

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**FERMENTE EDİLMİŞ MORUS NİGRA MEYVE SUYUNUN  
MCF7 VE MCF10A İNSAN MEME KANSERİ HÜCRE  
HATLARINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**AYÇA DİREN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. OĞUZ ÖZTÜRK**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

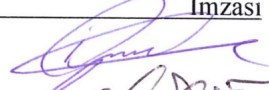
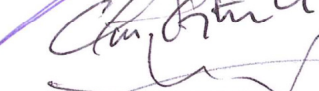
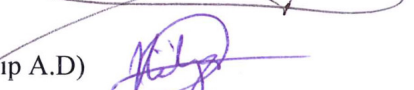


**İSTANBUL-2015**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Ayça Diren tarafından hazırlanan "Fermente Edilmiş Morus Nigra Meyve Suyunun MCF7 ve MCF10A İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 01 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
2.Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
3.Prof. Dr. Sadrettin PENÇE (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
4.Prof. Dr. Hülya YILMAZ AYDOĞAN (İ.Ü.DETAE, Moleküler Tıp A.D)	
5.Y.Doç. Dr. Esra EROĞLU ÖZKAN (İ.Ü Ecz. Fak. Farmakognozi A.D)	

**BEYAN**

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

  
Ayça DİREN

## İTHAF

Tezimi aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Çalışmamı gerçekleştirmem de bana yardımcı olan, bilimsel desteğini ile sabrını esirgemeyen ve en çok da bana inanan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Oğuz Öztürk'e,

Tez çalışmam süresince bana destek olan Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Prof. Dr. Arzu Ergen, Prof. Dr. Bedia Ağaçhan, Prof. Dr. Ümit Zeybek, Prof. Dr. Sadrettin Peñçe, Dr. Özlem Timirci Kahraman, Dr. Özlem Küçük hüseyin, Dr. Canan Cacına ve Dr. Güldal İnal Gültekin olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarım,

Tezim için gerekli düt sularının hazırlanması, liyofilizasyonu ve mayalanmasında katkıları olan İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Zeynep Petek Çakar'a ve Ar. Gör. Mevlüt Arslan'a, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Esra Eroğlu Özkan'a ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özlem Kurt Şirin'e,

Tez çalışmam ve yazımı süresince bana yardımları, sabırları ve manevi destekleri için çok kıymetli dostlarım Hilal Çatma, Tolga Çatmakaş, Burcu Çelikel, Duygu Çıtlak, Yasemin Çıtlak, Can Engin, Allison Pınar Eronat, Özkan Hizaroğlu, Ezgi Küçük, Sinem Raday, Mehmet Fatih Seyhan, Mete Bora Tüzüner, Ezgi Nurdan Yenilmez, Canan Yılmaz ve Cihan Yılmaz'a,

Her anımda yanımda olan ve her zaman desteklerini üzerimde hissettiğim canım ailem Aylin Eda Diren, Ayşe Diren ve Kenan Diren'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 44896

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.1.1. Meme Anatomisi.....	3
2.1.2. Meme Kanserinin Tanımı ve Önemi.....	4
2.1.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....	4
2.2. Dutlar ve Özellikleri .....	5
2.2.1. Türkiye’de Dut.....	6
2.2.2. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılmaları .....	6
2.2.3. Biyoaktif Bileşenleri .....	7
2.2.3.1. Vitaminler .....	7
2.2.3.2. Mineraller.....	7
2.2.3.3. Antosiyaninler .....	8
2.2.3.4. Sağlık Yararları .....	8
2.2.3.5. Antioksidan Özellikleri .....	8
2.2.3.6. Antikanser Özellikleri .....	9
2.2.3.7. Antimutajenik Özellikleri.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	10
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar .....	10
3.3. Denede Kullanılan Çözeltiler.....	10

3.3.1. Mediumun Hazırlanması.....	10
3.3.2. Hücre Dondurma Mediumunun Hazırlanması.....	11
3.3.3. %70'lik ve %60'lık EtOH Hazırlanması .....	11
3.3.4. PBS Hazırlanması .....	11
3.3.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması .....	11
3.4. Dutların Temini.....	11
3.5. <i>Morus Nigra</i> ve <i>Morus Alba</i> Meyvelerinin Ekstraksiyonu ve Meyve Sularının Elde Edilmesi .....	11
3.6. Dut Sularının Mayalanması .....	12
3.7. Fermente Dut Sularının HPLC ile Analizi.....	12
3.8. Fermente Meyve Sularının Mayadan Kurtarılması ve Liyofilizasyonu.....	13
3.9. Hücre Kültürü .....	13
3.9.1. Hücrelerin Temini .....	13
3.9.2. Hücre Kültür Ortamı .....	14
3.9.3. Hücrelerin Çözülmesi .....	14
3.9.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	14
3.9.5. Hücrelerin Sayımı .....	15
3.9.6. Hücrelerin Dondurulması.....	15
3.9.7. Hücrelerin Plakalara Ekimi.....	15
3.9.8. Hücrelerin Dozlanması .....	15
3.9.9. Hücrelere WST-1 Hücre Canlılık Testinin Uygulanması.....	16
3.9.9.1. 6-İçme Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	16
3.9.9.2. MCF-7 Hücre Hattı .....	16
3.9.9.3. PDL Hücre Hattı .....	19
3.9.10. 11-24-12 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	21
3.9.10.1. MCF-7 Hücre Hattı .....	21
3.9.10.2. MCF-10A Hücre Hattı .....	22
3.9.10.3. PDL Hücre Hattı .....	24
3.9.11. 14 – Kenan Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	25
3.9.11.1. MCF-7 Hücre Hattı .....	25
3.9.11.2. MCF-10A Hücre Hattı .....	27
3.9.11.3. PDL Hücre Hattı .....	28
3.9.12. G008 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	30

3.9.12.1. MCF-7 Hücre Hattı .....	30
3.9.12.2. MCF-10A Hücre Hattı .....	31
3.9.12.3. PDL Hücre Hattı .....	33
3.9.13. Yaşar – 28 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi .....	34
3.9.13.1. MCF-7 Hücre Hattı .....	34
3.9.13.2. MCF-10A Hücre Hattı .....	36
3.9.13.3. PDL Hücre Hattı .....	37
3.9.14. Hücrelere Annexin V – PI Boyama ile Apoptoz Tayinin Yapılması.....	38
3.9.15. MCF-7 ve PDL Hücre Hattında Anneksin V – FITC .....	39
3.9.15.1. 6 – İçme Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi .....	41
3.9.15.2. 14 – Kenan Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi .....	42
3.9.15.3. G008 Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi .....	43
3.10. İstatiksel Analiz .....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	50
KAYNAKLAR .....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59

**TABLULAR LİSTESİ**

3-1:Dut Suları HPLC Analizi .....	13
4-1: 6-İçme dutunun analizi .....	45
4-2:14-Kenan dutunun analizi .....	46
4-3:11-24-12 Dutunun Analizi.....	47
4-4:G-008 Dutunun Analizi .....	48
4-5:Yaşar-28 Dutunun Analizi.....	49

## ŞEKİLLER LİSTESİ

3-1:MCF-7 Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	16
3-2:MCF-7 Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	17
3-3:MCF-7 Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	17
3-4:MCF-10A Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	18
3-5:MCF-10A Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	18
3-6:MCF-10A Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	19
3-7:PDL Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	19
3-8:PDL Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	20
3-9:PDL Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	20
3-10:MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	21
3-11:MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	21
3-12:MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	22
3-13:MCF-10A Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	22
3-14:MCF-10A Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	23
3-15:MCF-10A Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	23
3-16:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	24
3-17:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	24
3-18:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	25
3-19:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	25
3-20:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	26
3-21:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	26
3-22:MCF-10A Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ..	27
3-23:MCF-10A Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ..	27
3-24:MCF-10A Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ..	28
3-25:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	28
3-26:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	29
3-27:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	29
3-28:MCF-7 Hücre Hattında G008 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	30
3-29:MCF-7 Hücre Hattında G008 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	30
3-30:MCF-7 Hücre Hattında G008 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	31

3-31:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	31
3-32:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	32
3-33:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi.....	32
3-34:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	33
3-35:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	33
3-36:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	34
3-37:MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	34
3-38:MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	35
3-39:MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	35
3-40:MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ...	36
3-41:MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ...	36
3-42:MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi ...	37
3-43:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	37
3-44:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	38
3-45:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi .....	38
3-46:MCF-7 ve PDL Hücre Kapılama.....	40
3-47:MCF-7 Hücre Hüresi Anneksin V- FITC Boyasız & Boyalı Kontrolleri .....	40
3-48:PDL Hücre Hüresi Anneksin V- FITC Boyasız & Boyalı Kontrolleri .....	41
3-49:6 – İçme Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	41
3-50:6 – İçme Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	42
3-51:14 - Kenan Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	42
3-52:14 - Kenan Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	43
3-53:G-008 Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	43
3-54:G-008 Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi .....	44

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

BPE : Pituitary Extract

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Dimetil Sülfoksit

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

EGF : Epidermal Growth Factor

EtOH : Etanol

FBS : Fatal Bovine Serum

FITC : Fluorescein Isothiocyanate

GA : Gentamicin – Amphotericin

HEPES : Hidroksi Etil Piperazin Etan Sülfonik Asit

hFGF-B : Human Fibroblastic Growth Factor

MEGM : Mammary Epithelial Cell Growth Medium

MCF-7 : Michigan Cancer Foundation-7

MCF10A : Michigan Cancer Foundation-10A

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDL : Periyodental Ligaman

WST-1 : Water Soluble Tetrazolium Salts

## ÖZET

Diren, A. (2014). Fermente Edilmiş Morus Nigra Meyve Suyunun MCF-7 ve MCF-10A İnsan Meme Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Flavanoidler, fenolik asitler ve antosiyaninler gibi doğal antioksidanları içeren dut meyveler oldukça iyi bir kaynaktır. Serbest radikal inhibitörleri olarak etki gösterebilen yüksek etkinlikte antioksidan enzimleri ve oksijen radikal süpürücü aktiviteleri vardır, bu sayede hücrel hasarlara karşı koruma sağlarlar.

Bu meyveler içinde bulunan, tropikal ve subtropikal bir meyve türü olan dut (*Morus spp.*), Moraceae ailesinin *Morus* cinsinde yer almaktadır. *Morus* cinsinde yaygın olarak yetiştirilen türler; kırmızı dut (*Morus rubra*), karadut (*Morus nigra*) ve beyaz dut (*Morus alba*)'tur.

Fermente içeceklerin, fenolik bileşikleri içermeleri ve antioksidan etkileri nedeniyle yaşlanma, kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi süreçlerin önlenmesinde önemli rol oynadıkları önerilmektedir. Dolayısıyla yüksek antosiyanin içeriği olan fermente edilmiş karadutun kanser gelişimi üzerine potansiyel antikarsinogenik etkilerinin bulunması çok muhtemeldir.

Bu amaçla çalışmamızda, *in vitro* hücre kültürü yöntemleri kullanılarak, fermente karadutun sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda kullanılan MCF7 meme kanseri hücre soyu, en yaygın gözlenen meme kanserini örnekleyen östrojen reseptör pozitif ER+ özelliktedir. Kontrol olarak normal meme epitel hücre soyu olan MCF10A ve periyodontal ligaman hücre soyu PDL kullanılmıştır. Bu üç tip hücre soyunda fermente karadut özütlerinin hücre canlılığı üzerinde karşılaştırmalı etkisi incelenerek, fermente karadutun meme kanserinde olası önleyici veya baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Karadut, Mayalanma, Meme Kanseri, Flavanoid, Apoptoz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 44896

## ABSTRACT

Diren A. (2014). Investigation of Fermentated *Morus Nigra* Juice in MCF-7 and MCF-10A Human Breast Cancer Cell Lines' Cytotoxic and Apoptotic Effects. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul.

Berry fruits are a good source of natural antioxidants such as anthocyanins, flavonoids, and phenolic acids. They have high antioxidant enzymes and oxygen radical scavenging activities, which could be as effective as free radical inhibitors and provide protection against harmful damage.

In one of these fruits, Mulberry (*Morus spp.*) is a tropical and subtropical fruit species and belongs to Morecaea family genus *Morus*. The species are widely grown in the genus *Morus* are red (*Morus rubra*), black (*Morus nigra*) and white (*Mogus alba*). Antioxidant activities of mulberry species are generally caused by their phenolic compounds, especially anthocyanins.

