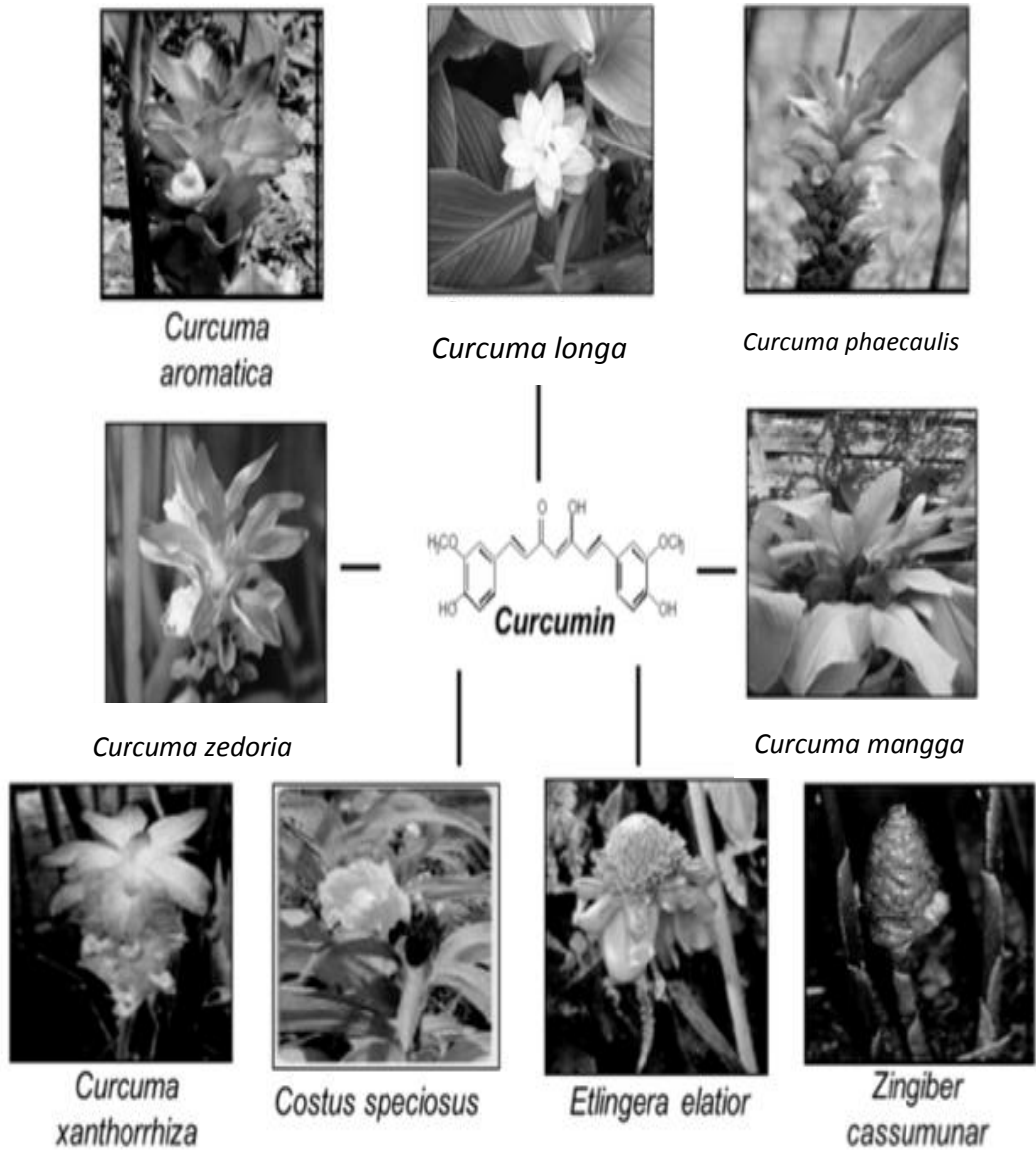
Curcuma longa Linn, kısa boylu, uzunluğu yaklaşık 100 cm yüksekliğe ulaşan uzun ömürlü bir bitkidir. Kavisli yaprakları ve dikdörtgen, oval veya silindirik rizomlara sahip bir bitkidir [17]. *Curcuma longa* Linn eski tıbbi metinlerde ve geleneksel Çin tıbbında çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve iyileştirilmesi için faydalı olduğu belirtilmektedir [11].



Şekil. 2.17 *Curcuma longa* Linn bitkisi [91]

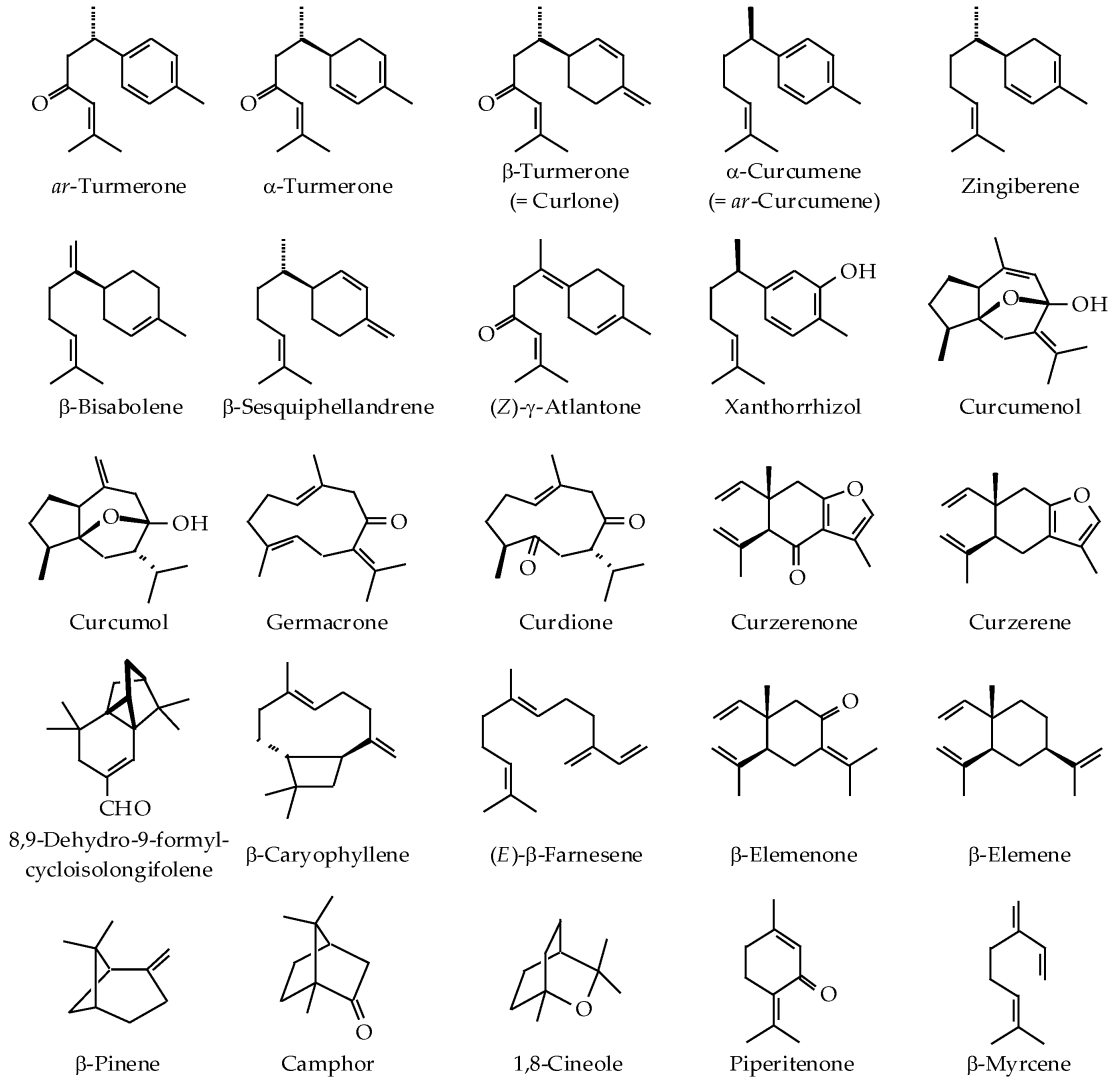
Curcuma longa Linn üzerine yapılan çalışmalar 19.yy itibariyle başlamıştır ve çalışmalar sonucunda *Curcuma longa* Linn’ den elde edilen “Curcumin” bileşeninin antiinflamatuvar [12], antioksidan [13], tümörigenez inhibisyonu [14], proapoptotik ve antianjiyojenik [15] gibi birçok özellikleri belirlenmiştir [16]. Curcumin ilk kez 1815’de Vogel ve Pelletier tarafından saf olmayan biçimde ekstrakte edilmiştir, 1870’de Daube tarafından saf ve kristal forma getirilerek [17], Roughley ve Whitting tarafından da 1973’te kimyasal yapısı belirlenmiştir.

Curcumin'in ilk farmakolojik incelemesi 1815'de Vogel ve Pelletier tarafından yayınlanmıştır. İnsan hastalıklarında curcumin kullanımına atıfta bulunan ilk makale 1937'de Oppenheimer tarafından yayınlanarak safra yolları hastalıklarında curcumin etkisini araştırmışlardır [18]. Curcumin, eski Asya tıbbında kullanılan bir hidrofobik fenol olup *Curcuma longa* Linn'den köklerinden izole edilmektedir [19]. Curcumin; antioksidan, antikanser aktiviteleri gibi çeşitli terapötik özellikleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmektedir [16]. Günümüzde antikanser özellikteki bitkinin ekstratlarını kanser hücre hatlarına uygulayarak hücreyi apoptoza götüren çeşitli hücre sinyal mekanizmaları üzerine etkileri incelenmektedir [20]. *Curcuma longa* Linn'den izole edilen curcumin bileşeninin proapoptotik genler, özellikle de p53 üzerindeki etkileri incelenmiştir [17]. Yaklaşık 6850 yayın ile onlarca yıldır curcumin hakkında kapsamlı araştırma, tıbbi ve sağlık faydaları konusunda daha fazla bilgi sağlamıştır (antiinflamatuvar, kardiyoprotektif, trombosupresif, antiartritik, kemopreventif ve antikanserojen özellikleri). Curcumin'in ayrıca hücrel moleküler hedefleri modüle ettiği gösterilmiştir. *Curcuma mangga*, *Curcuma zedoaria*, *Costus speciosus*, *Curcuma xanthorriza*, *Curcuma aromatica*, *Curcuma phaeocaulis*, *Etingera elatior* ve *Zingiber cassumunar* gibi çeşitli Curcumin ve analoglarının alternatif kaynaklı kaynakları bildirilmiştir [92].



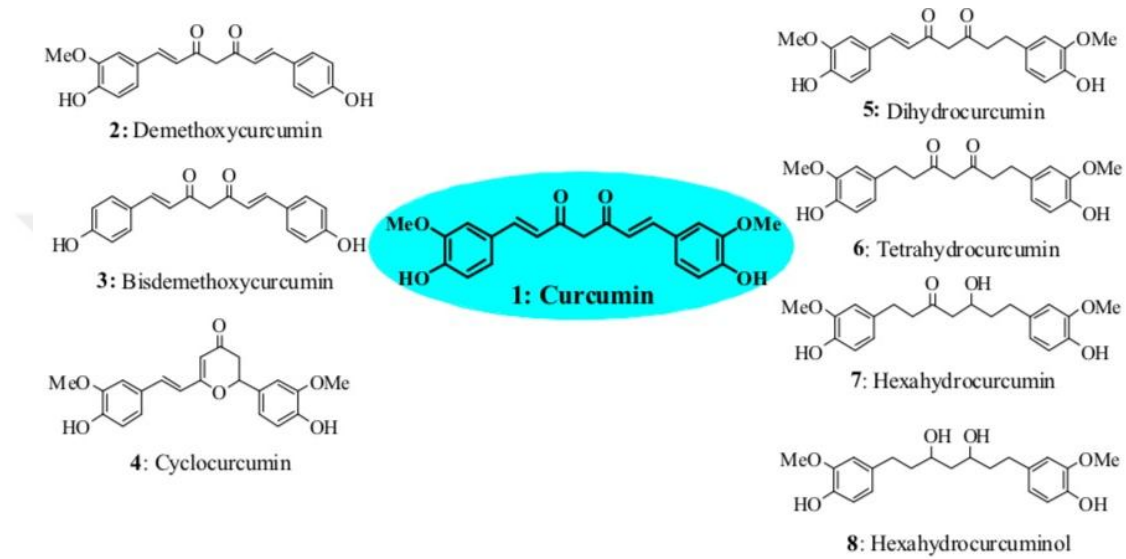
Şekil 2.18 Curcumin'in kimyasal yapısı ve biyolojik kaynakları [92]

Tipik olarak gaz kromatografisi kütle spektrometrisi ile tanımlanan farklı Curcuma türlerinin uçucu bileşenleri aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Genel olarak, Curcuma türleri çok çeşitli uçucu seskiterpenleri, monoterpenleri ve diğer aromatik bileşikler üretir. Ana uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları aşağıdaki şekilde sunulmaktadır. Curcuma esansiyel yağlarının bileşiminde muazzam bir değişiklik vardır. Petrol kimyasal profilindeki farklılıklar genotip, çeşitlilik, farklı coğrafya, iklim, mevsim, yetiştirme uygulamaları, gübre uygulaması, büyüme veya olgunlaşma sırasındaki stres, hasat zamanı, olgunlaşma aşaması, depolama, ekstraksiyon ve analiz yöntemlerinden kaynaklanıyor olabilmektedir. Bununla birlikte, varyasyonun bir kısmı, bitki türlerinin veya bazı bileşenlerin yanlış tanımlanmasından kaynaklanabilir [93].