Fermented beverages, include phenolic compounds so that they have an antioxidant effect which have an important role to prevent processes such as aging, cancer, diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Despite the fact that the black mulberry has a significant amount of valuable anthocyanin content, it is very likely to have a anticarcinogenic potential impact in the development of cancer.

For this purpose, we aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effect of the black mulberry in the human breast cancer cell line. In this study, MCF7 breast cancer cell line was used, which has estrogen receptor-positive breast ER + property that exemplifies the most commonly observed breast cancer.

MCF10A normal breast epithelial cell line and PDL periodontal ligament were used as a control. On these three types of cell line, examining comparative effect of mulberry extracts on cell viability. We aimed to determine preventive / suppressive effects of mulberry in the breast cancer.

**Key Words:** Black Mulberry, Fermentation, Breast Cancer, Flavanoid, Apoptosis

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.44896

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda meme kanseri sıklığında artış gözlenmektedir. Bu nedenle biyokimya, toksikoloji, moleküler biyoloji, genetik ve epidemiyoloji gibi çeşitli disiplinlerde kanser mekanizması yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bununla beraber, kanser multifaktöriyel etiolojisinden dolayı sadece çevre, diyet, genetik ve epigenetik faktörlerle ilişkili olmayıp, aynı zamanda gen-çevre ve gen-beslenme ilişkisinin de etkili olduğu bir hastalıktır. Nitekim uzun yıllar boyunca beslenmeye dayalı yapılan araştırmalarda, besinler ve diğer diyetel bileşiklerin genler ile olan ilişkileri araştırılmış ve bu etkileşimin olası mekanizmaları ve sınıflandırılması üzerine yapılan çalışmalar teknolojik gelişmelerle hız kazanmıştır (1).

Meme kanseri, özellikle Batı ülkelerinde kadınlarda en sık görülen kanserdir (2). Meme kanseri İngiltere’de 12 kadından birinde (3), ABD’de ise 8 kadından birinde görülmektedir (4). GLOBOCAN 2008 verilerine göre ülkemizde yaklaşık yılda 12.7 milyon kanser vakası ve 7.6 milyon kanser ölümünün meydana geldiği bildirilmiştir (5).

Kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi pek çok hastalıkların engellenmesini sağlayan antioksidan maddeler, son zamanlarda fonksiyonel gıdalardaki varlıkları nedeniyle dikkat çekmiş ve bu tür gıdalarda daha çok araştırma yapılmasını sağlamışlardır (6).

Besin ve fitokimyasallar içermeleri açısından zengin olan dut ve dut gibi meyvelerin alınımının çeşitli hastalık ve rahatsızlıkları önleyebilir olması, dünya çapında meyve ve sebze tüketiminin artmasını sağlamıştır. Pek çok dut güçlü hastalıklarla savaşılan gıdalardır ve insan diyetinde tüketilen meyvelerin büyük bir porsiyonunu oluşturur (7). Çeşitli böğürtlen, ahududu ve yaban mersini kültürlerinden elde edilen meyve özleri etkili serbest radikal inhibitörleri olarak hareket ederler (8).

Dut özütleri sahip oldukları potansiyel insan sağlığı yararları için bitkisel diyet takviyesi olarak kullanılmaktadır. Pek çok laboratuvar ve hayvan çalışmaları dutların; antikanser, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri olduğunu göstermiştir (9,10). Dutların biyoaktif bileşenleri; metabolize edici enzimlerin indüksiyonu, gen ifadesinin düzenlenmesi, hücre bölünmesi, apoptoz ve hücre içi sinyal yollarının üzerindeki etkileri de dahil olmak üzere çeşitli hareket tamamlayıcı ve üst üste gelen mekanizmalar aracılığıyla anti-kanser etkisi göstermektedir (11).

Çilek ve karadut gibi bazı dut türlerinin gallik ve elajik asit gibi fenolik bileşik kaynağı olduğu ve dolayısıyla potansiyel kanser önleyici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (12). İnsan sağlığı ile ilişkili flavonoid, fenolik asit ve benzerini içeren bu fenolik bileşikler günümüzde oldukça büyük ilgi çekmektedir (13).

Bu meyveler içinde bulunan, tropikal ve yarıtropikal bir meyve türü olan dut (*Morus spp.*), Moreceae ailesinin *Morus* cinsinde yer almaktadır (14). Doğu, Batı ve Güney Doğu Asya, Güney Avrupa, Kuzey Amerika'nın güneyi, Güney Amerika'nın kuzeybatısı ve Afrika'nın bazı bölgeleri bu türün dağılım alanlarıdır. *Morus* cinsinde en yaygın olarak yetiştirilen türler; kırmızı dut (*Morus rubra*), karadut (*Morus nigra*) ve beyaz dut (*Morus alba*)'tur (15,16).

Dut çeşitlerinin antioksidan aktiviteleri çoğunlukla fenolik bileşenlerinden; özellikle de antosiyaninlerden kaynaklanır (17).

Yapılan çalışmalar; antosiyaninler ve antosiyaninlerce zengin özütler ile hücre çoğalmasının engellenmesinin, kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha belirgin olduğunu göstermiştir (18).

Fermente içeceklerin, fenolik bileşikleri içermeleri nedeniyle antioksidan etkiye sahip olmaları ile yaşlanma, kanser, diyabet, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi zararlı süreçlerin önlenmesinde önemli rol oynadıkları bildirilmektedir (19,20). Dolayısıyla önemli miktarda antosiyanin içeriğe sahip olmalarından ötürü fermente edilmiş kara dutun kanser gelişimi üzerine potansiyel antikarsinojenik etkileri olması çok muhtemeldir.

Bu amaçla çalışmamızda, *in vitro* hücre kültürü yöntemlerini kullanarak, insan meme kanseri hücre soyunda, fermente edilmiş karadutun sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemeyi hedefledik. Tez projemiz bu açıdan literatürde ilk araştırma olmuştur. Çalışmamızda kullandığımız MCF7 meme kanseri hücre soyu, en yaygın gözlenen meme kanserini örnekleyen östrojen reseptör pozitif ER+ özelliğindedir. Kontrol olarak normal meme epitel hücre soyu olan MCF10A ve periyodontal ligaman fibroblast PDL hücre soyu kullanılmıştır. Bu üç tip hücre soyunda fermente edilmiş karadut özütlerinin hücre canlılığı üzerinde karşılaştırmalı etkisi incelenerek, fermente karadutun meme kanserinde olası önleyici / baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın olan kanser tipi olup; akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı en yüksek olan ikinci kanser türüdür. GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında Dünya genelinde 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kansere bağlı mortalite tespit edilmiştir. Dünya genelinde akciğer kanserinden sonra en fazla tanı koyulan kanser türü meme kanseridir ( %11,9) (21). Meme kanseri, klinik ve moleküler açıdan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu karmaşık yapının ortaya çıkmasında yapısal heterojenite, gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ve tümörün mikroçevre ile etkileşimi rol oynamaktadır.

Tümör gelişim sürecinde, normal biyolojik fonksiyonlarda çok sayıda bozukluklar meydana gelmektedir. Proliferatif sinyalin sürekliliği bu bozukluklardan biri olup tümör hücrelerinden büyüme faktörlerinin salgılanmasında etkili olmaktadır. Bu hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörler ise, büyüme faktörleri ile etkileşime girerek fonksiyon göstermektedir. Ancak, bu reseptörlerin ekspresyon düzeylerindeki artışlar veya yapısal bozulmalar tümör hücrelerinde proliferasyonda rol oynayan sinyal yollarının kontrolsüz şekilde aktivasyonuna yol açmaktadır (22,23).

#### 2.1.1. Meme Anatomisi

Meme farklılaşmış bir ter bezidir. Memede lobül adı verilen birimler birleşerek lobları oluştururlar ve bu birimleri süt salgısını yapan hücreler meydana getirir. Meme başı, etrafında bulunan 15-20 lobdan oluşur. Lobüller süt kanalları ile birbirlerine bağlıdır. Süt kanalları meme başına doğru birleşirler. Meme başında 6-8 adet toplayıcı geniş duktus bulunmaktadır (24).

Meme kötü huylu tümörlerinin önemli bir kısmı adenokarsinomlardır. Günümüzde bu tümörlerin memenin duktal-lobüler (süt kanalları-bezleri) biriminden kaynak aldığı bilinmektedir. Lobülleri meydana getiren hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu gelişen meme kanseri süt kanallarından kaynaklanırsa duktal karsinoma adını alır. Meme kanserlerinin yaklaşık %20'si lobüllerden, %80'i ise lobüller ile meme ucunu birbirine bağlayan meme kanallarından köken almaktadır. En çok rastlanan duktal karsinoma, memenin süt kanallarında başlar. Meme kanseri memenin dışına

yayıldığında koltuk altındaki lenfatik nodüller en çok görülen yayılım yerleridir. Kanser hücrelerinin en çok yayıldığı yerler; memenin diğer lenf nodları, kemik, karaciğer ve akciğerdir (25). Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. İn situ karsinomda habis epitelyum kökenli hücreler bazal membranla çevrili iken, invaziv (infiltratif) karsinomda neoplastik hücreler bazal membranı aşarak stromaya yayılım göstermektedirler. Bu nedenle invaziv karsinomlar, lenfatik ve kan damarlarını geçerek bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme kapasitesine sahiptir (26).

Meme kanseri, morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi, tedaviye yanıtı göre farklı değerlendirilen heterojen bir hastalıktır. Bu farklılığın başlıca sebebi, kanser hücrelerindeki genetik farklılıktır (27).

### **2.1.2. Meme Kanserinin Tanımı ve Önemi**

Memede lobülleri ve kanalları oluşturan hücrelerin, kontrol dışı çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine yayılım yaparak çoğalmaya devam etmelerine meme kanseri denir.

Sık görülmesi, sıklığının giderek artması, erken evrelerde tedavi edilebilir olması ve günümüz koşullarında tanınmasının olanaklı olması meme kanserinin önemini artırmaktadır. (28,29)

Meme kanseri erken tespit edildiğinde tedavi edilebilir bir hastalıktır. Meme kanserleri için 5 yıllık sağ kalım %98 iken, metastatik vakalarda bu oran %27'dir (30). 50 yaşından önce kemoterapi alan kadınlarda 15 yıllık sağ kalım %10 iken, 50 yaşından sonra bu oran %3 olarak belirlenmiştir (31).

Günümüzde meme kanserinin tedavi yöntemleri başta cerrahi olmak üzere, hormon tedavileri, kemoterapiler, radyoterapi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere beş grupta toplanır (32). Henüz meme kanserini kesin önleyen bir yöntem mevcut değildir. Ancak kemoterapötik tedavilere ek olarak uygulanabilecek alternatif tedaviler hem kemoterapötik tedavinin zararlı etkisini en aza indirmek amacıyla hem de tedavi seçeneklerinin artması açısından önemli olacaktır.

### **2.1.3. Meme Kanseri Epidemiyolojisi**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türlerinin başında gelmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde, kadınlarda görülen tüm kanserlerin %29'unu, kansere

bağlı mortalitenin %14'ünü, meme kanseri oluşturmaktadır (33). Meme kanseri insidansı yıllara bağlı olarak özellikle gelişmiş ülkelerde artış göstermekle birlikte, meme kanserine bağlı mortalite oranlarında düşüş eğilimi görülmektedir (34). Meme kanseri insidansı, coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir. Türkiye'nin de dahil olduğu pek çok ülkede meme kanseri insidansı, düşük-orta yaş gurubunda dramatik bir şekilde artmaktadır. 2007 yılı verilerine göre ülkemizde meme kanseri insidansı 44,253 olarak belirlenmiş olup, batı bölgelerinde, doğu bölgelerine göre 2 kat fazla görülmektedir. Ülkemizde, 40 yaşın altındaki kadınlarda görülme oranı %20'dir (35).

Meme kanseri, multifaktoriyel bir hastalıktır. Çevresel ve genetik faktörler, beslenme düzeni, yaş, üreme faktörleri ve hormonal durum gibi pek çok faktör meme kanseri gelişiminde etkili olabilmektedir. Yaş ilerledikçe meme kanseri insidansı artmaktadır (36). Meme kanseri ailesel geçiş özelliği gösterir. Aile geçmişinde meme kanseri vakası olan kadınların hastalığa yakalanma riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir (37). İleri yaşta anne olmak, geç menopoz, menstürel siklus düzeni gibi çok sayıda faktör meme dokusunda DNA hasarının artışına yol açarak kanser gelişim riskini arttırabilmektedir (38,39).

## 2.2. Dutlar ve Özellikleri

Dut bitkisi, Urticales takımının *Morus* cinsine dahildir. Dünyanın ılıman iklim bölgelerinde *Morus* cinsinin 100 kadar türü tanımlanmıştır. Bu türlerden yaygın olarak 10 – 12 türün yetiştiği kabul edilmekle beraber, en çok rastlanan türler, *Morus alba* (Beyaz dut), *Morus nigra* (Kara dut) ve *Morus rubra* (Mor dut)' dir (40). *Morus alba*'nın anavatanı Çin, *Morus nigra*'nın anavatanı İran ve Kafkaslar, *Morus rubra*'nın anavatanı ise Kuzey Amerika'dır (41). Meyvesinden yararlandığımız dutlar, bu üç tür içerisinde yer almaktadır (42,43).

Dut'un gerek bitkisi gerek meyvesi değişik alanlarda kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Yaprağı ipekböceği besini olarak kullanılmakta ve ülkemiz ekonomisine önemli katkılar sağlamaktadır. Bundan dolayıdır ki sadece yaprağı için yetiştirilen birçok dut türü bulunmaktadır. Meyvesi, taze ve kuru tüketildiği gibi pekmez, reçel, pestil, sirke, ispiro da yapılmaktadır (44).

Dutun kök ve gövde kabuklarının, pek çok hastalığın tedavisinde, Kara dut şurubunun ise ağız ve boğaz hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (45).

### 2.2.1. Türkiye’de Dut

Türkiye’de en çok rastlanan kara dut, beyaz dut ve mor dut türleri değişik bölgelerde farklı amaçlarla yetiştirilmektedir. Bunlar içinde en yaygın olan beyaz dut, yapraklarının ipek böceği beslenmesinde kullanılmasından dolayı özellikle ipek üretimi yapılan yerlerde daha yoğun şekilde yetiştirilmektedir. Ağaç sayısı itibariyle beyaz dut’u sırasıyla kara dut ve mor dut takip etmektedir (46).

### 2.2.2. Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırılmaları

Besin ve fitokimyasallar içermeleri açısından zengin olan dut ve dut gibi meyvelerin alınımının çeşitli hastalık ve rahatsızlıkları önleyebilir olması dünya çapında meyve sebze tüketiminin artmasını sağlamıştır. Pek çok dut güçlü hastalıklarla savaşan gıdalardır ve insan diyetinde tüketilen meyvelerin büyük bir porsiyonunu oluşturur (47). Bu meyveler sadece taze ve donmuş olarak tüketilmemekle birlikte aynı zamanda işlenmiş ürünleri olarak ta tüketilmektedir. Çeşitli böğürtlen, ahududu ve yaban mersini kültürlerinden elde edilen meyve özleri etkili serbest radikal inhibitörleri olarak hareket ederler (48).

Yüksek seviyelerdeki polifenoller, antioksidanlar, vitaminler ve minerallerin varlığı dutları yüksek sağlık yararları sahibi yapmaktadır (49). Polifenoller; hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler, antosiyaninler, proantosiyanidinler, flavonlar, flavanoller, izoflavonlar gibi çeşitli sınıflara ayrılırlar. Dut genomundaki varyasyonların bu biyoaktif bileşenlerin konsantrasyonu üzerinde etkili olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır (50).

Dut özütleri insan sağlığı üzerindeki potansiyel yararları nedeniyle bitkisel diyet takviyesi olarak kullanılmaktadır. Pek çok laboratuvar ve hayvan çalışmaları dutların; antikanser, antioksidan ve antiproliferatif özellikleri olduğunu göstermiştir (51,52). Dutların biyoaktif bileşenleri; metabolize edici enzimlerin indüksiyonu, gen ekspresyonunun modülasyonu ve hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre içi sinyal yollarının üzerindeki etkileri de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla anti-kanser etkisi göstermektedir (53).

Çilek ve karadut gibi bazı dut türlerinin gallik ve elajik asit gibi fenolik bileşik kaynağı olduğu ve dolayısıyla potansiyel kanser kimyasal önleyici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (54). İnsan sağlığı ile ilişkili flavonoid, fenolik asit ve diğer

aktif bileşenlerini içeren bu fenolik bileşikler günümüzde oldukça büyük ilgi çekmektedir (55).

Dutların içerikleri arasında fitokimyasallar, esansiyel mineraller, vitaminler ve yağ asitleri yer almaktadır. Dutlar; provitaminA, mineraller, vitamin C ve B-kompleks vitaminleri açısından oldukça önemli bir kaynaktır. Dut meyveleri yaklaşık %15 oranında çözülebilen katılar (çoğunlukla şeker) içerir.

Dut fenoller bitki büyüme, gelişme ve savunma rolleri de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik fonksiyonlara hizmet vermektedir. Bu fenoller pigmentasyon, antimikrobiyal ve antifungal etki, böcek-besleme caydırıcılık, ultraviyole radyasyondan korunma, zehirli ağır metallerin şelatlanması ve fotosentez esnasında oluşan serbest radikallerin antioksidan etkileri ortadan kaldırılmasında görev alırlar (56,57).

### **2.2.3. Biyoaktif Bileşenleri**

#### **2.2.3.1. Vitaminler**

Dutlar vitamin A, C ve E ile kompleks B vitaminlerini ihtiva eder. Bu vitaminler bağışıklık sistemini güçlendirmeye ve inflamasyonu azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca kalp hastalığı, diyabet ve yaygın kanserler gibi kronik hastalıklara yol açan oksidatif stresin etkilerini uzaklaştırmaya yardımcı antioksidanlar olarak kabul edilirler (58,59).

Dutlar canlı sistemlerde bir çok role sahip suda çözünebilen bir bileşik olan askorbik asidin çok önemli bir kaynağıdır. Taze meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunur. Dut meyvelerinin C vitamini içerikleri; tür, çeşitlilik, iklim, hava koşulları, bölge, olgunluk ve depolama süresi gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir (60).

#### **2.2.3.2. Mineraller**

Dutlar makro ve mikro besin kaynakları açısından oldukça zengindir. Dutlarda en çok fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, mangan, bakır, sodyum ve alüminyum mineralleri bulunur. Dutlar demir, kalsiyum, fosfor ve sodyum mineralleri içermeleri bakımından diğer meyveli bitkiler arasında lider konumdadır (61). Bu mineraller insanlarda; su ve elektrolit denge, metabolik kataliz, oksijen bağlanma, hormon fonksiyonları, kemik ve membran düzenlenmesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde önemli rol oynar (62).

### 2.2.3.3. Antosiyaninler

Antosiyaninler doğada yaygın olarak bulunurlar ve flavonoidlerin alt grubudur. Yaban mersini, karadut, böğürtlen, çilek, lahana ve ıspanak gibi meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunur. Antosiyaninler kırmızı, mavi ve mor pigmentli dutlarda bulunan ve güçlü antioksidan olarak davranan renkli pigmentlerdir. Taze meyvelerle birlikte, dut ürünlerinden meyve suyu, şarap ve reçel de antosiyanin kaynaklarıdır (63). Antosiyaninlerin yüksek antioksidan etkileri çok sayıda hastalık üzerinde olumlu etkilerinin sebebidir (64).

### 2.2.3.4. Sağlık Yararları

Yapılan araştırmalar dutların sağlıklı bir diyetin önemli bir parçası olduğunu ispatlamaktadır. Dutlardaki çeşitli fitokimyasalların antioksidan oldukları ve serbest radikallerin kronik hastalıklar ve yaşlanmaya neden olan zarar verici etkilerine karşı vücudu çeşitli hastalıklara karşı korumaya yardımcı oldukları düşünülmektedir. Dutlar pek çok doğal antioksidanın; flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C ve E nin kaynağıdır. Yüksek tanin içeriği ve antiseptik özelliği dutların minor kanamaların tedavisinde etkili olmalarını sağlar. Dutların antioksidanca zengin olması, serbest radikallerle vücudun savunmasına ve çeşitli tipte kanserden kaçınmaya yardımcı olur. Antosiyaninler dut fenolikleri içerisinde en çok çalışılmış olan maddelerdir (52,54). Antosiyaninlerin; antioksidan, antikanser ve anti-inflamatuvar özellikleri de dahil çok geniş bir biyoaktivite aralıkları vardır.

Dut fenolikleri en çok antioksidan olarak davranışlarıyla tanınır. Fakat in vivo çalışmalar dut fitokimyasallarının antioksidan dışında pek çok özellikleri olduğunu göstermiştir. Ayrıca dut fitokimyasallarının; nükleer reseptörlerin ve metabolizma enzimlerin aktivitelerinin, gen ekspresyonunun, hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde ve DNA oksidatif hasarının tamiri gibi çok sayıda hücrel fonksiyonda etkili olduklarına dair kanıtlar artmaktadır (65,66).

### 2.2.3.5. Antioksidan Özellikleri

Flavonoidler ve diğer fenoliklerden olan fitokimyasallar serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı hücreleri korumaya yardım eden antioksidan aktiviteleri olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda sağlık yararlarından ötürü dutların tüketiminde artış olmuştur. Antioksidanların serbest radikallerin hasar verici etkisine ve yaşlanma süreci ile ilişkili kronik hastalıklara karşı vücudu korumaya yardım ettikleri

düşünülmektedir. Dutlarında yer aldığı taze meyveler ve sebzeler antosiyanin, vitamin C ve E gibi doğal antioksidanları içererek, düşük yoğunluklu lipopolisakkarit (LDL) oksidayonunu inhibe eder ve antioksidan aktiviteyi arttıırırlar (67).

#### **2.2.3.6. Antikanser Özellikleri**

Çok sayıda in vitro çalışmalarda tümörojenik sürecinin farklı evrelerinde çeşitli dut özütlerinin antikarsinojenik etki gösterdiği kanıtlamıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebze içeren fitokimyasal zengin diyet tüketiminin bazı insan kanserlerinin gelişim riskini azaltıcı yönde etkisine işaret etmektedir (68).

Çok sayıda deneysel ve hayvan çalışmaları dutların anti-kanser özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (69). Dutlar antosiyaninlere ek olarak aynı zamanda, flavonol, fenolik asitler, ellajik asit, vitamin C ve E, folik asit ve B-sitosterol gibi diğer koruyucu etkili fitokimyasallarca da zengin doğal bir kaynaktır (70).

#### **2.2.3.7. Antimutajenik Özellikleri**

Dut özütlerinden çeşitli kimyasallar izole edilmiş ve bu özütlerde kanser hücre metabolizmasını bloke eden, kültürde kanser hücrelerini öldüren, serbest radikalleri inaktive eden, antiöstrojenik aktiviteyi arttırıp mutajenezi inhibe eden antimutajenik aktivite olduğu bildirilmiştir (71,72). Dut ve dutsu meyvelerin antikarsinojenik ve anti inflamatuvar etkileri oldukça iyi çalışılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarından çeşitli bitki özütlerinin kanser hücre hatlarının çoğalmasını engellediği ve pek çok bitki bileşiklerinden, özellikle kara duttan elde edilenlerin, saf formda oldukça yüksek antiproliferatif etki gösterdikleri bildirilmiştir (73,74).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter Vi Cell XR), Laminar akımlı kabin, CO<sub>2</sub> Inkübatör (Thermo electro corporation), Işık mikroskobu (Olympus CKX41), Floresan faz-kontrast invert mikroskop, Amaxa Nucleofactor transfection cihazı, Dijital Kamera CCD peltier Santrifüj (Hettich, rotina 38), Vorteks, Isıtıcı banyo, Sıvı azot tankı 2 adet (10lt./37lt), Buzdolabı (Beko), Spektrometre (Thermo Multiskan SPECTRUM), Akan hücre ölçer (BD FACSCalibur)

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Biochrome), Mammary Epithelial Cell Growth Medium (MEGM) ve Bullet kit (Lonza), One Stromal Cell Medium BulletKit™ (Lonza), Fetal Bovine Serum (Biochrome), Trypsin / EDTA % 0,25 (Gibco), Accutase Enzyme Cell Detachment Medium (EBiosciences), Trypsin Neutralizing Solution (Lonza), Trypsin/EDTA Solution (Lonza), HEPES Buffered Saline Solution (Lonza), Penisilin/Streptomisin (Gibco), Vi-Cell Reagents (Beckman Coulter), Dimetil sülfoksit (Sigma), FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD), Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche), PBS (Gibco)

#### 3.3. Deneyde Kullanılan Çözeltiler

##### 3.3.1. Mediumun Hazırlanması

MCF7 hücre hattı için DMEM Medium ticari olarak satın alındı. İçerisine %10 FBS, %1 pencilin streptomycin, %1 L-Glutamin eklendi. Hazırlanan medium 0.22 µm' lik filtreden süzülerek kullanıma uygun hale getirildi.