Şekil 2.19 Curcuma türlerinin uçucu yağlarındaki kilit uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları [93]

Antikanser aktivitesine sahip olan curcuminoidler esas olarak curcumin, artomeron, α -turmeron ve β -turmeron dahil olmak üzere demettoksisürkümin, bisdemetoksikürkümin ve bisabolan seskiterpenoidler olarak ifade edilmektedir. Özellikle curcumin, kolorektal ve pankreas kanserinin tedavisi için halen faz II klinik çalışmalarında olan yeni bir ajandır. Zerdeçaldan toplam 27 curcuminoid ve 38 seskiterpenoid izole edilmiştir ve bir kısmı curcuminden daha güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir [91].



Şekil 2.20 Curcumin ve diğer doğal analogları [91]

Curcumin; antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser aktiviteleri gibi çeşitli terapötik özellikleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmektedir [16]. Günümüzde antikanser özellikteki bitkinin ekstratlarını kanser hücre hatlarına uygulayarak hücreyi apoptoza götüren çeşitli hücre sinyal mekanizmaları üzerine etkileri incelenmektedir [20]. *Curcuma longa* Linn'den izole edilen curcumin bileşeninin proapoptotik genler, özellikle de p53 üzerindeki etkileri incelenmiştir [17]. Curcumin, belirgin kimyasal özelliklerine dayanarak, kanser başlangıcı ve ilerlemesinde aktif rol alan ve kanser ilerlemesini engelleyen çok sayıda hücre dışı ve hücre içi molekül ile etkileşime girer [21]. Bu özellikler arasında, apoptoz, tümör proliferasyonu ve metastazlarda yer alan çeşitli biyolojik yollarla kanser üzerindeki önleyici etkisi önemli düzeyde araştırılmaktadır [14]. Örneğin, Yang ve arkadaşları, Curcumin'in reaktif oksijen türleri (ROS) sinyal yoluyla küçük hücreli akciğer kanserinin apoptozunu indüklediğini ortaya koymuştur [22]. Yapılan bir çalışmada; curcumin, kseno-transplant hayvan modellerinde, insan tümörlerinin büyümesi, curcumin tarafından tek başına inhibe

edildiği belirtilmiştir [23]. Banerjee ve arkadaşları, curcuminin hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğunu ve apoptozu indüklediğini, mikrotübül organizasyonunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve meme kanseri hücrelerinde mitotik kontrol noktasını aktive ettiğini bildirmiştir [24]. Curcuminin bir tür meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün G1 fazında hücre birikmesine neden olduğunu ve MAPK yolağının uyarılması yoluyla EZH2'nin curcumin kaynaklı gen ifadesinin azaldığı belirtilmiştir [25].

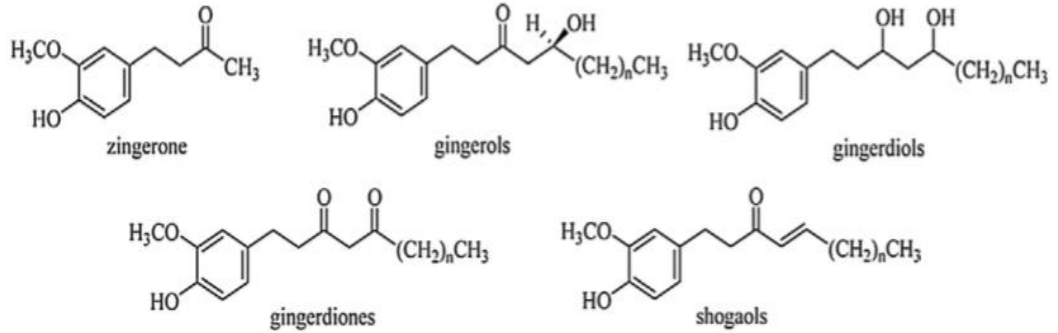
2.10 *Zingiber officinale* Roscoe

Zingiber officinale Roscoe, Zingiberaceae ailesine ait bir bitkidir. Güneydoğu Asya'da ortaya çıkmış ve daha sonra birçok ülkede gıdaya lezzet katmak için bir baharat ve çeşni olarak kullanılmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe, çeşitli hastalıklar için bitkisel ilaç olarak yaygın kullanılan bir baharat ve gıda olarak da tüketilebilen bir bitkidir. Dünya genelinde gıdalar ve içeceklerde baharat olarak kullanılan *Zingiber officinale* Roscoe genellikle dispepsi, kolit, mide bulantısı, kusma, gastrit ve diyare gibi sindirim sistemi için bir tedavi edici olarak tıbbi özellikleri ile bilinir [27, 28].



Şekil 2. 21 *Zingiber officinale* Roscoe bitkisi [91]

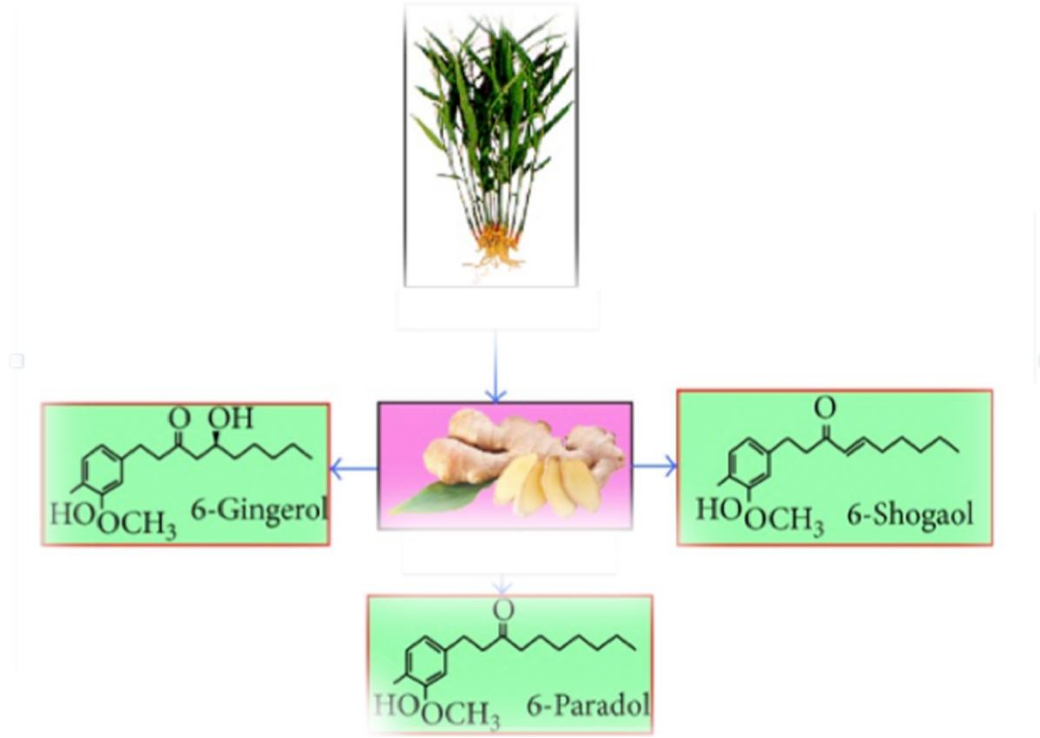
Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olan *Zingiber officinale* Roscoe, özellikle Asya ülkelerinin çoğunda küresel olarak kullanılan popüler bir baharattır [94]. Zencefilin kimyasal analizi, 400'den fazla farklı bileşik içerdiğini gösterir. Zencefil rizomlarındaki ana bileşenler karbonhidratlar (%50-70), lipitler (%3-8), terpenler ve fenolik bileşiklerdir [95]. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisi; paradollar, shogaoller ve gingerolar gibi çeşitli biyoaktif fenoliklerin önemli bir kaynağıdır [29]. Zencefilin terpen bileşenleri arasında zingiberen, β -bisabolen, α -farnesen, ses-sesquiphellandrene ve α -curcumen bulunurken fenolik bileşikler arasında gingerol, paradoller ve shogaol bulunur [96]. Bu gingeroller (%23-25) ve shogaol (%18-25) diğerlerinden daha fazla miktarda bulunur. Bunların yanı sıra amino asitler, ham lif, protein, fitosteroller, vitaminler (örneğin nikotinik asit ve A vitamini) ve mineraller de mevcuttur. Zencefil rizomunda bildirilen diğer gingerol veya shogaol ile ilgili bileşikler (%1-10), 6-paradol, 1-dehidrogingerdion, 6-zencefil ve 10-zencefil, 4-zencefil, 6-zencefil, 8-gingerdiol ve 10-gingerdiol ve diarilheptanoidler. Zencefilin karakteristik kokusu ve tadı, shogaoller ve gingeroller gibi uçucu yağların bir karışımından kaynaklanır [97].



Şekil 2.22 *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinin bileşenleri [98]

Zingiber officinale Roscoe bitkisinin; antiinflamatuvar [30], antioksidan [31], antikanser [32], antianjiyogenezis [33] aktiviteler gösterdiği bilinmektedir ve bu da kemopreventif bir ajan olduğunu göstermektedir [34, 35]. *Zingiber officinale* Roscoe, uzun zamandan beri geleneksel tıpta, iltihaplı hastalıklar dahil olmak üzere bazı hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Anti-oksidan, anti-kanser, anti-enflamatuvar, anti-anjiyogenez ve anti-aterosklerotik özelliklere sahip olan gingerol, paradol ve shogaol gibi aktif fenolik bileşikler içerir [34]. Ayrıca IL-8, VEGF21 ve yumurtalık kanseri hücreleri de dahil olmak üzere hücrel proliferasyon ve anjiyogenezde yer alan NF- κ B tarafından düzenlenen gen ürünlerinin ifadesinin azalttığıda gösterilmiştir. TNF- α pro-enflamatuvar sitokinlerden biridir ve NF κ B'nin majör bir indükleyicisidir. TNF- α , çeşitli deneysel

karsinogenez modellerinde tümör teşhisinde yer almıştır. İki aşamalı bir fare derisi karsinogenez modelinde papillomun görülme sıklığı ve çoğulluğunun, TNF- α 'yı aşırı eksprese eden farelere kıyasla TNF- α -/- hayvanlarda azaldığı bulunmuştur. TNF- α , interlökinler, COX-2 ve diğer kemokinler de transkripsiyon faktörü NF κ B ile düzenlenebilir. Her ne kadar bu faktör çoğu hücrede inaktif bir durumda ifade edilse de, kanser hücreleri, çeşitli enflamatuvar uyarıcılar ve kanserojenler tarafından indüklenen aktif bir NF κ B formunu ifade etmişlerdir. Birçok çalışma NF κ B sinyal yolunu ve bunun düzenlenmesini inflamatuvar yanıtla ilişkilendirmiştir. Dolayısıyla, NFB sinyalleşme yolunu inhibe etmek, zencefil gibi kemopreventif ajanların kullanımı ile birlikte terapötik bir strateji olabilmektedir [99].



Şekil 2.23 Zencefil, zencefil köksapı ve ana aktif bileşenleri: 6-gingerol, 6-shogaol ve 6-paradol [100]

Antik çağlardan beri *Zingiber officinale* Roscoe'nun yaygın olarak zencefil (Zingiberaceae familyası) olarak bilinen bitkinin kökleri, farklı toplumlarda baharat olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ek olarak zencefil; çeşitli soğuk algınlığı, ateş, sindirime yardımcı olmak, mide rahatsızlığı, ishal, mide bulantısı, romatizma rahatsızlıkları, gastrointestinal komplikasyonlar ve baş dönmesini tedavi etmek için çeşitli kültürlerde uzun bir tıbbi kullanım geçmişine sahiptir.

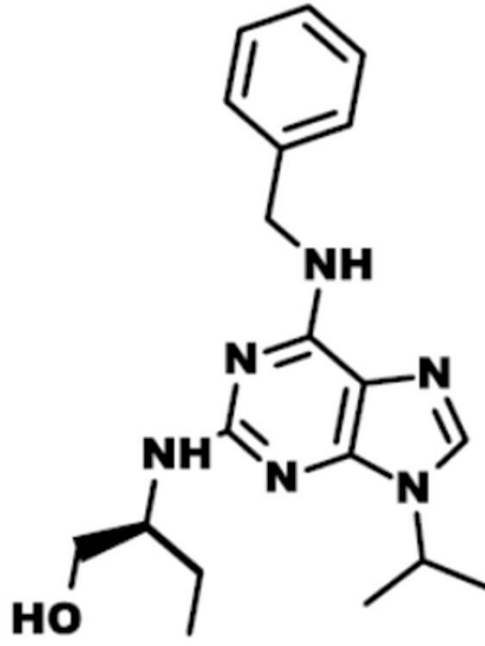
Klinik öncesi çalışmalar, zencefilin kemopreventif ve antineoplastik özelliklere sahip olduğunu da göstermiştir. Ayrıca, γ -radyasyon ve doksorubisin ve sisplatinin yan etkilerini iyileştirmede etkili olduğu bildirilmiştir; antikanser ilaçların P-glikoprotein ile akışını engellemek ve bazı neoplastik hücrelerde *in vitro* ve *in vivo* kemosensitize edici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [101].