MCF10A hücre hattı için Bullet Kit ticari olarak satın alındı. İçerisine %10 FBS, 500 µl EGF, 500 µl insulin, 500 µl hidrokortizon, 2ml BPE, %1 pencilin streptomycin, %1 L-Glutamin ve 500 µl GA eklendi. Hazırlanan medium 0.22 µm' lik filtreden süzülerek kullanıma uygun hale getirildi.

PDL hücre hattı için Bullet Kit satın alındı. İçerisine 500 µl hFGF-B, 500 µl Insulin, 25 ml FBS, 500 µl GA-1000 eklendi. Hazırlanan medium 0.22 µm' lik filtreden süzülerek kullanıma uygun hale getirildi.

### 3.3.2. Hücre Dondurma Mediumunun Hazırlanması

Dondurma mediumu için gerekli olan, %45 FBS, %45 Medium ve %10 DMSO falkon tüpüne içerisinde hazırlandı.

### 3.3.3. %70'lik ve %60'lık EtOH Hazırlanması

70 ml saf etanole 30 ml steril deiyonize su eklenerek %70'lik EtOH ve 60ml saf etanole 40 ml steril deiyonize su eklenerek %60'lık EtOH hazırlandı.

### 3.3.4. PBS Hazırlanması

Her bir PBS tabletine 100 ml steril deiyonize su eklenecek şekilde 500ml PBS solüsyonu hazırlandı.

### 3.3.5. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Mayalanmış dut sularının her biri %60'lık EtOH ile çözülerek son konsantrasyon 2 µg / µl olacak şekilde ayarlandı. Çözeltiler +4 °C de saklandı.

## 3.4. Dutların Temini

Çalışmamıza konu olan farklı kültürlere ait *Morus nigra* meyvelerinden 14 Kenan, G008 ve 6 İçme örnekleri Malatya'dan temin edilmiştir. Çalışmamızda karşılaştırma için kullanılan *Morus alba* meyvelerinin taze örnekleri olan Yaşar 28 ve 11-24-12 de Malatya'dan temin edilmiştir. Örneklerin teşhisi Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Menemen, İzmir) tarafından yapılmıştır.

## 3.5. *Morus Nigra* ve *Morus Alba* Meyvelerinin Ekstraksiyonu ve Meyve Sularının Elde Edilmesi

Dut meyvelerinin ekstraksiyonu ve meyve sularının elde edilmesi İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı işbirliğince gerçekleştirildi.

Hasat zamanında taze olarak toplanan ve soğuk zincir ile gönderilen örnekler ekstraksiyon işlemine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon öncesi dutlar oda ısısına alınarak çözünmeleri beklenmiş çözülen dutlar homojenizatör ile 3000 g'de homojenize hale getirilmiş ve 3 kat gazlı bezden süzülmüştür. Süzüntü 15000g'de 10dk (+4°C) santrifüj edilmiş ve toplanan supernatant Büchner hunisinden MACHEREY-NAGEL Ø125mm filtre kağıdı kullanılarak süzülüş ve dut suları elde edilmiştir.

### 3.6. Dut Sularının Mayalanması

Dut sularının fermantasyonu İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı işbirliğince gerçekleştirildi.

Meyve sularının şeker giderimi fermentasyon işlemiyle sağlanmıştır. Fermantasyona ihtiyaç duyulma nedeni, hücrelerin glikozsuz ortamda davranışlarının incelenmesi ve dut suları içerisinde sadece sahip oldukları fenolik maddelerin etkilerinin gözlemlenmesidir.

Meyve suyu örnekleri, 2 litrelik Erlen şişeleri içine yaklaşık 500 ml sıvı hacmi olacak şekilde aktarılmıştır. Bunun üzerine daha önceden ön kültürü yapılmış *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri son Optik Yoğunluk değeri (OD<sub>600</sub>) 0,1 olacak şekilde eklenmiştir. Örnekler 30 C° 150 devir/dakika çalkalama hızıyla orbital çalkalayıcıda 24 ile 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca alınacak kültür örneklerinin glukoz tayini, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

### 3.7. Fermente Dut Sularının HPLC ile Analizi

Bu analiz, meyve suları içerisindeki şeker bileşikleri ve alkol miktarını belirlemek için yapılmıştır. Şeker bileşiklerinin maya tarafından tamamen tüketildiği anda fermantasyon işleminin sonlandırılması için saat başı kontrollü olarak tekrar edilmiştir.

1,5 ml numuneler flasklara alınır ve 5dk boyunca 10000g'de santrifüj edilirler. Süpernatantlar 0,2 µm filter kullanılarak filtrelendi. Etanol, asetat ve gliserolün üretim glikozun da tüketim oranlarını belirlemek için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz edildi.

HPLC sistemi; bir sistem kontrolörü, sıvı kromatografi sistemi, kırılma endeksi dedektörü, otomatik enjektör ve kolon fırınından oluşmaktadır. Metabolitlerin HPLC analizi, numunelerden 10 µl enjeksiyon ile 0,6 ml / dk akış oranında 60 °C'de Aminex HPX-87H kolonunda gerçekleştirilmiştir. 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi mobil faz / yıkama sıvısı olarak analiz ölçümlerinde kullanılmıştır. Bu metabolitlerin altı standart solüsyonları hazırlanmış ve standart bir eğri elde edebilmek için tek tek okutulmuştur. Glikoz, etanol ve gliserol konsantrasyonu; elde edilen altı standart solüsyonun verileri ile her örnekten elde edilen verilerin karşılaştırılması ile hesaplandı (75).

		Glikoz g/L	Etanol g/L	Gliserol g/L
<b>Yaşar 28</b>	t=0	75,9	4,43	0,58
	t=son	1,1	97,10	5,96
<b>G-içme</b>	t=0	49,3	2,88	0,63
	t=son	1,0	58,25	3,76
<b>Kenan</b>	t=0	51,3	3,95	0,22
	t=son	0,6	47,09	3,22
<b>11-24-12</b>	t=0	79,4	4,42	1,05
	t=son	1,4	96,27	5,43
<b>G - 008</b>	t=0	51,5	3,00	0,71
	t=son	1,4	50,31	2,38

### 3-1:Dut Suları HPLC Analizi

### 3.8. Fermente Meyve Sularının Mayadan Kurtarılması ve Liyofilizasyonu

Dut sularının mayadan kurtarılması ve liyofilizasyonu İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı işbirliğince gerçekleştirildi.

Fermente edilen meyve suları 15000 g'de 10 dk (+4°C ) santrifüj edilmiş ve toplanan supernatant 0.22 µm'lik filtreden süzülmüştür. Bu şekilde mayadan kurtarılan fermente meyve suları -80°C'de dondurulmuş ve -55°C'de kontrollü liyofilizasyonları gerçekleştirilerek kuru toz halde ekstraler elde edilmiştir.

### 3.9. Hücre Kültürü

#### 3.9.1. Hücrelerin Temini

MCF-7 ve MCF10A hücre soyları ATCC (Amerikan Type Culture Collection) firmasından PDL hücre soyu ise Lonza firmasından temin edilmiştir. Bu hücre soyları orjinal protokolüne uygun şekilde in vitro ortamda steril koşullar sağlanarak ısı siklusu bozulmadan çözülüp uygun besiyeri eklendikten sonra kültür kabı ortamına ekilecektir. Literatürdeki protokole uygun şekilde hücreler çoğaltılarak pasaj işlemi yapılacaktır.

MCF-7 hücre hattı östrojen reseptörü pozitif adenokarsinoma tipindeki epitelyal hücredir. MCF-10A hücre hattı fibrokistik tipteki epitelyal hücredir. PDL hücreleri normal insan periyodontal ligaman fibroblast hücreleridir.

### 3.9.2. Hücre Kültür Ortamı

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin in vitro ortamda yaşayıp, çoğalabilmeleri için suni ortamlar ve gerekli besiyeri maddeleri sağlanmalıdır. Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir (76). Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Çalışmamızda besiyeri ortamı olarak MCF-7, MCF10A ve PDL hücrelerinin medyumları sırasıyla DMEM ve Bullet Kit kullanıldı.

Hücreler hazırlanan besiyeri ortamında %5 CO<sub>2</sub> 'li inkübatörde, 37 °C'de ve %95 nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirilerek hücrelerin gelişimi konfluent olana kadar izlendi.

### 3.9.3. Hücrelerin Çözülmesi

-196 °C sıvı azot tankında bulunan hücreler oda ısısında bekletilerek hücrelerin çözülmesi sağlandı. Dondurma medyumunda bulunan DMSO'nun hücrelere olan negatif etkisini azaltmak için hücreler kendi medyumunda çözüldü ve 5dk 12000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek temiz medyumda çözülen hücreler 25 cm<sup>2</sup> alanlı flasklara ekilerek inkübatör içerisine konuldu.

### 3.9.4. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent olduğunda hücrelerin pasajlanması gerekir. Öncelikle flask içerisindeki medyum ortamdaki uzaklaştırılır. Medyum artıklarından flaskı iyice temizlemek için flask içerisi soğuk PBS ile yıkanır ve hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için tripsin kullanılır. Her 25 cm<sup>2</sup> 'lik flask için 2 ml tripsin eklenir. Tripsin aktivasyonu sıcaklıkla arttığı için flasklar 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. Uzun süre tripsin muamelesi hücrelere zarar vermeye başlayacağı için hücrelerin kalktığı görüldüğünde tripsin miktarının iki katı medyum eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlanır.

Hücreler falkonlara toplanıp sayılırlar ve daha sonra 15000 rpm'de 5dk santrifüj edilirler. Süpernatant atılır ve temiz medyumda çözülen hücreler flasklar içerisine ekilir. Hücreler inkübatöre kaldırılır.

### **3.9.5. Hücrelerin Sayımı**

Flask yüzeyinden ayırdığımız hücreler falkonda toplandıktan sonra Vi-Cell Cell Viability Analyzer cihazında sayım yapılmak üzere falkon içerisinden 100 µl cihaza ait küvetler içerisine konulur. 400 µl hücreye ait medyum küvet içine eklenir ve cihaz sayım işlemi için çalıştırılır. Cihazın verdiği canlı hücre sayısı dilüsyon faktörü olan 5 ve falkonda bulunan toplam ml medyum ile çarpılarak elde edilen hücre sayımı gerçekleştirilir. Yeterli miktarda hücre olması durumunda WST-1 deneyi için gerekli olan hücreler ayrılır, kalan hücreler dondurulur ve pasajlanır.

### **3.9.6. Hücrelerin Dondurulması**

Hücre sayımından sonra her Cryo vial dondurma tüplerine 1 ml medyumda çözülmüş  $3 \times 10^6$  hücre ile önceden hazırlanmış dondurma medyumundan 1 ml konulur. Tüpler öncelikle Mr. Frosty içinde 24 saat  $-20^{\circ}\text{C}$  bekletilir, ikinci 24 saat diliminde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilir ve üçüncü gün tüpler  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot tankına aktarılarak kademeli olarak dondurulur.

### **3.9.7. Hücrelerin Plakalara Ekimi**

Önceden sayılmış ve medyumu ile dilüsyonu yapılmış olan hücreler 96 kuyucuklu plakalar içerisine her kuyucukta 10.000 hücre 100 µl içerisinde olacak şekilde ekilirler. Ekilen bu hücreler plaka yüzeyine 24 saat içerisinde yapışırlar ve ertesi gün hücreler belirlenen dozlar doğrultusunda dozlanırlar. Plakalar inkübatöre kaldırılırlar.

### **3.9.8. Hücrelerin Dozlanması**

96 kuyucuklu plaka içerisine ekilen hücreler ertesi gün mikroskopta kontrol edilirler. Yapışmış olan hücreler üzerinden medyumları çekilir ve üzerilerine önceden çözülmüş fermente morus nigra meyvesi suyu uygun dozlarda kuyucuklar üzerlerine eklenir. Plakalar inkübatöre kaldırılırlar.

### 3.9.9. Hücelere WST-1 Hücre Canlılık Testinin Uygulanması

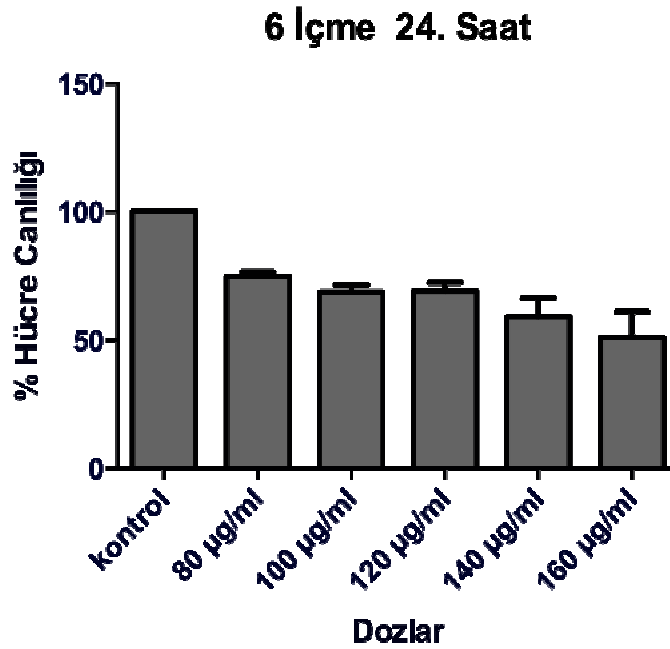
WST-1 deneyi ile tetrazolyum tuzları hücrede bulunan mitokondriyal solunum zinciri enzimlerinden biri olan süksinat tetrazolyum redüktaz enzimi tarafından formazana çevrilmektedir. Bu enzim sadece canlı hücrelerde çalışmaktadır. Bu şekilde hücre sayısındaki bir artış, formazan oluşumunu da arttırmakta ve kültürdeki hücre sayısı ile direk bir korelasyona sahip olmaktadır.

Bütün liyofilize edilmiş fermente dut suları çözelti olarak hazırlanmış, 80 µg/ml ile 160 µg/ml konsantrasyonları arasında hücre hatlarına dozlanmıştır. Sonrasında 24., 48. ve 72. saat WST-1 hücre canlılık testi ölçümü yapılmıştır. 80 µg/ml dozu öncesi hücre canlılığı azalmasında düşük etki yarattığından ve 160 µg/ml sonrası hücelere sitotoksik etkiye sebep olduğundan hücelere uygun doz olarak 80 µg/ml ile 160 µg/ml aralığı seçilmiştir.

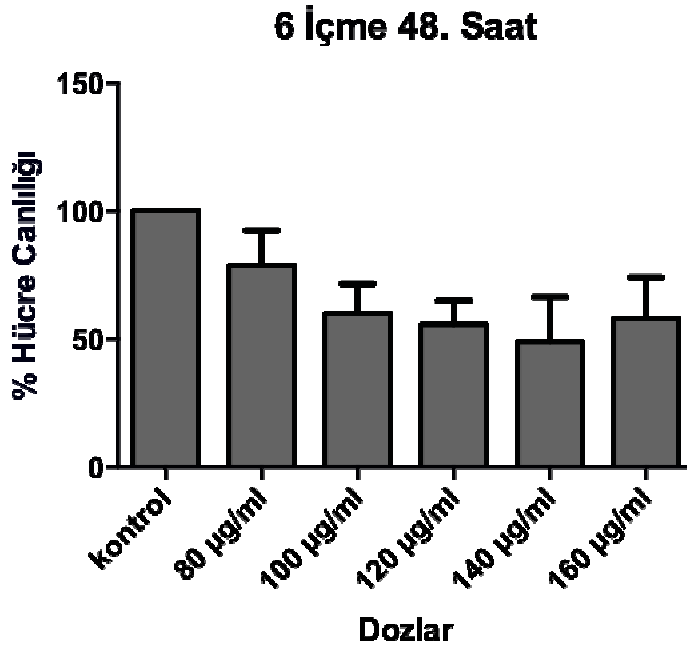
WST-1 ışiksiz ortamda kuyu başına 10 ul olacak şekilde uygulanır ve inkübatörde bekletilir. 2 ile 4 saat arasında 450nm ve 620nm de spektrofotometre cihazında ölçüm yapılır.

#### 3.9.9.1. 6-İçme Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

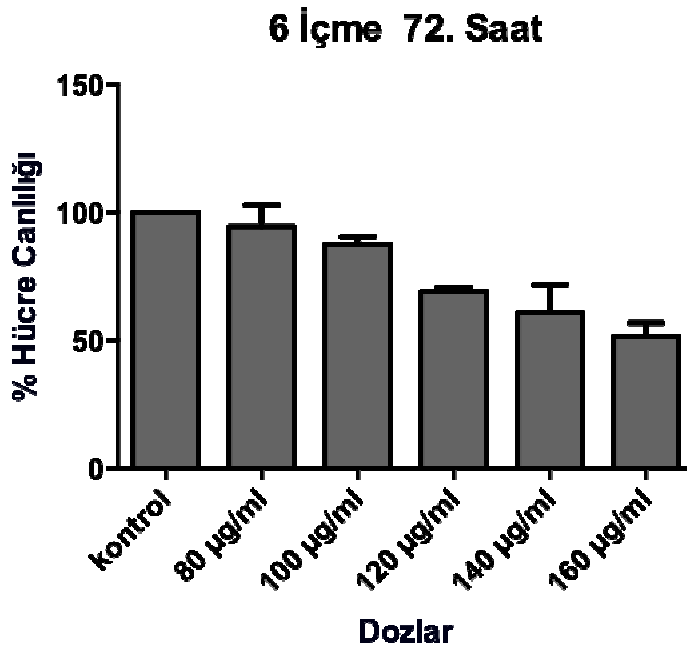
#### 3.9.9.2. MCF-7 Hücre Hattı



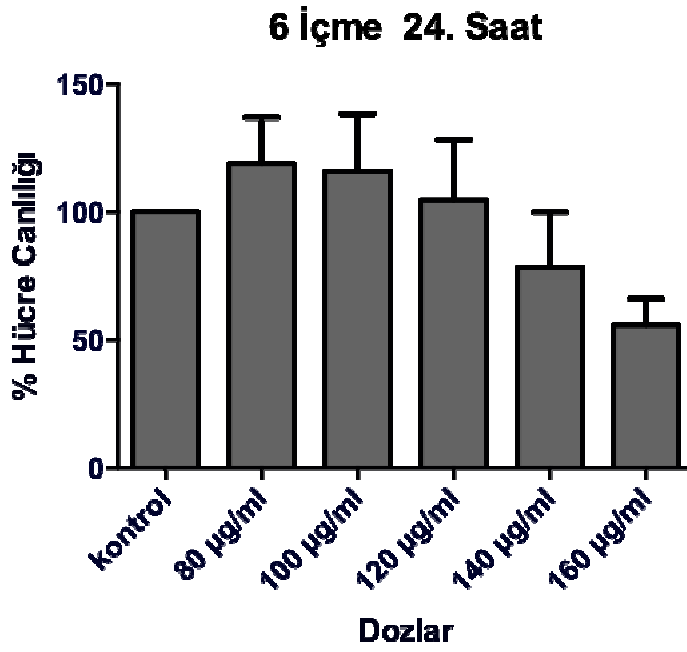
3-1:MCF-7 Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



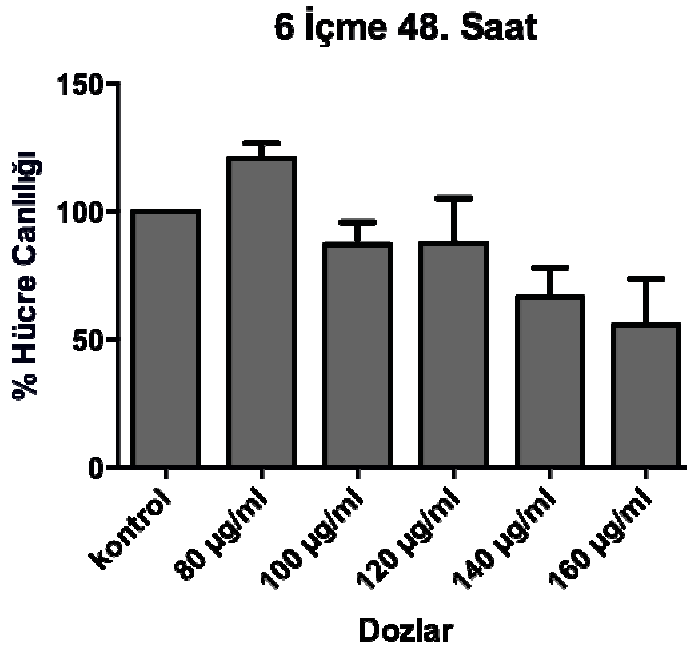
3-2:MCF-7 Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



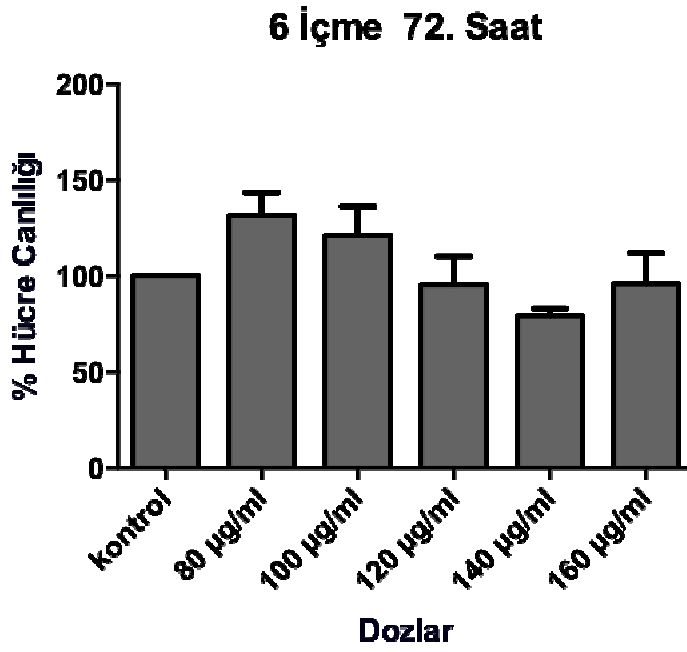
3-3:MCF-7 Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