Kurutulmuş *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinde bulunan 6-shogaol ve 6-gingerol bileşenleri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Mide kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada 6-gingerol ve 6-shogaol bileşenlerinin mide kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir, ayrıca 6-shogaol bileşeninin mitotik arreste neden olduğu ve mide kanseri hücrelerinde caspaz-3/7 yolağını aktive ettiği belirlenmiştir [36]. 6-shogaol tarafından indüklenen epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunun inhibe edildiği ve hücresel proliferasyon ve anjiyogenezde rol alan NF- κ B aracılı gen ürünlerinin ifadesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu faktörlerin yumurtalık kanserlerinde tümör hücresi çoğalması, anjiyogenezis ve apoptotik yanıtı etkilediği de gösterilmiştir [37].

2.11 Roskovitin

Roskovitin; CY-202, Seliciclib olarak adlandırılan bir sikline bağlı kinazdır (CDK). Bu ilaç katalitik ATP bağlanma yeri için rekabet etmektedir. Roscovitin, kimyasal özelliği açısından halka yapısını taşıyan; ATP, siklik AMP, NAD, FAD, adenin ve guanin gibi biyolojik olarak önemli molekülleri içeren pürin ailesine aittir.

Roskovitin; CDK'ların ATP-bağlanma bölgesine bağlanmak için ATP ile rekabet ederek, CDK katalitik alanının ATP-bağlanma bölgesini düzenleyen amino asitlerle etkileşime girerek hareket eder. CDK1, CDK2, CDK5 ve CDK7'yi inhibe eden geniş kapsamlı bir purin inhibitörüdür, ancak CDK4 ve CDK6 için zayıf bir inhibitördür. Roscovitin; hücre döngüsü, kanser, apoptoz ve nörobiyoloji çalışmalarında biyolojik bir molekül olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [102].



Şekil 2.24 Roscovitin'in kimyasal yapısı [102]

Noaman ve meslektaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada; roscovitin (sikline bağımlı kinaz inhibitörü) karsinoma hücre hatlarındaki radyo-duyarlılaştırıcı etkisini karaciğer karsinoma hücre hattı (HepG2), beyin karsinom hücre hattı (U251), akciğer karsinom hücre hattı (H460) değerlendirmek için üç farklı hücre hattı kullanılmıştır. Yapılan çalışmada kanser hücre hatları 0.1 μM ile 100 μM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda roscovitine ile muamele edilmiştir. Her deneye göre 0.5 Gy ile 20 Gy arasında değişen radyasyon dozları kullanılmıştır.

MTT testi ile hücre canlılığı, flow sitometrisi ile hücre döngüsü analizi ve difenilamin ile DNA fragmentasyon onarım mekanizması, roscovitin radyasyona bağlı duyarlılık testini araştırmak için bu yöntemleri kullanmışlardır. Roscovitin'in, kanser hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyon (IR) tepkisini değiştirmek için radyosensitizer olarak iyi bir aday olduğu, siklin bağımlı kinaz inhibitör işlevinin yanısıra, roscovitin IR kaynaklı DNA hasarlarını arttırmak için DNA çift sarmalında kırılmalar üretebileceğini gözlemlemişlerdir. MTT testiyle HepG2 karaciğer karsinomu hücre hattında roscovitin IC_{50} değerini 10 μM olarak saptamışlardır [103].

2.12 Uçucu Yağlar

Antik çağlardan beri, tıbbi bitkilerden elde edilen bazı uçucu yağların antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [104]. Bitkisel uçucu yağlar genellikle odunsu olmayan aromatik bitkilerden damıtma yöntemleri kullanılarak, özellikle buhar veya hidrodistilasyon ile izole edilmektedir. Uçucu yağların, bileşenleri temel olarak terpenik hidrokarbonların, özellikle monoterpenler ve seskiterpenler, aldehitler, ketonlar, epoksitler, alkoller, esterler gibi oksijenli türevlerin kompleks bir karışımı olan sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler düşük yan etki ve düşük toksisite göstermektedirler [105]. Bitkiler, binlerce yıldır insan sağlığının korunmasında, insan hayatının kalitesinin yükseltilmesinde önemli bir rol oynamıştır ve insanlara baharat, içecek, kozmetik, boyalar ve ilaçların değerli bileşenleri olarak hizmet etmektedirler [6]. Aromatik bitkiler, yeni ilaçlar geliştirmek için çok değerli bir kaynaktır. Bitki esansiyel yağı, bileşenleri ve ikinci metaboliti, halk hekimliğinde birçok uygulamaya sahiptir. Örneğin, antioksidan, antiinflamatuar, antibakteriyel ve antikanser aktiviteleri gibi çeşitli özelliklerine bağlı olarak aromaterapi amacıyla giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır [111]. Fitokimyasallar, bitkilerde sekonder metabolitler olarak bulunan maddelerdir. İnsan hastalıkları, dünyadaki en yaygın görülen kardiyovasküler hastalıklar ve kanser olmak üzere diyet bitkileri ve baharatlardan elde edilen fitokimyasalların kullanımında önemli ölçüde bilimsel bir ilgi vardır [91].

Uçucu yağların biyolojik aktivitesi, ana bileşenlerinin kimyasal bileşimi ile ilgilidir. Monoterpenler en çok bulunan bileşenlerdir ve uçucu yağların antitümör aktivitesi genellikle terpenoidlerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Uçucu yağlar çoğunlukla hidrofobik kimyasallardan oluşan koku verici maddelerin karışımlarıdır. Uçucu yağların bileşimlerinde büyük farklılıklar göstermektedir. Aynı türdeki bitkilerden elde edilen uçucu yağların bileşimi farklı coğrafi bölgelerde farklılıklar gösterir. Uçucu yağların içeriği bitkinin farklı mevsimlerde toplanması ile de değişiklik arz etmektedir [106, 107].

2017 yılında yapılan bir çalışmada fitokimyasal yönünden zengin olan önemli tıbbi bitkilerden biri olan *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinden hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağ elde edilerek meme kanseri hücre hattında olan MCF-7 üzerinde apoptoz indüksiyonunun inhibe edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hücreler 72 saat 0, 20, 60 ve 100 µg/ml uçucu yağ ile tedavi edilmiştir. Hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu, tripan

mavisi ve MTT analizleri kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, insan meme kanseri hücre hattında MCF-7, çeşitli uçucu yağ konsantrasyonları ile tedaviye duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır [108].

Santos ve meslektaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada HeLa hücrelerinde *Rosmarinus officinalis* L., *Curcuma longa* L., *Zingiber officinale* R. bitkilerinin uçucu yağlarının sitotoksik aktivitesini değerlendirmektedirler. Sitotoksikite testleri, tetrazolium (MTT) ve antiproliferatif aktivitenin farklı mekanizmalar tarafından değerlendirilmesi için nötr kırmızı yöntemi, hücre canlılığını değerlendirmek için tripan mavisi deneyi, apoptozis ve hücre ölümünün gösterilmesi için Annexin V boyama ile flow sitometri yöntemleri kullanılmıştır. *Curcuma longa* Linn, *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinin uçucu yağları, HeLa hücrelerine karşı güçlü sitotoksik aktivite sergilemiştir. Elde edilen IC₅₀ değerleri, *Curcuma longa* Linn için 36.6 µg/mL ve *Zingiber officinale* R. için 129.9 µg/mL olarak saptanmıştır. Annexin V testi, hem *Curcuma longa* Linn hem de *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinin uçucu yağları için hücreyi apoptoza götürdüğünü belirtmişlerdir. Sonuçlar, *Curcuma longa* Linn, *Zingiber officinale* Roscoe için bitkilerinin uçucu yağları *in vitro* olarak sitotoksik aktiviteyi gösterir ve rahim ağzı kanseri hücreleri için antikanser ajanlar olarak potansiyel kullanım olduğunu göstermektedirler [109].

BÖLÜM 3

MATERYAL METOT

3.1 MATERYAL

Çizelge 3.1 Bitki çalışmalarında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler

EKİPMAN	ÜRETİCİ FİRMA
Clavenger Aparatı	İldam
Balon joje	Isolab
Isıtıcı	Tops
Kurutulmuş <i>Curuma longa</i> Linn	Yerel market
Kurutulmuş <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Yerel market

Çizelge 3.2 Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar

EKİPMAN	ÜRETİCİ FİRMA
10 µL, 100 µL, 1000 µL mikropipet	Capp
10 µL, 100 µL, 1000 µL pipet uçları	Capp
+4 Buzdolabı	Bosch

Çizelge 3.2 Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar (devamı)

15 mL falkon	TPP
50 mL falkon	TPP
T25'lik flask	TPP
T75'lik flask	TPP
200 µL çok kanallı pipet	Capp
Çok kanallı pipet rezervuarı	Capp
96 kuyucuklu hücre plağı	Isolab
6 kuyucuklu hücre plağı	Isolab
Işık Mikroskobu	Olympus
Floresan Mikroskobu	Olympus
Hemasitometre	Isolab
Santrifüj	Isolab
Steril şırınga	Isolab
Steril filtre	TPP
Tüp standı	TPP
Su Banyosu	Major Science
Laminar Flow	Thermo Scientific
Etüv	Thermo Scientific

Çizelge 3.3 Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar

KİMYASALLAR	ÜRETİCİ FİRMA
DMEM	Capricorn
DMEM F12	Capricorn
FBS	Pann
PBS	Pann
Etil alkol	Sigma
Tripsin-EDTA	Pann
DMSO	Sigma
Penisilin	Sigma
DAPI	Thermo Fisher
PI	Thermo Fisher
DIOC6	Thermo Fisher
Akridin orange	Thermo Fisher
MTT tuzu	Sigma
Roscovitin	Rosch

Çizelge 3.4 Hücre kültüründe kullanılan kanser hücre hatları

HÜCRE HATTI	TEMİN EDİLDİĞİ YER
HepG2	ATCC
A549	ATCC
C6	ATCC

3.2 METOT

3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Kullanılan Hücre Hatları

ATCC veya Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, araştırma ve geliştirme için standart referans mikroorganizmaları, hücre hatları bankasından; HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı, C6 fare glioma hücre hatları temin edilmektedir.

Kullanılan Besiyerleri :

HepG2 için DMEM

A549, C6 için F-12 DMEM

Besiyeri Hazırlama:

Besiyerinde %10 sığır fetüsü serumu ve 10 U/mL penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile % 5 CO₂ bulunmaktadır, (500 mL total besiyeri içerisinde 50 mL sığır fetüs serumu ve 5mL antibiyotik)

MTT Solusyonunun Hazırlanması:

Her kuyucuğa 20 µL çözeltiden eklenir. MTT tuzunun moleküler ağırlığı 414,32g/mol .
M=n/V formülü uygulanır.

Her kuyucuğa 20 µL çarpı 100 kuyucuktan 2000 µL. Bir 96 kuyucuklu plaka için 2 mL MTT çözeltisine ihtiyaç vardır. Yirmi 96 kuyucuklu plaka için 20x2=40 mL çözelti hazırlamak için 40 mL PBS’de MTT tuzu çözündürülür.

Roskovitin İlacının Hazırlanması:

2 molar 2 mL stok çözelti hazırlanması için;

Roskovitin moleküler ağırlığı: 354,45g/mol

$$M=m/Na/V \quad 2=m/354,45/1,4178= 1,4178 \text{ miligram Roskovitin} \quad (3.1)$$

2ml 1,4178mg

X 1mg

X= 0,7089ml DMSO’da 1 mg roskovitinin çözünmesi gerekir.

10 µM Roskovitin için;

2000 µM 708 µL DMSO'da çözünüyorsa

10 µM X

X= 3,545 µL

HepG2 hücrelerine 10 µM ilaç uygulandı. 3.45x 15 kuyucuk=52,5 µL 3 mL besiyerine eklenir.

A549 hücreleri 20 µM roskovitin için 3,545x2= 7 µL

7 µL x 15 kuyucuk= 105 µL 3 mL besiyeri eklenir.

C6 hücrelerine 30 µM roskovitin için 3.545x 15= 155,25 µL 3 mL besiyeri eklenir.

Uçucu yağ konsantrasyonları için:

Zingiberecca officinale Roscoe bitkisinden 0.3277gr yağ elde edildi.

Curcuma longa Linn bitkisinden 0,2548gr yağ elde edildi.

Uçucu yağların herbirinin üzerine %0.01'lik DMSO ve 50 ml ddH₂O da çözündürüldü.

5 farklı ilaç konsantrasyonu uyguladığında; 1000 µgr konsantrasyon için 100 µL, 500 µgr konsantrasyon için 50 µL, 250 µgr konsantrasyon için 25 µL, 100 µgr konsantrasyon için 10 µL, 10 µgr konsantrasyon için 1 µL kullanılması gereklidir. 1 kuyucuğa 1000 µgr konsantrasyonda ilaç uygulamak için hazırlanan solüsyondan 100 µL alınır. 10 kuyucuğa 1000 µgr konsantrasyonda ilaç uygulamak istediğimizde 1000 µL solüsyon ve 1000 µL besiyeri eklenildi. Totalde 2000 µL çözelti hazırlandı.

3.2.2 Kullanılan Yöntemler

3.2.2.1 Hidrodistilasyon Yöntemi

Uçucu yağ eldesi için 1300'lü yılların başında İspanya ve Fransa'da distilasyon metodu geliştirilmiştir. 1550'li yıllara gelindiğinde farmakoloji gibi farklı dalların ihtiyacına cevap verebilmek amacıyla yeni teknikler uygulanmaya başlanmıştır [113].

Bugün klasik distilasyon yöntemlerinin yanı sıra ileri teknolojiyi kullanan modern yöntemlerde uygulanmaktadır. Uçucu bileşiklerin eldesin de yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Küçük ölçekli üretimlerde Clevenger tipi bir aparatla yapılan destilasyon işlemi endüstriyel uygulamalarda büyük destilasyon kazanlarında (İmbik) gerçekleştirilmektedir.

Yöntemin esası; soğutucu ile birlikte bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasına dayanmaktadır. Elde edilen uçucu yağ miktarı volumetrik olarak ifade edilir. Su destilasyonu en iyi toz halindeki materyallerde (örneğin; kök ya da odun unu) sonuç vermektedir [114]. Elde edilen yağ miktarı çok olmakla birlikte suyun kaynatılması esnasında uygulanan yüksek sıcaklık, termal bazı reaksiyonlara neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak artifak oluşumu, hidroliz ve isomerizasyon olayları meydana gelmektedir. Uçucu yağların bileşimi pH'a bağlı olarak değişse de hidrodistilasyon yönteminde genellikle sıvının pH değeri kontrol edilmemektedir [115].

3.2.2.2 Hücre Kültürü

-196°C'de Sıvı Azottan Hücre Açma

-196°C'de sıvı azot tanklarındaki dondurulmuş hücreler; 37°C'de çözülerek üzerine önceden hazırlanmış uygun sıcaklıktaki HepG2 hücreleri için DMEM, A549 ve C6 hücreleri için F-12 DMEM'in eklenmesinin ardından santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm'de 7 dakika tüpler santrifüj edildi. Ardından çöken hücrelerin üzerine 4 ml besiyeri eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı. Hücreler besi yeri ile birlikte T25 içerisindeki hücre kültürü ortamına alındı. Hücreler mikroskopta kontrol edildi ve %5 CO₂ etüvde ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin Sayımı

PBS yardımı ile yıkanan ve belli bir hacimde steril santrifüj tüpünde mevcut olan hücrelerden mikro pipet yardımı ile 10-20 µL alındı, 1:1 oranında tripan blue ile seyreltme ardından hemositometreye dikkatlice konularak 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı. Neubauer lamının bir karesinde sayılan hücreler 25 rakamı ve 10⁴ ile çarpıldığında 1 mL'deki hücre sayısı bulunmaktadır [116]. Hücre süspansiyonundan mikropipetle 250 µL çekilerek Neubauer lamının bir karesinde $100 \times 25 \times 10^4 = 25,10^6$ hücre sayıldı.

Hücre Pasajlama

Hücrelerin petri kabındaki sayılarının artması sonucu (%80 konfluent duruma gelince) hücre pasajlanması işlemi gerçekleştirilir. Sararan hücre kültür üst sıvısı steril bir kaba

alındı. Kültür şişesine, yüzeyini kaplayacak oranda PBS tamponu ilave edildi. Scraper yardımı ile hücreler nazikçe kazınarak PBS tamponu ile birlikte santrifüj tüpüne alındı. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ardından üst sıvı döküldü ve pellete besiyerinin eklenmesinin ardından aktarılacak hücre kültür kabına uygun miktarda besi yeri eklendi ve hücreler yeni hücre kültür kabına alındı.

Hücrelerin Dondurulması

Hücreler yıkama işlemine alındıktan sonra, hücre pelleti dondurma medyumuna alınarak her bir dondurma tüpünde 1.5 mL olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtıldı. Dondurma tüpleri önce 1 saat -20°C'de bekletildi. Ardından -80°C'ye alınan hücreler, bir gece -80°C'de bekletildikten sonra uzun süre saklanabilmeleri için -196°C sıcaklığında ki sıvı azot tanklarına kaldırıldı.

3.2.2.3 MTT Yöntemi

Herhangi bir komoterapötik ajanın hücre canlılığına etkisini anlamak için kolorometrik bir test olan MTT testi gerçekleştirilir. MTT testi indirekt olarak hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir ilaç duyarlılığı testidir. NADPH-bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimleri bir tetrazolyum türevi olan MTT'yi (3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromür)' formazana dönüştürebilirler. Aktif metabolizmaya sahip canlı hücreler MTT'yi mor renkli bir formazan ürününe dönüştürmektedir. Hücreler öldüğü zaman, MTT'yi formazana dönüştürme kabiliyetlerini kaybederler. Reaksiyon sonucu oluşan formazan mor renklidir. MTT dışında XTT, MTS ve WST gibi farklı tetrazolyum türleride hücre canlılığı deneylerinde kullanılabilir. MTT tuzu pozitif yüklüdür ve canlı ökaryotik hücrelere kolayca nüfuz edebilmektedir. XTT, MTS, WST gibi farklı tetrazolyum bileşikleri ise negatif yüklüdür ve canlı hücrelere kolayca nüfuz edememektedirler [117]. MTT solüsyonu hücrelerde formazan miktarına bağlı olarak 1 ile 4 saat arasında inkübe edilebilmektedir. 96 kuyucuklu plakalara MTT yöntemi için 6.000-10.000 arasında hücre ekimi gerçekleştirilir. Formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olduğu için, bir plaka okuyucu spektrofotometresi kullanılarak 570-630 nm dalga boyları arasında absorbans ölçümleri gerçekleştirilmektedir. MTT tetrazolyumun formazan ürünü, hücrelerin içinde çözünmeyen bir çökelti olarak birikir. Absorbans okumaları gerçekleştirilmeden önce formazan, bir çözücüde çözündürülmelidir. Formazan ürünü çözündürmek, rengi

dengelemek, buharlaşmayı önlemek ve fenol kırmızısı ve diğer kültür ortamı bileşenleri ile etkileşimi azaltmak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Çeşitli çözündürme yöntemleri; izopropanol, DMSO, dimetilformamid, SDS ve organik çözücü kombinasyonları olabilmektedir [118].

T25 flasklarındaki HepG2, A549 ve C6 kanser hücreleri %80 konfluens hale geldiğinde kullanıldı. İlk olarak hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı. Flasklar 1xPBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. 1ml tripsin/EDTA eklendi, 37 °C'de CO₂ 'li etüvde 2 dk inkübe edildi. Eklenen Tripsin/EDTA kadar besiyeri eklenerek enzim etkisi indirgenir. Hücreler flasktan yeni bir 15 mL'lik falkona toplanır. 2000 rpm'de santrifüj gerçekleştirildi ve sonrasında Neubauer lamında hücre sayımı gerçekleştirildi. 96 kuyucuklu plakların herbirine 6.000 hücre ekimleri gerçekleştirilerek hücrelerin yapışması için 24 saat etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda 1000 µL, 500 µL, 250 µL, 100 µL ve 10 µL olarak hazırlanan uçucu yağ ve DMSO karışımı hücrelere verildi. 5 farklı konsantrasyondaki ilaç dozlarının üç farklı kanser hücre hattındaki sitotoksitesini ölçmek için MTT çözeltisi eklendi. 4 saat boyunca etüvde inkübe edildi. 96 kuyucuklu plaklardaki medyalar çekilerek 100 µL DMSO eklendi. 5 dk karanlıkta bekletilerek 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

DMSO, bir organosülfür bileşiğidir ve hem polar hem de polar olmayan bileşikleri çözen ve suyla birlikte çok çeşitli organik çözücülerde karışabilen önemli bir polar aprotik çözücüdür. Nispeten yüksek bir erime noktasına sahiptir. DMSO, uçucu yağlar için bir çözücü olarak kullanılabilir. Esansiyel yağlar suda çözünür değildir ve bu nedenle DMSO gibi iyi bir çözücü hücreler üzerinde %0.1-%1 oranında toksik olmadığı için kullanılabilir [119].

Roskovitin ilacının üç farklı kanser hücresi üzerindeki IC₅₀ değeri HepG2 karaciğer kanseri hücreleri için 10 µM, A549 akciğer kanseri hücreleri için 20 µM, C6 glioma hücreleri için 30 µM olduğu belirtilmiştir. Uçucu yağ konsantrasyonları belirlenirken literatür taramalarında hacim olarak ve geniş bir konsantrasyon aralığında sitotoksik etki çalışmalarında kullanılmaktadır [120-121]. Uçucu yağların 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL konsantrasyonlarında ki sitotoksik etkisi incelenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 SONUÇLAR

4.1.1 Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağ Sonuçları

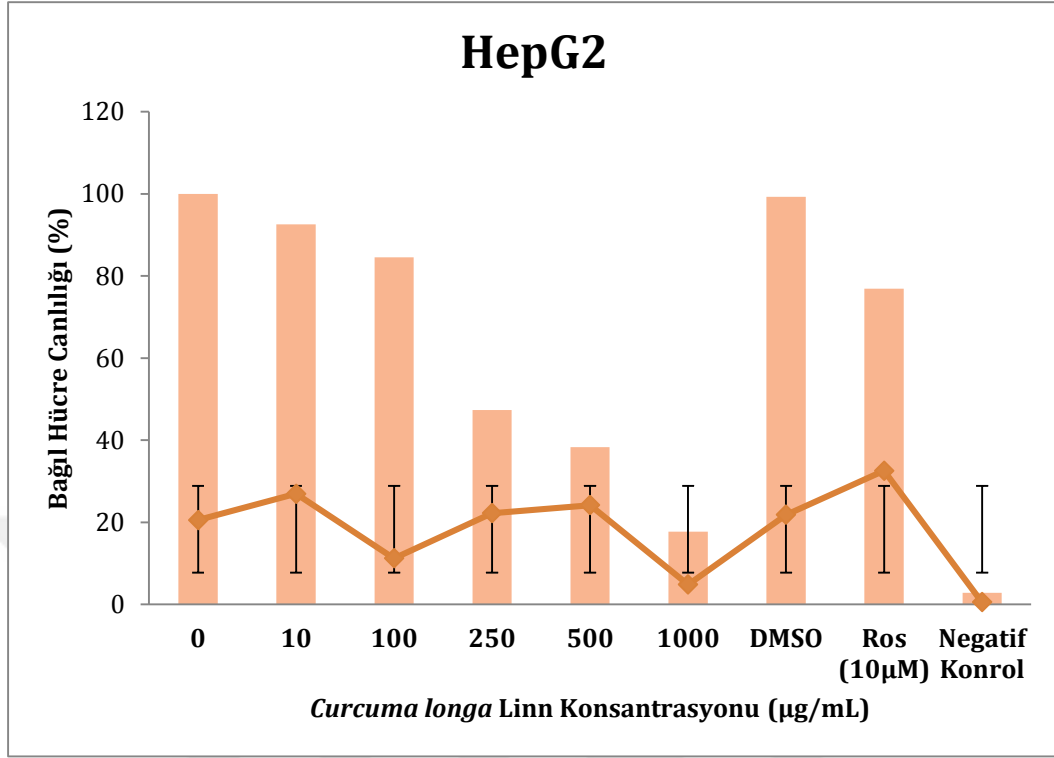
Kurutulmuş bitkilerden uçucu yağ eldesi için hidrodistilasyon yöntemi kullanılmaktadır. Uygun koşullarda kurutulan bitkiler küçük parçalara ayrılarak 200 gr tartılıp 2000 mL'lik balon jojeye konulur ve 1000 mL distile su eklenerek ısıtıcının üzerine clavenger aparatı ile birlikte düzenek kuruldu. 3 saat boyunca hidrodistilasyon işlemi gerçekleştirilerek streil olarak uçucu yağlar elde edildi. Kurutulmuş *Curuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinin herbirinden 400 gr kullanılarak hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağlar elde edilmiştir. *Zingiberecca officinale* Roscoe bitkisinden 0.3277gr uçucu yağ ve *Curcuma longa* Linn bitkisinden 0,2548gr uçucu yağ elde edildi.

4.1.2 MTT Yöntemi Sonuçları

HepG2 karaciğer kanseri hücre hattı, A549 akciğer kanseri hücre hattı ve C6 glioma kanseri hücre hattına üç tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 6.000 hücre olacak şekilde ekildi. Bitkilerden elde edilen uçucu yağlardan 5 farklı konsantrasyon 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL olacak şekilde ilaç dozları hazırlandı. Roskovitin birçok kanser hücre hattı üzerinde çalışmaları yapılan ve antikanser ilaç olarak hücre kültürü çalışmalarında kullanılan bir ajanı bu çalışmada; uçucu yağların ve roskovitinin ayrı ayrı hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi.