3-4:MCF-10A Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

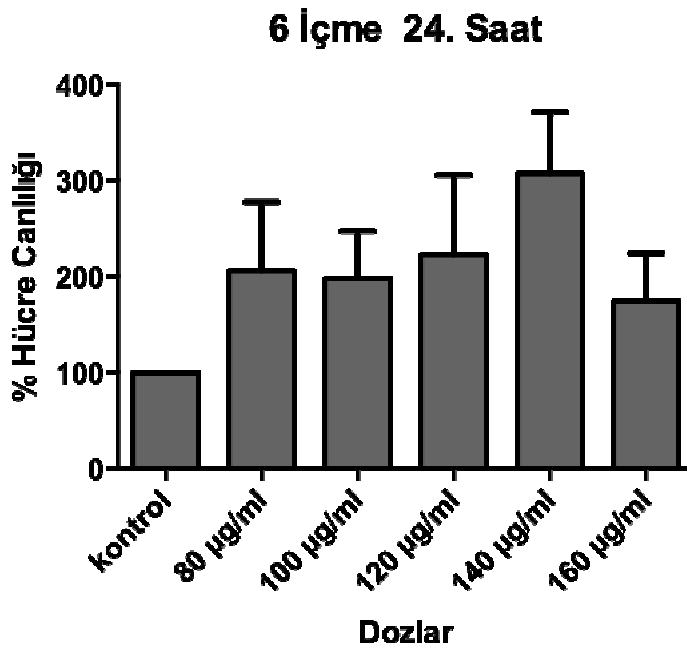


3-5:MCF-10A Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

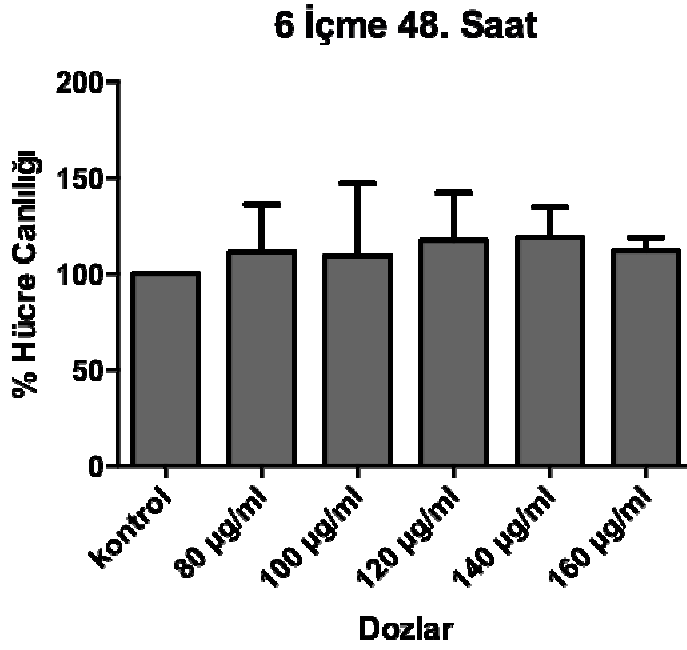


3-6:MCF-10A Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

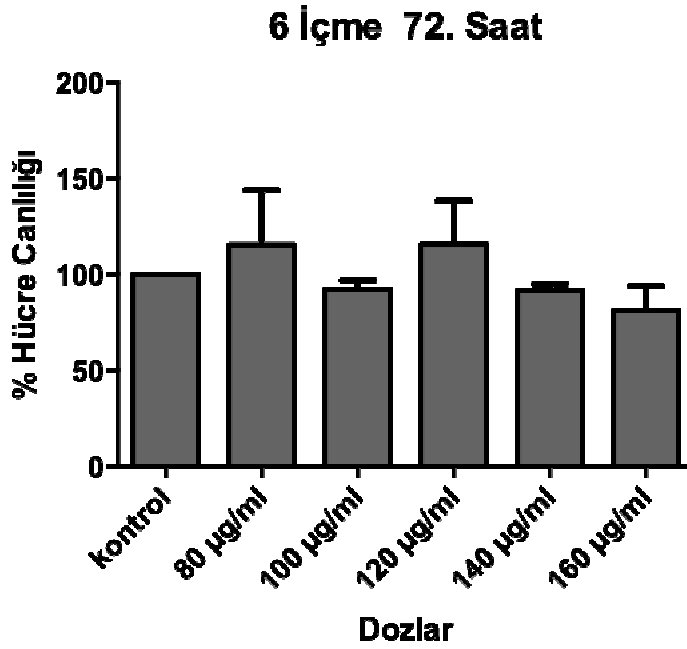
### 3.9.9.3. PDL Hcre Hattı



3-7:PDL Hcre Hattında 6 - İme Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



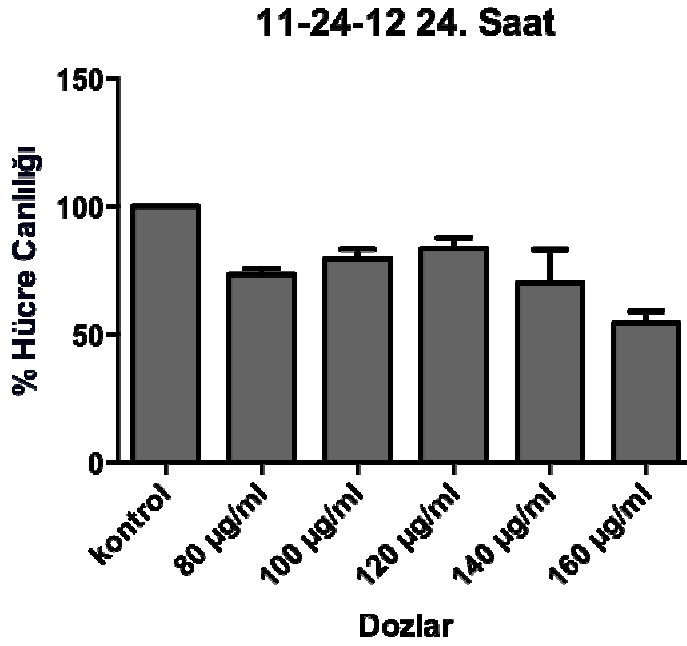
3-8:PDL Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



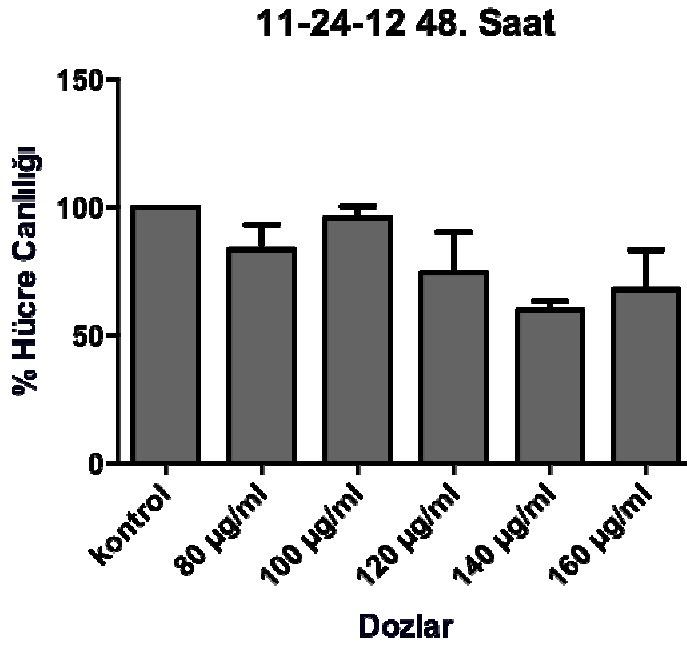
3-9:PDL Hücre Hattında 6 - İçme Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.10. 11-24-12 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

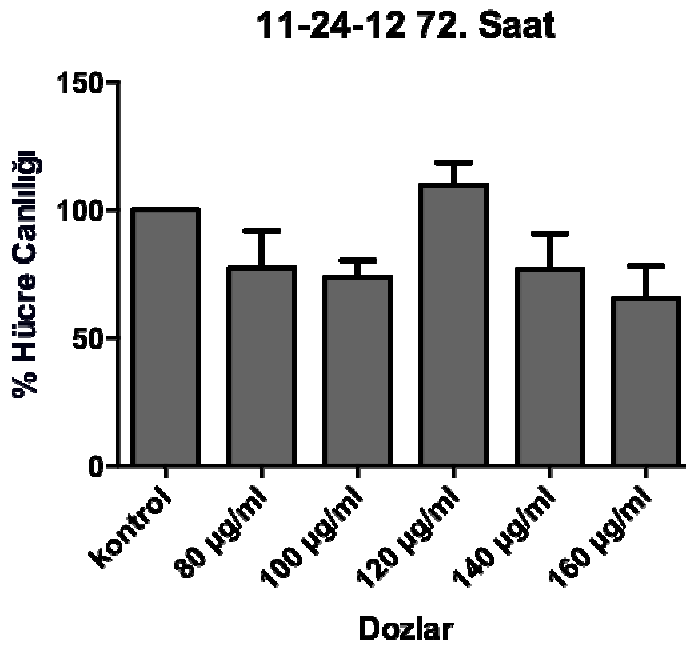
#### 3.9.10.1. MCF-7 Hücre Hattı



3-10: MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutununun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

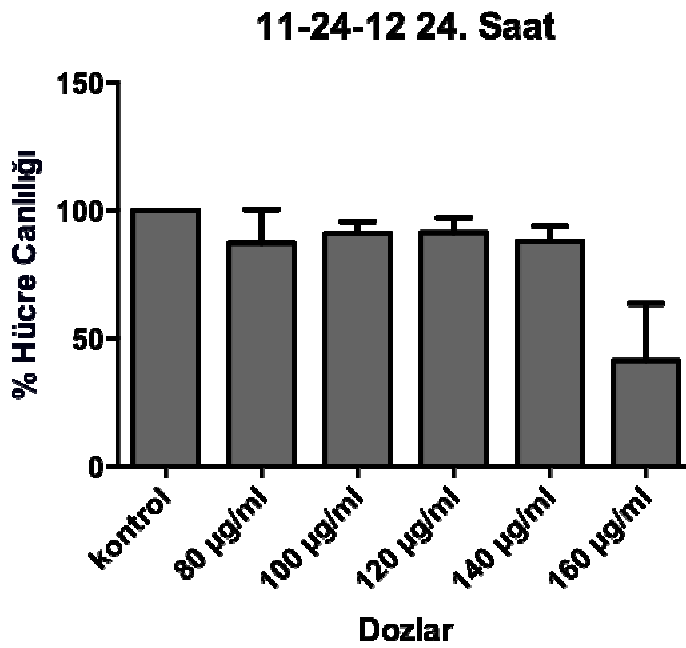


3-11: MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutununun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

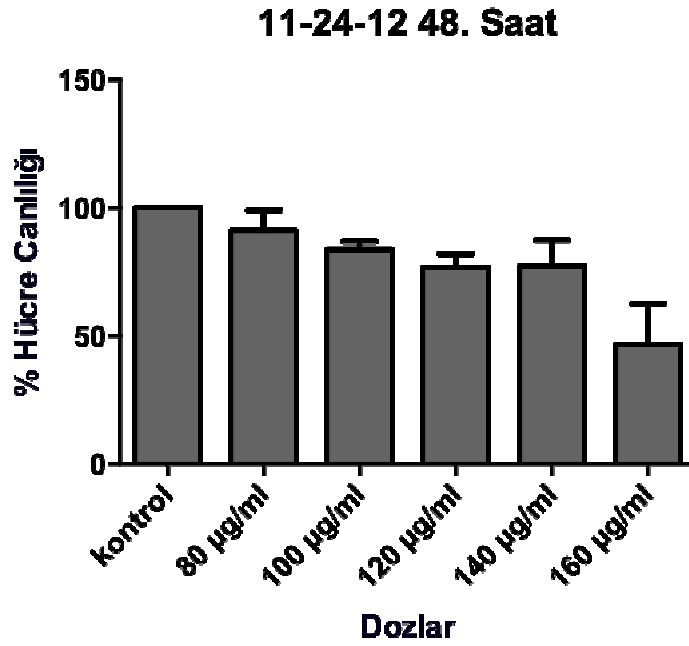


3-12:MCF-7 Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

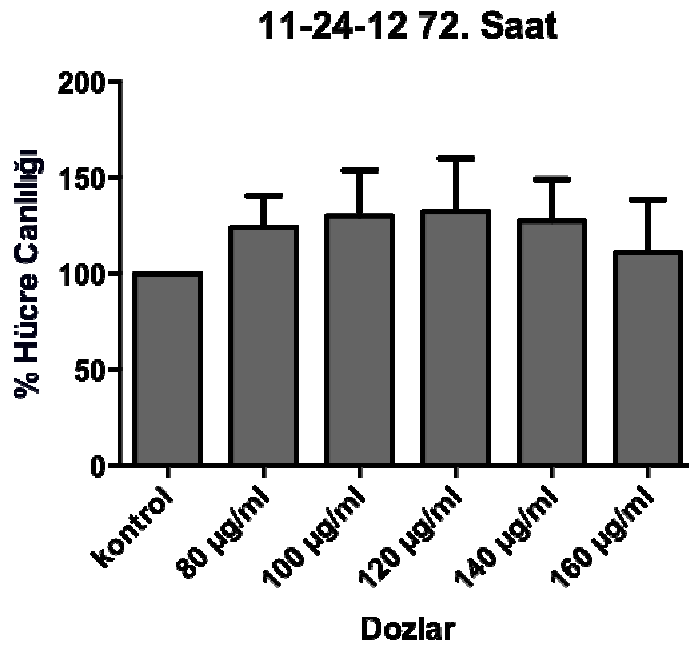
### 3.9.10.2. MCF-10A Hücre Hattı



3-13:MCF-10A Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

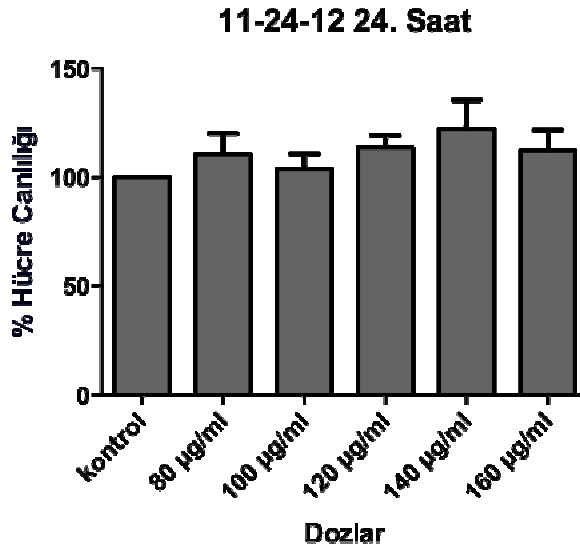


3-14: MCF-10A Hücresel Hattında 11-24-12 Dütununun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

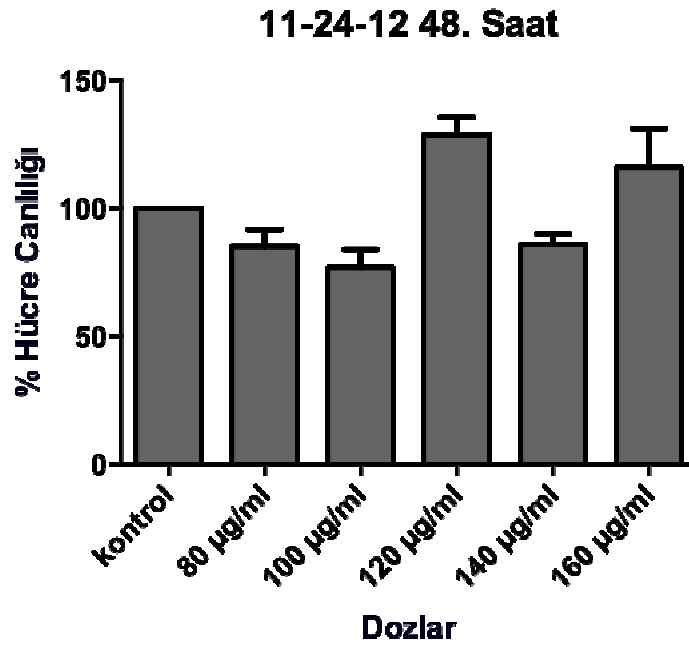


3-15: MCF-10A Hücresel Hattında 11-24-12 Dütununun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

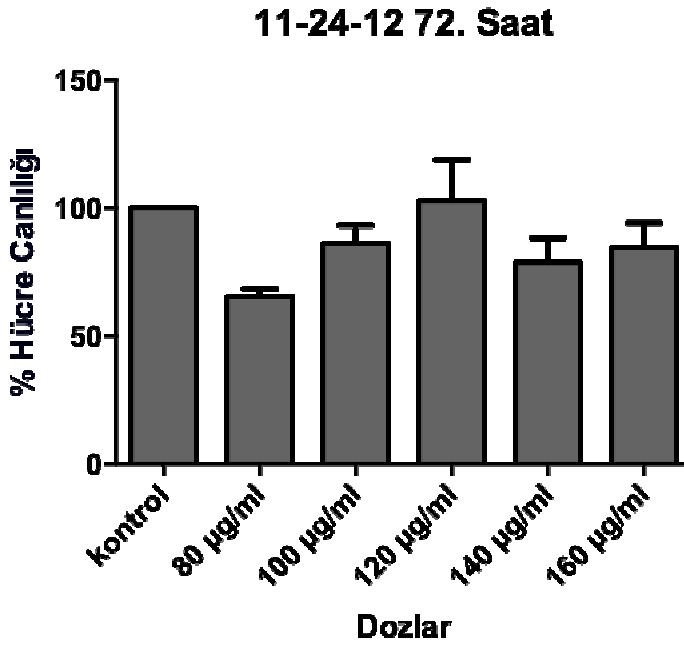
### 3.9.10.3. PDL Hücre Hattı



3-16:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



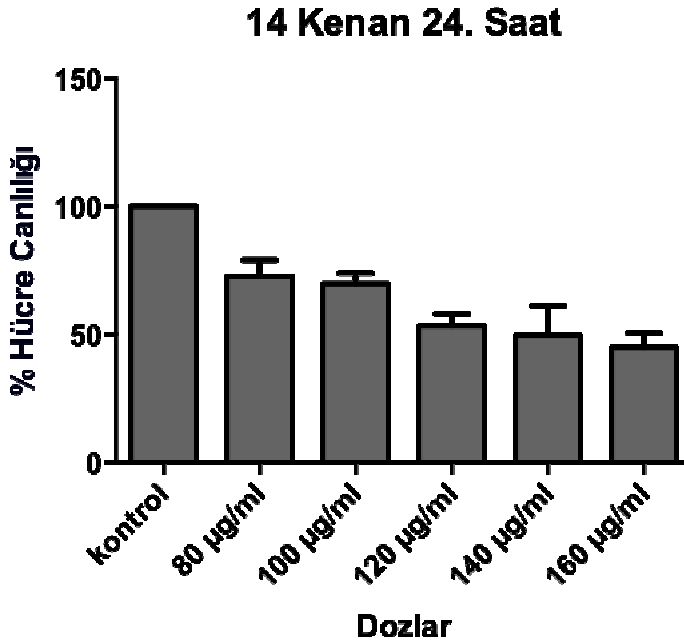
3-17:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



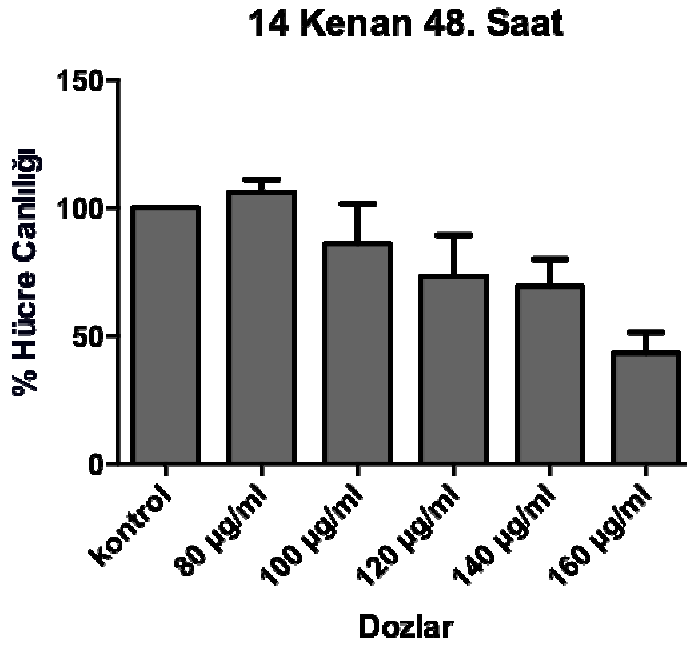
3-18:PDL Hücre Hattında 11-24-12 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.11. 14 - Kenan Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

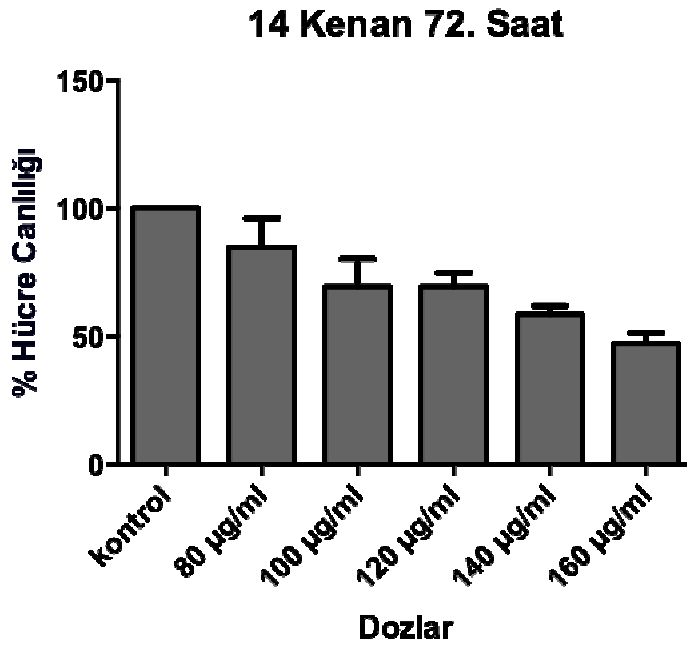
#### 3.9.11.1. MCF-7 Hücre Hattı



3-19:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



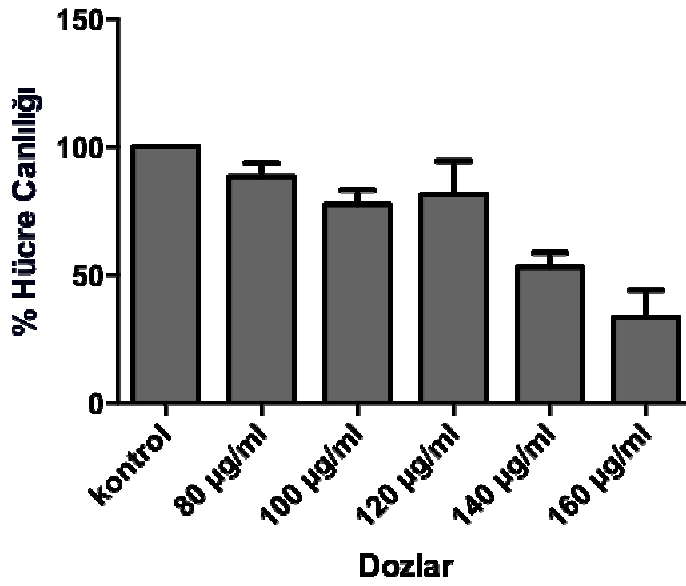
3-20:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