HepG2 için roskovitin ilaç dozu 10 μ M, C6 için 30 μ M ve A549 20 μ M kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler 24 saat sonra ışık mikroskopunda hücrelerin morfolojik özellikleri gözlemlendi ve hücrelerin plaklara yapışmış ve %80 confluent olduğu gözlemlendi; 5 farklı konsantrasyonda ki ilaç dozları hücre hatlarına uygulandı ve 24 saat ilaca maruz bırakılan hücrelere her bir kuyucuğa MTT çözeltisi eklenerek 4 saat bekletildi. MTT çözeltisinde bulunan trizolyum tuzu hücre yoğunluğuna göre sadece canlı hücreler tarafından formazan kristalleri oluşturulur. 4 saat sonunda 96 kuyucuklara ekili olan hücrelerden besiyerleri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 100 μ L DMSO koyulup 5 dk karanlıkta bekletildi. 595 nm dalga boyunda ELİSA reader'da plakalar okutuldu. Absorbans değerleri Microsoft Excel programında; ortalamaları, standart sapmaları ve ilaç dozuna bağlı % canlılık değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.1 Doza bağlı *Curcuma longa* Linn uçucu yağı ve 10 μ M Roskovitin uygulanmış HepG2 hücre hattı MTT sonuçları



Curcuma longa Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligram, %0,1'lik DMSO ve ddH₂O'da çözdülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. 10 μ g/mL ana stoktan farklı konsantrasyonlar hazırlanarak 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında ve 10 μ M Roskovitin HepG2 karaciğer kanser hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 μ g/ml) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 μ g/mL ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı %92 olarak gözlenmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %84 olarak gözlenmiştir. 250 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %47 olduğu gözlenmiştir. 500 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %38 olduğu gözlenmiştir. 1000 μ g/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %17 olduğu gözlenmiştir. 10 μ M Roskovitin uygulanan HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %76 olarak gözlenmiştir. *Curcuma longa* Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve antikanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözdürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisinede tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

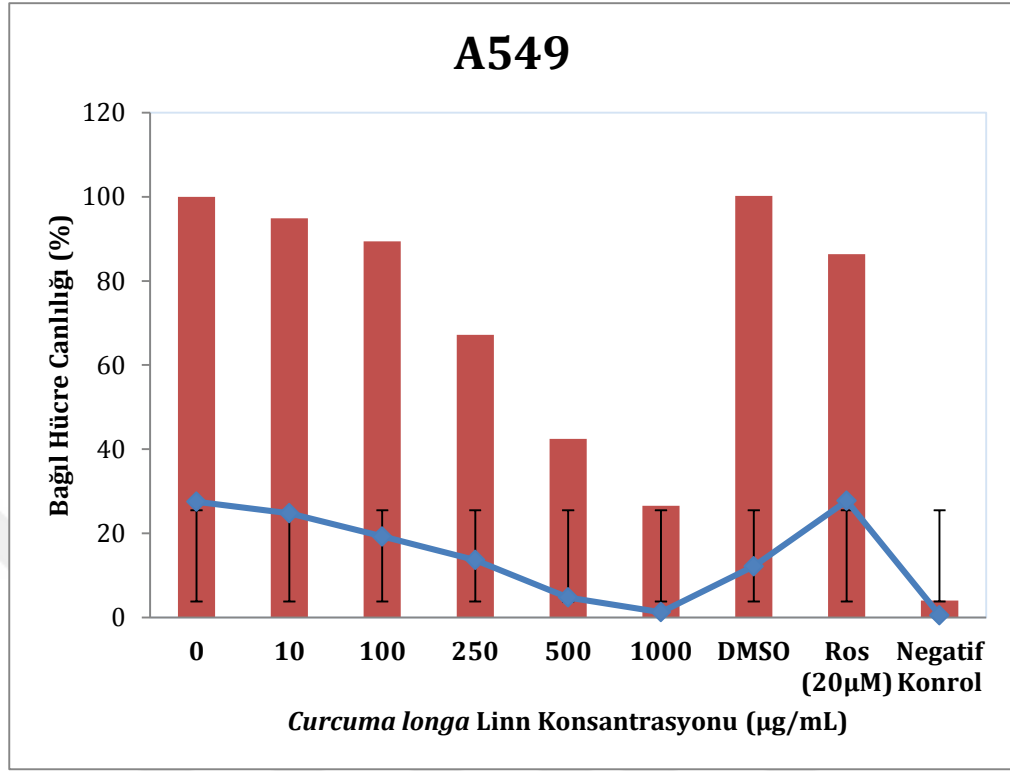
Negatif kontrol grubunda HepG2 hücre hatlarında kullanılan besiyeri olan DMEM uygulanmıştır canlılık üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.2 *Curcuma longa* Linn uçucu yağının HepG2 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları $\mu\text{g/mL}$
IC 50	256.44
IC 75	72.83
IC 90	20.68
IC 95	8.78
IC 97	4.77

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Curcuma longa* Linn bitkisinin uçucu yağları HepG2 karaciğer kanseri hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın HepG2 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 256.44 $\mu\text{g/mL}$ doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 72.83 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 20.68 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 8.78 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 4.77 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç konsantrasyonu HepG2 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın HepG2 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 256.44 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Çizelge 4.3 Doza bağlı *Curcuma longa* Linn uçucu yağı ve 20 μ M Roskovitin uygulanmış A549 hücre hattı MTT sonuçları



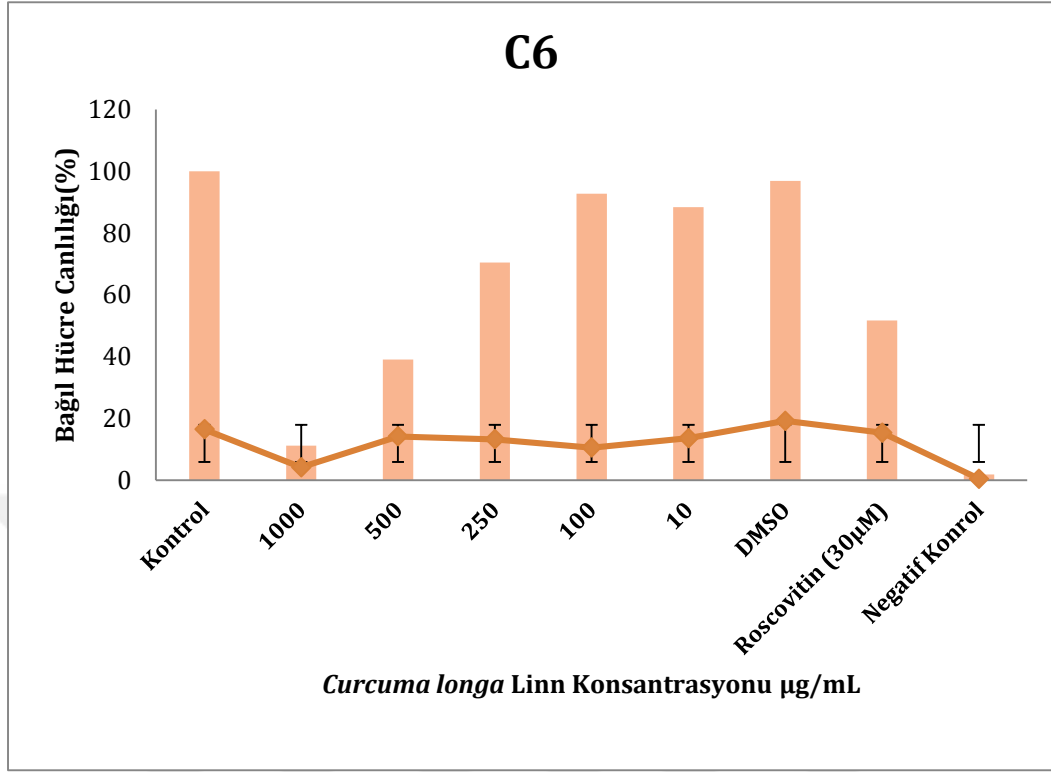
Curcuma longa Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligramı, %0,1'lik DMSO ve ddH₂O'da çözdürülerek 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında ve 20 μ M Roskovitin A549 akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 μ g/mL) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 μ g/mL ilaç uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı %94 olarak gözlenmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %89 olarak gözlenmiştir. 250 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %67 olduğu gözlenmiştir. 500 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %42 olduğu gözlenmiştir. 1000 μ g/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %26 olduğu gözlenmiştir. 20 μ M Roskovitin uygulanan A549 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %86 olarak gözlenmiştir. *Curcuma longa* Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve antikanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözdürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisi de tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.4 *Curcuma longa* Linn uçucu yağının A549 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları $\mu\text{g/mL}$
IC 50	448.08
IC 75	121.31
IC 90	32.84
IC 95	13.5
IC 97	7.14

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Curcuma longa* Linn bitkisinin uçucu yağları A549 akciğer kanseri hücrelerindeki farklı yüzdelerde ki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın A549 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 448.08 $\mu\text{g/mL}$ doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 121.31 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 32.84 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 13.5 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 7.14 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç konsantrasyonu A549 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın A549 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 448.08 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Çizelge 4.5 Doza bağlı *Curcuma longa* Linn uçucu yağı ve 30 μ M Roskovitin uygulanmış C6 hücre hattı MTT sonuçları



Curcuma longa Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligramı, DMSO ve ddH₂O'da çözdülerek 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında ve 30 μ M Roskovitin C6 glioma hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 μ g/mL) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 μ g/mL ilaç uygulanan C6 hücrelerinde hücre canlılığı %92 olarak gözlenmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %88 olarak gözlenmiştir. 250 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %70 olduğu gözlenmiştir. 500 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %39 olduğu gözlenmiştir. 1000 μ g/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %11 olduğu gözlenmiştir. 30 μ M Roskovitin uygulanan C6 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %51 olarak gözlenmiştir. *Curcuma longa* Linn bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve antikanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözdürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisi de tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Curcuma longa Linn uçucu yağının 1000 µg/mL konsantrasyonunda A549 ve C6 kanser hücre hatlarında yaklaşık %15 hücre canlılığı, HepG2 kanser hücre hattında ise %20 oranında canlı hücre gözlemlenmiştir.

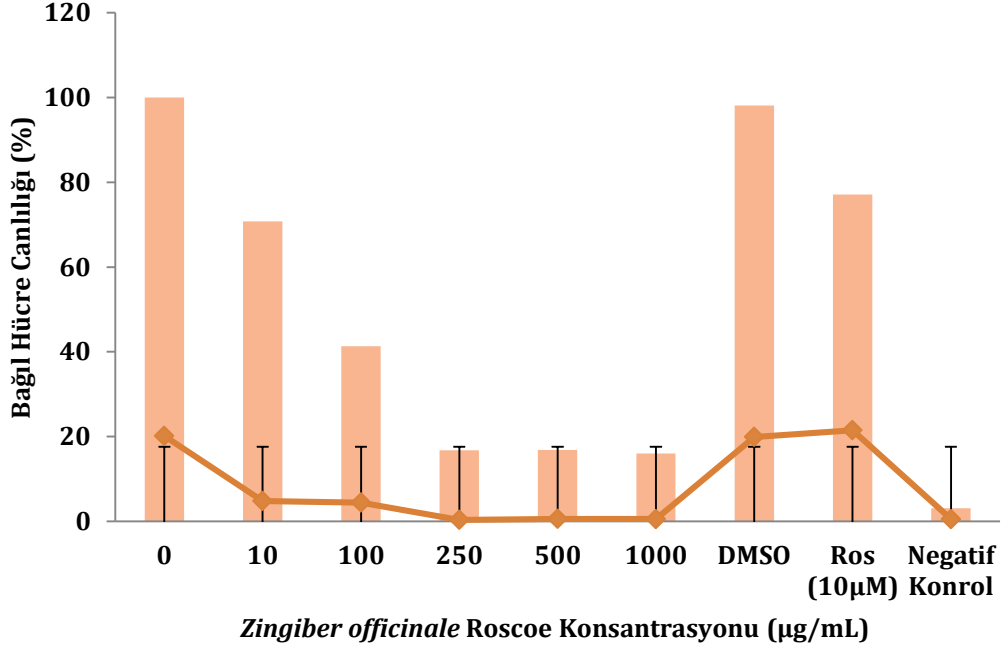
Çizelge 4.6 *Curcuma longa* Linn uçucu yağının C6 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları µg/mL
IC 50	252.81
IC 75	63.96
IC 90	16.18
IC 95	6.35
IC 97	3.26

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Curcuma longa* Linn bitkisinin uçucu yağları C6 glioma hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın C6 glioma hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 252.81 µg/mL doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 63.96 µg/mL dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 16.18 µg/mL dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 6.35 µg/mL dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 3.26 µg/mL dozda ilaç konsantrasyonu C6 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Curcuma longa* Linn uçucu yağın C6 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 252.81 µg/mL olarak saptandı.

Çizelge 4.7 Doza bağlı *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağı ve 10 μ M Roskovitin uygulanmış HepG2 hücre hattı MTT sonuçları

HepG2



Zingiber officinale Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligramı, DMSO ve ddH₂O'da çözülürerek 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında ve 10 μ M Roskovitin HepG2 karaciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 μ g/mL) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 μ g/mL ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde hücre canlılığı %70 olarak gözlenmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %41 olarak gözlenmiştir. 250 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %16 olduğu gözlenmiştir. 500 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %16 olduğu gözlenmiştir. 1000 μ g/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %16 olduğu gözlenmiştir. 10 μ M Roskovitin uygulanan HepG2 karaciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %77 olarak gözlenmiştir. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve anti-kanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözündürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisi de tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir. Negatif kontrol grubunda HepG2 hücre

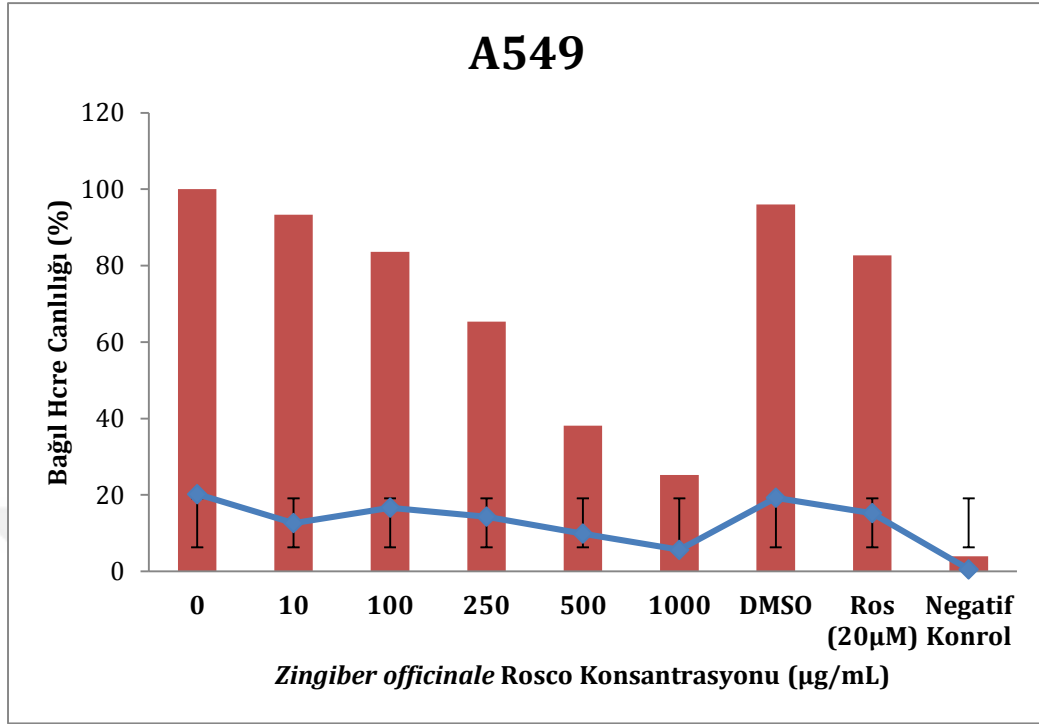
hatlarında kullanılan besiyeri olan DMEM uygulanmıştır canlılık üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.8 *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağının HepG2 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları $\mu\text{g/mL}$
IC 50	153.94
IC 75	54.29
IC 90	19.15
IC 95	9.42
IC 97	5.69

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinin uçucu yağları HepG2 karaciğer kanseri hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 153.94 $\mu\text{g/mL}$ doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 54.29 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 19.15 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 9.42 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 5.69 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç konsantrasyonu HepG2 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın HepG2 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 153.94 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Çizelge 4.9 Doza bağlı *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağı ve 20 µM Roskovitin uygulanmış A549 hücre hattı MTT sonuçları



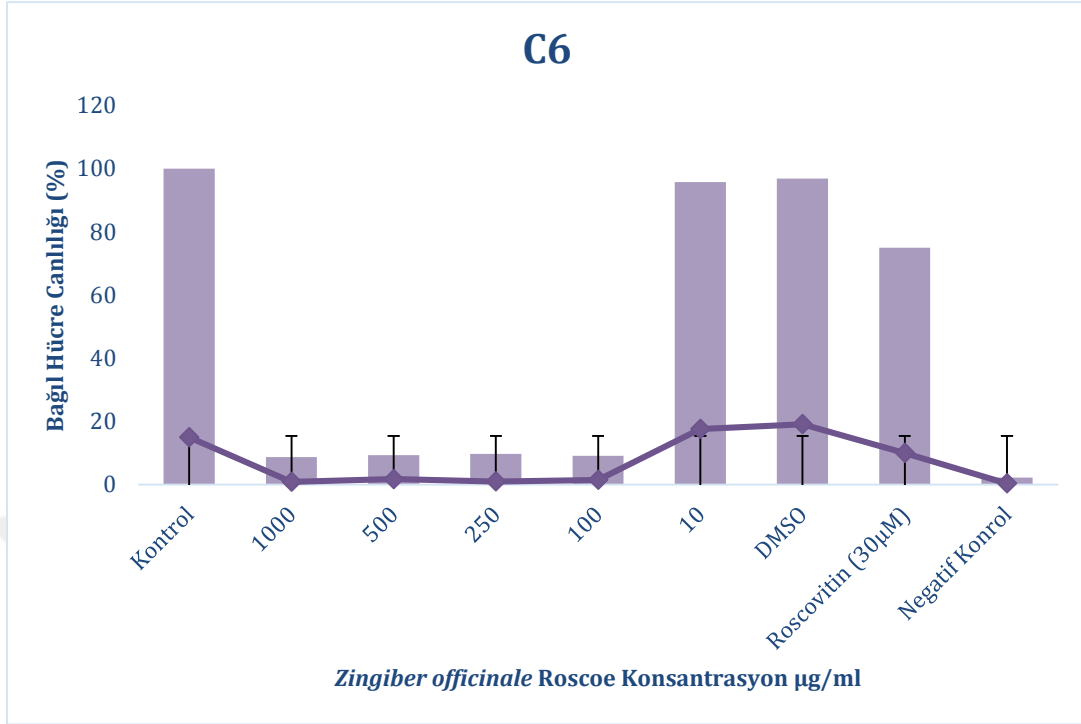
Zingiber officinale Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligramı, %0,1'lik DMSO ve ddH₂O'da çözdürülerek 0 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL konsantrasyonlarında ve 20 µM Roskovitin A549 akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 µg/mL) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 µg/mL ilaç uygulanan A549 hücrelerinde hücre canlılığı %93 olarak gözlenmiştir. 100 µg/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %83 olarak gözlenmiştir. 250 µg/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %65 olduğu gözlenmiştir. 500 µg/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %38 olduğu gözlenmiştir. 1000 µg/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı % 25 olduğu gözlenmiştir. 20 µM Roskovitin uygulanan A549 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %82 olarak gözlenmiştir. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve antikanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözdürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisi tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.10 *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağının A549 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları $\mu\text{g/mL}$
IC 50	365.74
IC 75	94.10
IC 90	24.21
IC 95	9.61
IC 97	4.98

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinin uçucu yağları A549 akciğer kanseri hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın A549 akciğer kanseri hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 365.74 $\mu\text{g/mL}$ doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 94.10 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 24.21 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 9.61 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 4.98 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç konsantrasyonu A549 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın A549 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 365.74 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

Çizelge 4.11 Doza bağlı *Zingiber Officinale* Roscoe uçucu yağı ve 30 μ M Roskovitin uygulanmış C6 hücre hattı MTT sonuçları



Zingiber officinale Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağların 10 miligramı, DMSO ve ddH₂O'da çözdölürelek 0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 100 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL konsantrasyonlarında ve 30 μ M Roskovitin C6 glioma hücre hatlarına uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda (0 μ g/mL) hücrelere ilaç uygulanmamıştır ve yapılan hesaplamalarda hücre canlılığı %100 olarak kullanılmıştır. 10 μ g/mL ilaç uygulanan C6 hücrelerinde hücre canlılığı %95 olarak gözlenmiştir. 100 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %9,9 olarak gözlenmiştir. 250 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulandığında hücre canlılığının %9,8 olduğu gözlenmiştir. 500 μ g/mL konsantrasyonda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %9,6 olduğu gözlenmiştir. 1000 μ g/mL en yüksek dozda ilaç uygulamasında hücre canlılığı %8,5 olduğu gözlenmiştir. 30 μ M Roskovitin uygulanan C6 akciğer kanser hücrelerinde hücre canlılığı %75 olarak gözlenmiştir. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve antikanser özellikteki roskovitin ilacı DMSO'da çözdürüldükleri için hücre canlılığı üzerindeki etkisine de tek olarak bakıldı. Hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.12 *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağının C6 hücreleri için IC değerleri

IC Değerleri	IC Değerleri Dozları $\mu\text{g/mL}$
IC 50	60.25
IC 75	24.60
IC 90	10.04
IC 95	5.46
IC 97	3.54

MTT testinin sonuçları CompuSyn Report programında değerlendirildi. *Zingiber officinale* Roscoe bitkisinin uçucu yağları C6 glioma hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın C6 glioma hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 60.25 $\mu\text{g/mL}$ doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 24.60 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 10.04 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 5.46 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 3.54 $\mu\text{g/mL}$ dozda ilaç konsantrasyonu C6 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın C6 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 60.25 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptandı.

4.2 ÖNERİLER

Moleküler temel bilimler ve tedavideki ilerlemeler hakkında güçlü bir bilgi edinilmesine rağmen, kanser hastalığı dünyada ikinci büyük ölüm nedenidir. Klinikte, aşamalı tedavi stratejileri cerrahi, radyoterapi ve yan etkileri olan hormon terapisi ve kemoterapi gibi sistemik tedavileri içerebilir. Kanser hastalarında geleneksel bitkisel ilaçların kullanımı artmaktadır, çünkü bu ilaçların toksik olmadığına ve kanser semptomlarını hafiflettiğine, bağışıklık sistemini güçlendirdiğine veya kanserin kendisiyle mücadele edebileceğine inanılmaktadır [110].

Kanser tedavisinde; kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi yaygın olarak kullanılmaktadır; fakat bu tedavi seçeneklerinin mevcut yan etkileri bulunmaktadır [1]. Geleneksel kemoterapi ilaçları, yüksek hücre bölünme hızları nedeniyle kanser hücrelerine karşı sitotoksiktir; bununla birlikte, bu etki mekanizması nedeniyle, tümör hücresi spesifikliği ve sağlıklı hücrelere bağlı sitotoksikite ile ilgili sorunlar vardır. Hastadaki sonraki yan etkiler iyileşmeyi engelleyebilir ve hatta yaşamı tehdit edici olduğunu kanıtlayabilir. Bu sebeple araştırmacılar doğal bitkisel kaynaklardan yararlanmaktadırlar. Özellikle antikanser, antitümörigenez ve antiinflamatuvar özellikteki etkin maddeler içeren bitkilerden elde edilen bileşenler kanser çalışmalarında kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır [4, 5]. Kansere bağlı mortaliteyi azaltmada en etkili yaklaşım olan diyet bitkileri kanserde kemopreventif ajan olarak dikkat çekmiştir.

Her yıl altı milyondan fazla insanın kanserle mücadele ettiği bildirilmiştir. İlaça direnç gelişen hastalarda mevcut tedavinin yerini almak için doğal ürünlerin kullanımında son zamanlarda bir artış olmuştur. Çeşitli etnik tıp türlerinde kullanılan bitkilerin bilimsel çalışmaları, taksol, kamptotesin, vincristine ve vinblastin dahil olmak üzere birçok değerli ilacın bulunmasına yol açmıştır. Birçok çalışma, bitkilerin antikanser özelliklerine dikkat çekmektedir. Uçucu yağların antikanser aktivitesi hakkında beş yüzün üzerinde makale yayınlanmıştır. Uçucu yağların antikanser aktivitesi üzerine ilk yayınlar 1960'lara dayanır. Yaygın kullanımları, bilim adamlarının uçucu yağların temel araştırmalarına olan ilgisini arttırdı. Özellikle son yıllarda antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler ile potansiyel anti-kanser aktivitesi araştırılmıştır. Bugüne kadar, uçucu yağların glioblastoma, melanom, lösemi ve oral kanserlerin yanı sıra kemik, meme, serviks, kolon, böbrek, karaciğer, akciğer, yumurtalık, pankreas, prostat ve uterus

kanserleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle, son yirmi yıl boyunca birçok araştırmacı, doğal ürünlerin antikanser aktivitelerini meyve, sebze ve çay gibi diyet faktörlerinde test etmiş ve rapor etmiştir [112].

Doğal ürünlerin incelenmesi antikanser tedavisinde kullanılan yeni ilaçların keşfedilmesinde en başarılı strateji olmuştur. Potansiyel antitümör ilaçların seçiminde göz önünde bulundurulması gereken parametrelerden biri, tümör hücresi büyümesini önlemedeki etkinlikleridir.

Son 10 yıldır *Curcuma longa* Linn bitkisinin etkin maddesi olan curcumin üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır. Curcumin'in kanser hücrelerini farklı sinyal yollarıyla apoptoza götürdüğü gösterilmiştir. *Curcuma longa* Linn eski tıbbi metinlerde ve geleneksel Çin tıbbında çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve iyileştirilmesi için faydalı olduğu belirtilmektedir [11]. *Curcuma longa* Linn, geleneksel olarak biliyer hastalıklar, anoreksi, coryza, öksürük, hepatik ve romatizmal hastalıklar ve çeşitli diğer kronik iltihaplı hastalıklar dahil çeşitli hastalıklarda Hindistan ve Güney Doğu Asya'da şifalı bir bitki olarak kullanılmaktadır. Özellikle curcumin, *Curcuma longa*'nın kurutulmuş rizomlarından çıkarılan aktif madde, tamamlayıcı tıp bağlamında en çok çalışılan doğal bileşiklerden biridir. İyi bilinen antienflamatuar özelliklerine ek olarak, son yıllarda yapılan klinik çalışmalar; artrit, depresyon ve bunun yanı sıra güçlü bir antitümörijenik potansiyele sahip çeşitli hastalıklarda terapötik etkinliğini vurgulanmıştır. İlginç bir şekilde, artan veri kütlesi curcumine ek olarak, zerdeçalın diğer bileşenlerinin, başlıca aromalı-tumeronlar ve aromatiklerden oluşan temel zerdeçal yağlarının olduğunu gösterir curcumin, aynı zamanda önemli bir antienflamatuar ve antioksidan özelliklere de sahiptir. Curcumin'in potansiyel sınırlamalarından biri, alımdan sonra zayıf bir şekilde emilmesidir. Bu nedenle, emilimini ve sistemik biyoyararlanımını arttırmak için stratejiler geliştirmek konusunda büyük bir ilgi vardır. Bu nedenle, yapılan çalışmalar esansiyel zerdeçal yağları ile komplekslenmiş curcumin uygulamasının dolaşımdaki biyoyararlanımını standart curcuminle karşılaştırıldığında 7-10 kat arttırdığını ve ardından da önemli ölçüde geliştirilmiş biyoaktiviteye yol açtığını gösterilmiştir. Bir çok güneydoğu Asya ülkesinin aksine, bir diyet baharatı olarak zerdeçal tüketimi batı dünyasında nadir görülür. Bununla birlikte, curcuminin sağlığa yararları için artan bilimsel kanıtlar ışığında, zerdeçal, curcumin takviyeleri içinde yer alan aktif madde temel unsur batı ülkelerinde daha yaygın olarak kabul edilmekte ve popüler hale gelmektedir. Bununla

birlikte, ticari olarak temin edilebilir curcumin özütlerinin karşılaştırılabilir şekilde arttırılmış biyoyararlanım işlevi talep eden özütler olup olmadığı ve curcuminin takviyesinin bu diyet zerdeçal yoluyla tüketme konusunda eşit derecede etkili bir yaklaşım olup olmadığı sorusu devam etmektedir [105]. Doğal bileşiklerin kullanımı ve talebi dünya çapında artmakta ve önemi, ilgili tıbbi özelliklere atfedilebilecek şekilde gösterilmektedir. Esansiyel yağlar ve diğer fito ürünleri, temel olarak uygun kimyasal özellikleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle, ilgi çeken doğal ürünlere örnektir. Uçucu yağlar binlerce yıldan beri çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde rol alan, bitki kökenli karmaşık ve çok işlevli maddelerdir. Kimyasal olarak, uçucu yağlar çeşitli rollere sahip aromatik bitkilerin ikincil metabolitleridir; herbivorlara, böceklerle ve mikroorganizmalara karşı savunma; aynı tür bitkilerle iletişim; ve çevresel uyaranlara cevap verme gibi özelliklere sahiptir. Her bir bitki türü veya alt türü, kendisini belirli bir avcıdan veya bir avcı grubundan korumak için geliştiğinden, her bitki uçucu yağın kimyasal bileşenlerinin kendi “imza” karışımını üretir. Bu, iki veya üç birincil bileşenle (% 20-70) değişen konsantrasyonlarda 20 ila 60 bileşen içerebilir. Bilinen biyomedikal özelliklere sahip yaklaşık 300 uçucu yağ ile 2000'den fazla farklı bitkiden yaklaşık 3000 uçucu yağ vardır. Bitki türleri ile birlikte, gelişim aşaması (çiçeklenme, meyve veren) ve aromatik bileşik ekstraksiyon yöntemleri, bildirilen uçucu yağlardaki bileşenlerin değişkenliğini açıklayan uçucu yağların kompozisyonu üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Uçucu yağlar, özellikle antimikrobiyal aktivite gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir ve uzun zamandır çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kanser hücresinin proliferasyonu ve sitotoksitesi, belirli esans yağları ana ve küçük bileşenleri arasındaki sinerjik ve antagonistik aktiviteye odaklanan daha yeni araştırmalarla, çok çeşitli etki mekanizmaları yoluyla sergilenir. Esansiyel yağların, kanser hücresi hedefleme aktivitesine sahip olduğu ve kanser hastasına uygulandığında proimmün fonksiyonlar göstermiş olan, paklitaksel ve docetaksel dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarının etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir. Bu tür çalışmalar, uçucu yağların hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak antikanser ajanlar olarak uygulanmasının yapılan araştırmaların son teknoloji incelemesini temsil etmektedir. Kanser hücresi hedef spesifikliği ve uçucu yağların geleneksel kemoterapötik stratejilerle kombinasyon halinde kullanımı son yıllarda yapılan popüler çalışmalardan biridir [93].

Yapılan bu tez çalışmasında zerdeçal (*Curcuma longa* Linn) bitkisinin tüm uçucu yağının HepG2, A549 ve C6 kanser hücre hatlarında antikanser etkisi araştırılmıştır. Zerdeçalın uçucu yağının 5 farklı konsantrasyondaki optimum dozu 250µg/ml olarak saptadık. HepG2, C6 ve A549 için roskovitin dozları literatürdeki çalışmalara uygun şekilde uygulandı. HepG2 ve A549 hücrelerinde 250µg/ml konsantrasyonundaki hücre canlılığı %60 iken antikanser özelliği olan roskovitin ilacının farklı hücre hatlarının herbirinin optimum dozlarına göre hücre canlılığı %70 olarak gözlenmiştir. C6 hücrelerinde roskovitin hücre canlılığı %50 iken zerdeçal uçucu yağın 250µg/ml konsantrasyona göre canlılık üzerine negatif etkisi gözlenmiştir.

Dünya genelinde gıdalar ve içeceklerde baharat olarak kullanılan *Zingiber officinale* Roscoe genellikle dispepsi, kolit, mide bulantısı, kusma, gastrit ve diyare gibi sindirim sistemi için bir tedavi edici olarak tıbbi özellikleri ile bilinir [27, 28]. Zingiberecca ailesinin üyelerinden biri olan zencefil (*Zingiber officinale* Roscoe) bitkisinin ekstraktlarının kanser hücre hatları üzerine efektif çalışmaları mevcuttur. Tez çalışmamda zencefil bitkisinden elde edilen uçucu yağların HepG2, A549 ve C6 kanser hücre hatları üzerinde farklı konsantrasyonlarının sitotoksitesi araştırılmıştır. 1000µg/ml konsantrasyonu üç hücre hattı içinde en efektif konsantrasyondur.

Zingiber officinale Roscoe bitkisinin uçucu yağları C6 glioma hücrelerindeki farklı yüzdelerdeki hücre canlılığı için ilaç dozları saptandı. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın C6 glioma hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 60.25 µg/ml doz ilaç kullanılması hesaplandı. %75 hücre canlılığı için 24.60 µg/ml dozda ilaç, %90 hücre canlılığı için 10.04 µg/ml dozda ilaç, %95 hücre canlılığı için 5.46 µg/ml dozda ilaç, %97 hücre canlılığı için 3.54 µg/ml dozda ilaç konsantrasyonu C6 hücrelerindeki etkisi saptanmıştır. *Zingiber officinale* Roscoe uçucu yağın C6 hücrelerinde %50 hücre canlılığı için 60.25 µg/ml konsantrasyon hesaplanmıştır. HepG2 ve A549 hücrelerinde 500µg/ml konsantrasyonunda hücre canlılığı %45 oranındadır. Bu iki hücre hattı için 250 µg/ml konsantrasyonunun hücre canlılığı %70 değerindedir. 100 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlar HepG2 ve A549 da hücre canlılığı üzerinde oldukça az etkiye sahiptir. C6 glioma hücrelerinde zencefil uçucu yağın 10 µg/ml konsantrasyonu hariç 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml konsantrasyonları için hücre canlılığı %20 değerindedir. 30 µM roskovitin uygulanan C6 hücrelerinin hücre canlılığı %80'dir. Literatürde zencefil ve zerdeçal uçucu yağlarının C6 glioma hücreleri üzerinde çalışma yapılmamıştır. C6 glioma hücrelerinde zerdeçal uçucu yağının 500 µg/ml

konsantrasyonu hücre canlılığı %40 iken; zencefil uçucu yağın 100 µg/ml konsantrasyonu hücre canlılığı %20 değerindedir.

Zencefilin C6 glioma hücrelerinde üç tekrarlı olarak uygulamış olduğumuz deneylerde dört farklı konsantrasyon için hücre canlılığını %90 azalttığını saptamış bulunmaktayız.

Tez konusu hipotezini oluştururken zencefil ve zerdeçal bitkisinin bilim ve halk camiasında popülaritesinin yaygın olması çalışmalarımızı şekillendirmiştir. Literatür taramalarında zencefil ve zerdeçal bitkilerinden tek madde izolasyonuna gidilerek kanser hücrelerindeki etkinliğini gözlemlenmiştir. Tez çalışmamda bu iki bitkiden elde edilen tüm uçucu yağlarının akciğer kanseri, karaciğer kanseri ve beyin kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır.



KAYNAKLAR

-
- [1] Anand, P., et al., *Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution*. Cancer Lett, 2008. 267(1): p. 133-64.
 - [2] Pack, G.T., *The Definition of Inoperability of Cancer*. Ann Surg, 1948. 127(6): p. 1105-18.
 - [3] Ades, F., K. Tryfonidis, and D. Zardavas, *The past and future of breast cancer treatment-from the papyrus to individualised treatment approaches*. Ecancermedicalsecience, 2017. 11: p. 746.
 - [4] Bodai, B.I. and P. Tusso, *Breast cancer survivorship: a comprehensive review of long-term medical issues and lifestyle recommendations*. Perm J, 2015. 19(2): p. 48-79.
 - [5] Shareef, M., M.A. Ashraf, and M. Sarfraz, *Natural cures for breast cancer treatment*. Saudi Pharm J, 2016. 24(3): p. 233-40.
 - [6] Craig, W.J., *Health-promoting properties of common herbs*. Am J Clin Nutr, 1999. 70(3 Suppl): p. 491S-499S.
 - [7] Levitsky, D.O. and V.M. Dembitsky, *Anti-breast Cancer Agents Derived from Plants*. Nat Prod Bioprospect, 2014.
 - [8] Ammon, H.P. and M.A. Wahl, *Pharmacology of Curcuma longa*. Planta Med, 1991. 57(1): p. 1-7.
 - [9] Carter, S.K. and R.B. Livingston, *Plant products in cancer chemotherapy*. Cancer Treat Rep, 1976. 60(8): p. 1141-56.
 - [10] Kuttan, R., et al., *Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa)*. Cancer Lett, 1985. 29(2): p. 197-202.
 - [11] Shanmugam, M.K., et al., *The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment*. Molecules, 2015. 20(2): p. 2728-69.
 - [12] Aggarwal, B.B., A. Kumar, and A.C. Bharti, *Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies*. Anticancer Res, 2003. 23(1A): p. 363-98.
 - [13] Slavova-Kazakova, A.K., et al., *Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations*. Beilstein J Org Chem, 2015. 11: p. 1398-411.

- [14] Shehzad, A., J. Lee, and Y.S. Lee, *Curcumin in various cancers*. Biofactors, 2013. 39(1): p. 56-68.
- [15] Reuter, S., et al., *Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2008. 76(11): p. 1340-51.
- [16] Luo, C.Q., et al., *Curcumin-coordinated nanoparticles with improved stability for reactive oxygen species-responsive drug delivery in lung cancer therapy*. Int J Nanomedicine, 2017. 12: p. 855-869.
- [17] Strimpakos, A.S. and R.A. Sharma, *Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials*. Antioxid Redox Signal, 2008. 10(3): p. 511-45.
- [18] A, O., *Turmeric (curcumin) in biliary diseases Lancet*, 229,. Lancet, 1937. 229: p. 619-621.
- [19] Gupta, S.C., G. Kismali, and B.B. Aggarwal, *Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy*. Biofactors, 2013. 39(1): p. 2-13.
- [20] Hossen, M.S., et al., *Protective mechanism of turmeric (Curcuma longa) on carbofuran-induced hematological and hepatic toxicities in a rat model*. Pharm Biol, 2017. 55(1): p. 1937-1945.
- [21] Kim, J.H., et al., *Turmeric (Curcuma longa) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)-kappaB and NF-kappaB-regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis*. Mol Nutr Food Res, 2012. 56(3): p. 454-65.
- [22] Yang, C.L., et al., *Curcumin blocks small cell lung cancer cells migration, invasion, angiogenesis, cell cycle and neoplasia through Janus kinase-STAT3 signalling pathway*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e37960.
- [23] Kunnumakkara, A.B., P. Anand, and B.B. Aggarwal, *Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins*. Cancer Lett, 2008. 269(2): p. 199-225.
- [24] Banerjee, M., P. Singh, and D. Panda, *Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells*. FEBS J, 2010. 277(16): p. 3437-48.
- [25] Hua, W.F., et al., *Curcumin induces down-regulation of EZH2 expression through the MAPK pathway in MDA-MB-435 human breast cancer cells*. Eur J Pharmacol, 2010. 637(1-3): p. 16-21.
- [26] Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer, 2001. 94(2): p. 153-6.
- [27] Zick, S.M., et al., *Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. 17(8): p. 1930-6.
- [28] Zick, S.M., et al., *Phase II trial of encapsulated ginger as a treatment for chemotherapy-induced nausea and vomiting*. Support Care Cancer, 2009. 17(5): p. 563-72.

- [29] Karna, P., et al., *Benefits of whole ginger extract in prostate cancer*. Br J Nutr, 2012. 107(4): p. 473-84.
- [30] Surh, Y.J., *Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review*. Food Chem Toxicol, 2002. 40(8): p. 1091-7.
- [31] Shobana, S. and K.A. Naidu, *Antioxidant activity of selected Indian spices*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2000. 62(2): p. 107-10.
- [32] Katiyar, S.K., R. Agarwal, and H. Mukhtar, *Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of Zingiber officinale rhizome*. Cancer Res, 1996. 56(5): p. 1023-30.
- [33] Kim, E.C., et al., *[6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 335(2): p. 300-8.
- [34] Ray, A., S. Vasudevan, and S. Sengupta, *6-Shogaol Inhibits Breast Cancer Cells and Stem Cell-Like Spheroids by Modulation of Notch Signaling Pathway and Induction of Autophagic Cell Death*. PLoS One, 2015. 10(9): p. e0137614.
- [35] Cooke, D., et al., *Anthocyanins from fruits and vegetables--does bright colour signal cancer chemopreventive activity?* Eur J Cancer, 2005. 41(13): p. 1931-40.
- [36] Ishiguro, K., et al., *Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 362(1): p. 218-223.
- [37] Rhode, J., et al., *Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells*. BMC Complement Altern Med, 2007. 7: p. 44.
- [38] Hall, A.B., et al., *Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcγR- and complement-mediated phagocytosis*. Immunity, 2006. 24(3): p. 305-16.
- [39] Hecker, E., *Definitions and terminology in cancer (tumor) etiology--an analysis aiming at proposals for a current internationally standardized terminology*. Gan, 1976. 67(4): p. 471-81.
- [40] Betts, J.G., *Anatomy and Physiology*. 2016 OpenStax, Anatomy & Physiology. OpenStax CNX. .
- [41] Otto, T. and P. Sicinski, *Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2017. 17(2): p. 93-115.
- [42] Keen, N. and S. Taylor, *Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(12): p. 927-36.
- [43] Gully, C.P., et al., *Aurora B kinase phosphorylates and instigates degradation of p53*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(24): p. E1513-22.
- [44] Parkin, D.M., F.I. Bray, and S.S. Devesa, *Cancer burden in the year 2000. The global picture*. Eur J Cancer, 2001. 37 Suppl 8: p. S4-66.
- [45] Moan, J., A.C. Porojnicu, and A. Dahlback, *Ultraviolet radiation and malignant melanoma*. Adv Exp Med Biol, 2008. 624: p. 104-16.
- [46] Mallet, J.D., et al., *Implication of ultraviolet light in the etiology of uveal melanoma: A review*. Photochem Photobiol, 2014. 90(1): p. 15-21.

- [47] Korac, R.R. and K.M. Khambholja, *Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation*. Pharmacogn Rev, 2011. 5(10): p. 164-73.
- [48] Budden, T., et al., *Repair of UVB-induced DNA damage is reduced in melanoma due to low XPC and global genome repair*. Oncotarget, 2016. 7(38): p. 60940-60953.
- [49] Noonan, F.P., et al., *Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment*. Nat Commun, 2012. 3: p. 884.
- [50] Ichii-Nakato, N., et al., *High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi*. J Invest Dermatol, 2006. 126(9): p. 2111-8.
- [51] Menzies, A.M., et al., *Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2012. 18(12): p. 3242-9.
- [52] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
- [53] Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
- [54] Hynes, N.E. and G. MacDonald, *ErbB receptors and signaling pathways in cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2009. 21(2): p. 177-84.
- [55] Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. 141(7): p. 1117-34.
- [56] Wang, H., et al., *Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity*. Neoplasia, 2011. 13(5): p. 461-71.
- [57] Oltean, S. and D.O. Bates, *Hallmarks of alternative splicing in cancer*. Oncogene, 2014. 33(46): p. 5311-8.
- [58] Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. 363(9): p. 809-19.
- [59] Abubaker, J., et al., *Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma*. J Pathol, 2009. 219(4): p. 435-45.
- [60] Guil, S., et al., *Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus*. Cancer Res, 2003. 63(17): p. 5178-87.
- [61] Goitre, L., et al., *The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets*. Methods Mol Biol, 2014. 1120: p. 1-18.
- [62] Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. Sci STKE, 2004. 2004(250): p. RE13.
- [63] Knickelbein, K. and L. Zhang, *Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer*. Genes Dis, 2015. 2(1): p. 4-12.
- [64] Pylayeva-Gupta, Y., E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, *RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web*. Nat Rev Cancer, 2011. 11(11): p. 761-74.

- [65] Santarpia, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, *Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. 16(1): p. 103-19.
- [66] Grana, X. and E.P. Reddy, *Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)*. Oncogene, 1995. 11(2): p. 211-9.
- [67] Chappell, W.H., et al., *Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health*. Oncotarget, 2011. 2(3): p. 135-64.
- [68] Hejmadi, M., *Introduction to Cancer Biology*. 2010: Momna Hejmadi & bookboon.com
- [69] Malumbres, M. and A. Pellicer, *RAS pathways to cell cycle control and cell transformation*. Front Biosci, 1998. 3: p. d887-912.
- [70] Okumura, N., et al., *Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. 413(3): p. 395-9.
- [71] Godefroy, N., et al., *p53 and Retinoblastoma protein (pRb): a complex network of interactions*. Apoptosis, 2006. 11(5): p. 659-61.
- [72] Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. Oncogene, 2006. 25(34): p. 4798-811.
- [73] Artandi, S.E. and R.A. DePinho, *Telomeres and telomerase in cancer*. Carcinogenesis, 2010. 31(1): p. 9-18.
- [74] Hiyama, E. and K. Hiyama, *Telomere and telomerase in stem cells*. Br J Cancer, 2007. 96(7): p. 1020-4.
- [75] Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. 86(3): p. 353-64.
- [76] Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(6): p. 789-91.
- [77] Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. 420(6916): p. 629-35.
- [78] Schmidt, A. and A. Hall, *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. Genes Dev, 2002. 16(13): p. 1587-609.
- [79] Parri, M. and P. Chiarugi, *Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control*. Cell Commun Signal, 2010. 8: p. 23.
- [80] Rouas-Freiss, N., et al., *Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis*. Int J Cancer, 2005. 117(1): p. 114-22.
- [81] Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018.
- [82] Gersten, O. and J.R. Wilmoth, *The Cancer Transition in Japan since 1951*. Demographic Research, 2002. 7(5): p. 271-306.

- [83] Farshori, N.N., et al., *Anticancer activity of Petroselinum sativum seed extracts on MCF-7 human breast cancer cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. 14(10): p. 5719-23.
- [84] Richie, R.C. and J.O. Swanson, *Breast cancer: a review of the literature*. J Insur Med, 2003. 35(2): p. 85-101.
- [85] Balis, J.U., et al., *Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction*. Exp Lung Res, 1984. 6(3-4): p. 197-213.
- [86] Simstein, R., et al., *Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. 228(9): p. 995-1003.
- [87] Li, K., et al., *CHMP4C Disruption Sensitizes the Human Lung Cancer Cells to Irradiation*. Int J Mol Sci, 2015. 17(1).
- [88] Wu, Q., et al., *Chemoresistance to gemcitabine in hepatoma cells induces epithelial-mesenchymal transition and involves activation of PDGF-D pathway*. Oncotarget, 2013. 4(11): p. 1999-2009.
- [89] Benda, P., et al., *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. 161(3839): p. 370-1.
- [90] Lemieszek, M.K., et al., *Anticancer effects of fraction isolated from fruiting bodies of Chaga medicinal mushroom, Inonotus obliquus (Pers.:Fr.) Pilat (Aphyllophoromycetideae): in vitro studies*. Int J Med Mushrooms, 2011. 13(2): p. 131-43.
- [91] Vinay Kr. Singh, P.Y.a.N.T., *Recent advances in the synthesis, chemical transformations and pharmacological studies of some important dietary spice's constituents*. Chemistry & Biology Interface, 2014. 4(2): p. 66-99.
- [92] Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin: the Indian solid gold*. Adv Exp Med Biol, 2007. 595: p. 1-75.
- [93] Dosoky, N.S. and W.N. Setzer, *Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species*. Nutrients, 2018. 10(9).
- [94] Demin G., Y.Z., *Comparative antibacterial activities of crude polysaccharides and flavonoids from Zingiber officinale and their extraction*. American Journal of Tropical Medicine, 2010. 5: p. 235-238.
- [95] Grzanna, R., L. Lindmark, and C.G. Frondoza, *Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions*. J Med Food, 2005. 8(2): p. 125-32.
- [96] Ali, B.H., et al., *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research*. Food Chem Toxicol, 2008. 46(2): p. 409-20.
- [97] Govindarajan, V.S., *Ginger--chemistry, technology, and quality evaluation: part 1*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1982. 17(1): p. 1-96.
- [98] Jaroslava Švarc-Gajić, A.C., Antonio Segura-Carretero, and P.M. Isabel Borrás Linares, *Characterisation of ginger extracts obtained by subcritical water*. The Journal of Supercritical Fluids, 2017. 123: p. 92-100.

- [99] Habib, S.H., et al., *Ginger extract (Zingiber officinale) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats*. Clinics (Sao Paulo), 2008. 63(6): p. 807-13.
- [100] Prasad, S. and A.K. Tyagi, *Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer*. Gastroenterol Res Pract, 2015. 2015: p. 142979.
- [101] Park, G.H., et al., *Anti-cancer activity of Ginger (Zingiber officinale) leaf through the expression of activating transcription factor 3 in human colorectal cancer cells*. BMC Complement Altern Med, 2014. 14: p. 408.
- [102] Cicenias, J., et al., *Roscovitine in cancer and other diseases*. Ann Transl Med, 2015. 3(10): p. 135.
- [103] Eman Noaman, A.M.M., Nadia Y.S. Morcos and Hayam Mostafa Sayed, *Role of novel anticancer drug Roscovitine on enhancing radiosensitivity in carcinoma cell lines*. 2nd International Conference on Radiation Sciences and Applications, 2010(28/3).
- [104] Dagli, N., et al., *Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review*. J Int Soc Prev Community Dent, 2015. 5(5): p. 335-40.
- [105] Toden, S., et al., *Essential turmeric oils enhance anti-inflammatory efficacy of curcumin in dextran sulfate sodium-induced colitis*. Scientific Reports, 2017. 7(1): p. 814.
- [106] Thosar, N., et al., *Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study*. Eur J Dent, 2013. 7(Suppl 1): p. S71-7.
- [107] Sandra Montero-Villegas, R.C., Boris Rodenak-Kladniew, María Agustina Castro, Marianela Galle, José F. Cicció, Margarita García de Bravo & Mónica Polo, *Cytotoxic effects of essential oils from four Lippia alba chemotypes in human liver and lung cancer cell lines*. Journal of Essential Oil Research, 2018. 30(3): p. 167-181.
- [108] Atef A. Abd El-Rahman, S.M.A.E.-S., H.A. Elwan and F.K. Alimova, *Ginger Essential Oil In Vitro Inhibits Cell Growth And Induces Apoptosis In MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma Cells*. Agricultural Biochemistry and its Application, 2017. 44(No.(6B)).
- [109] Santos, P.A., et al., *Assessment of Cytotoxic Activity of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.), Turmeric (Curcuma longa L.), and Ginger (Zingiber officinale R.) Essential Oils in Cervical Cancer Cells (HeLa)*. Scientific World Journal, 2016. 2016: p. 9273078.
- [110] Pereira, M.M., et al., *Zingiber officinale Roscoe (ginger) as an adjuvant in cancer treatment: a review*. J BUON, 2011. 16(3): p. 414-24.
- [111] Lee, Y., *Cytotoxicity Evaluation of Essential Oil and its Component from Zingiber officinale Roscoe*. Toxicol Res, 2016. 32(3): p. 225-30.
- [112] Wang, H., et al., *Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability*. Anticancer Agents Med Chem, 2012. 12(10): p. 1281-305.

- [113] Rangahau, M. K., 2001 Essential oils and their production. Crop and Food Research. [Broad sheet] New Zealand Institute for Crop & Food Research Ltd, A crown Research Institute.
- [114] Linskens, H.F., Jackson, J.F, 1997a Modern Methods of Plant Analysis, (19): Plant Volatile Analysis, Springer, Germany.
- [115] Linskens, H. F., Jackson, J.F, 1997b Modern Methods of Plant Analysis, (12): Essential Oils and waxes, Springer, Germany.
- [116] Moroff G., J. E. M. D. 1994. Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in white cell-reduced platelet components. *The Journal of AABB Transfusion*, 34(1): 35-38.
- [117] Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunology Methodology, 1983;65:55–63.
- [118] Berridge MV, Tan AS. *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys. 1993;303(2):474–82.
- [119] Smith, R. T. S. K. D. P. 2014. *Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit Salmonella and Campylobacter in vitro*. *The Journal of Applied Poultry Research*, 23(2): 221-227.
- [120] Obakan, P., Köse, B., Çoker-Gürkan, A., Arısan, E.D., & Coşkun, D., *Downregulation of c-Myc mediated ODC expression after purvalanol treatment is under control of upstream MAPK signaling axis in MCF-7 breast cancer cells*. *Turkish Journal of Biology*, 2014. 38: 867-879.
- [121] Noaman. E., M. A. M., Morcos. Y.S., Sayed. H.M., . 2010. Role of novel anticancer drug Roscovitine on enhancing radiosensitivity in carcinoma cell lines. *2nd International Conference on Radiation Sciences and Applications*, 28(3).

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Merve YÜKSEL
Doğum Tarihi ve Yeri : 16/04/1992, İstanbul/Fatih
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : merveyksl29@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji Ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Moleküler Biyoloji Ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2015
Lise	Sayısal	Kırımlı Rüştü Olcay Anadolu Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Görevi	Alan	Firma/Kurum	Yıl
Stajyer	Sitogenetik	Nesiller Genetik	2012

YAYINLARI

Proje

1. “*Curcuma longa* Linn ve *Zingiber officinale* Roscoe bitkilerinden yağ asidi ve uçucu yağ eldesi MCF7 MCF10A ve Glioma hücre hatları üzerinde antikanser etkisine bakılması”, FYL-2018-3290, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Araştırmacı.