3-21:MCF-7 Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

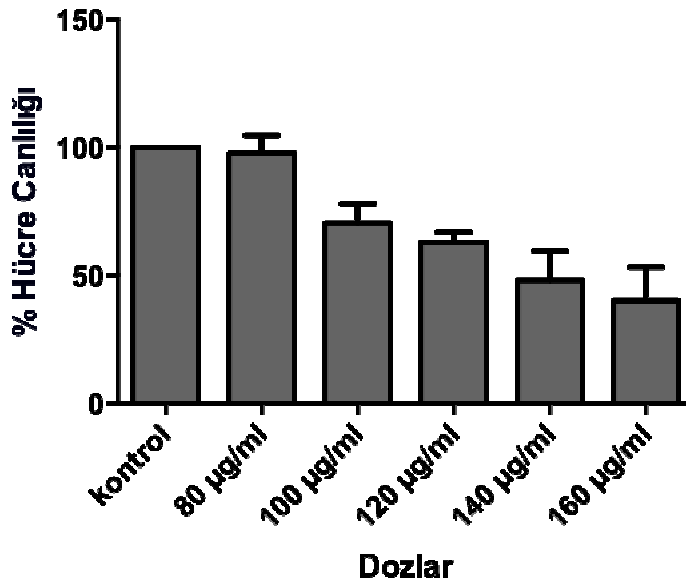
### 3.9.11.2. MCF-10A Hücree Hattı

#### 14 Kenan 24. Saat

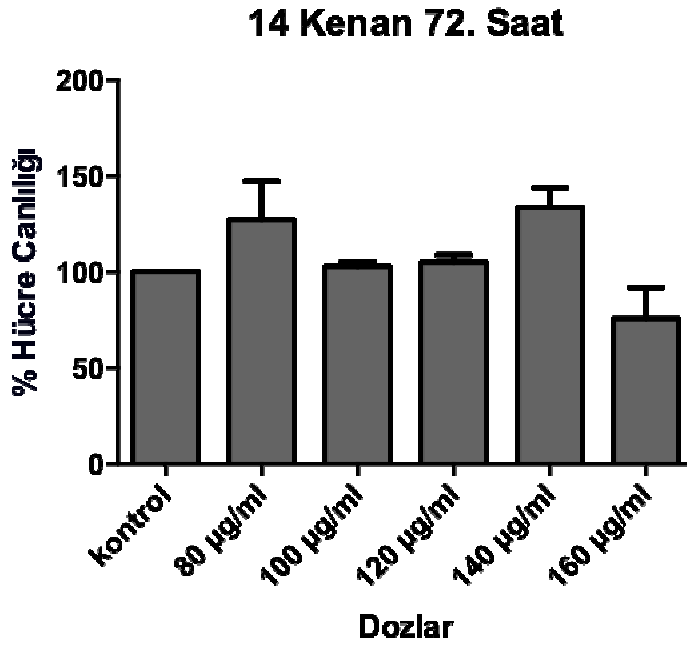


3-22: MCF-10A Hücree Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

#### 14 Kenan 48. Saat

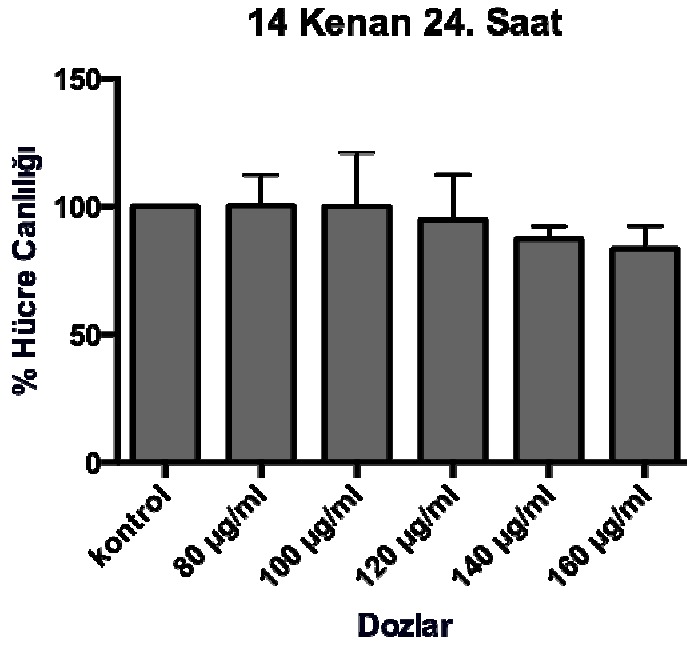


3-23: MCF-10A Hücree Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



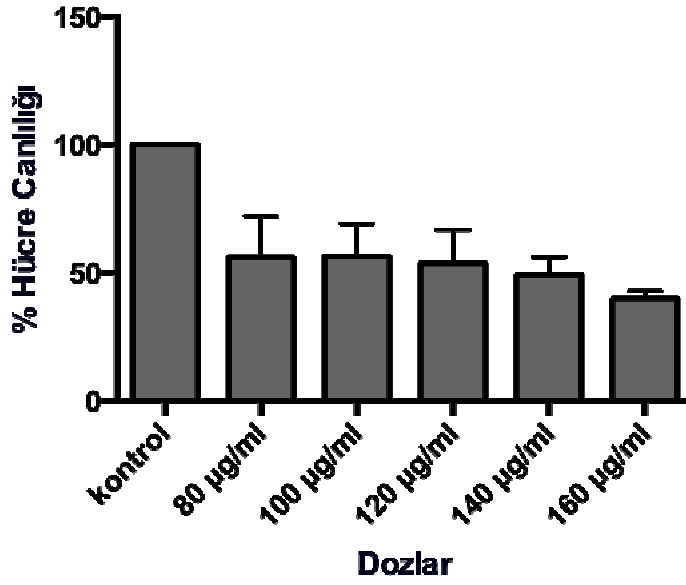
3-24:MCF-10A Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.11.3. PDL Hücre Hattı



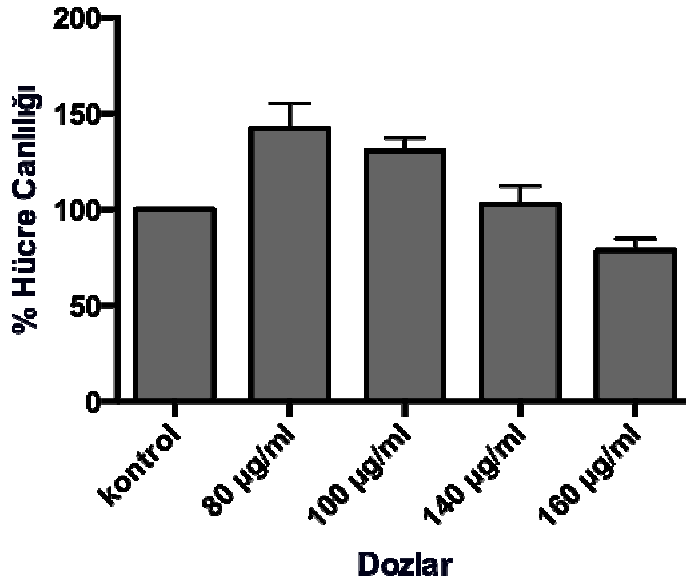
3-25:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 14 Kenan 48. Saat



3-26:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

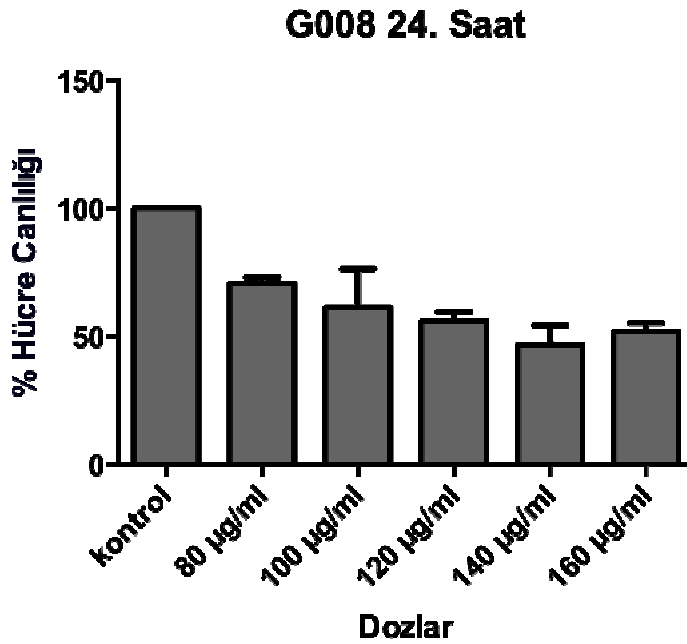
### 14 Kenan 72. Saat



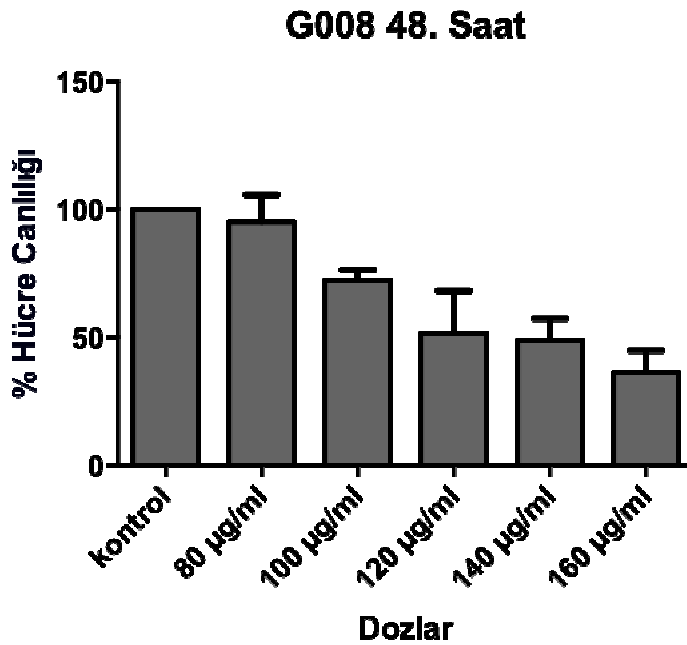
3-27:PDL Hücre Hattında 14 - Kenan Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.12. G008 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

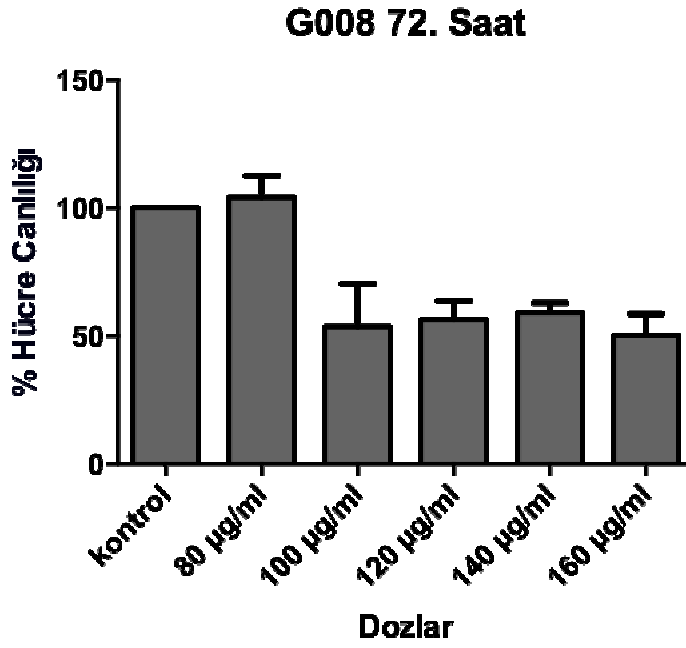
#### 3.9.12.1. MCF-7 Hücre Hattı



3-28: MCF-7 Hücre Hattında G008 Dutununun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

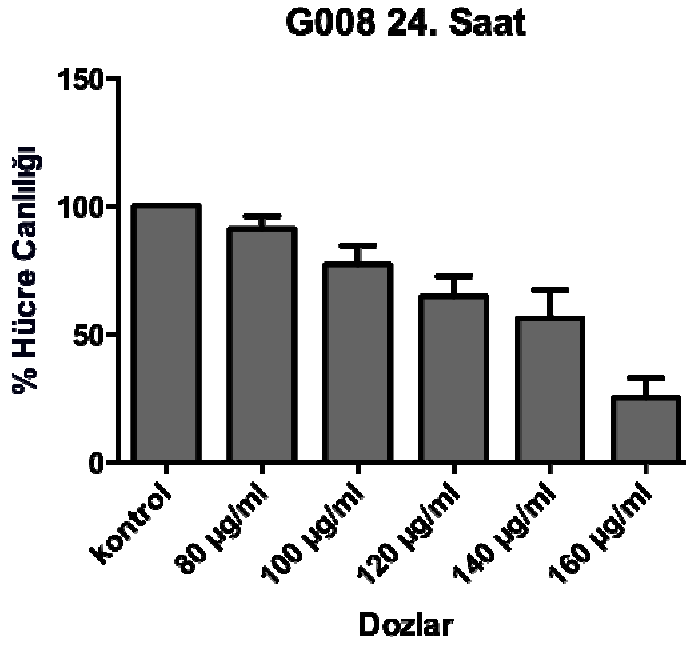


3-29: MCF-7 Hücre Hattında G008 Dutununun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

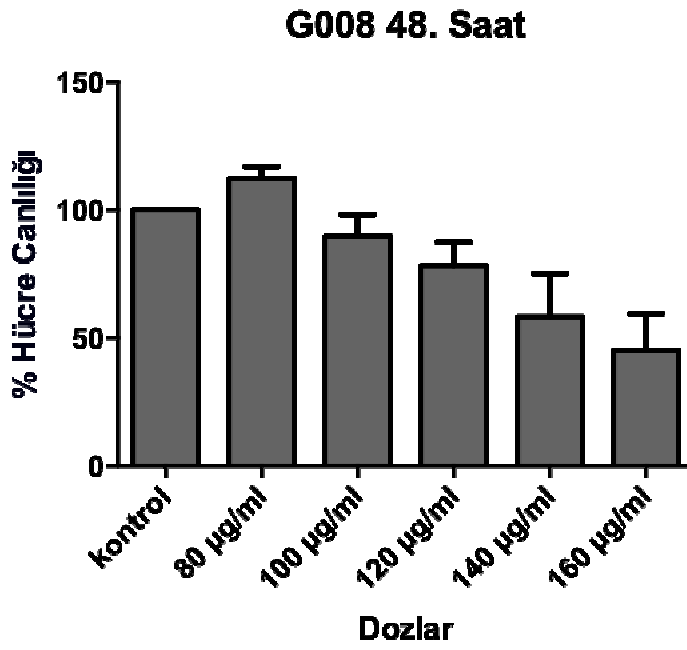


3-30:MCF-7 Hücre Hattında G008 Dütununun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

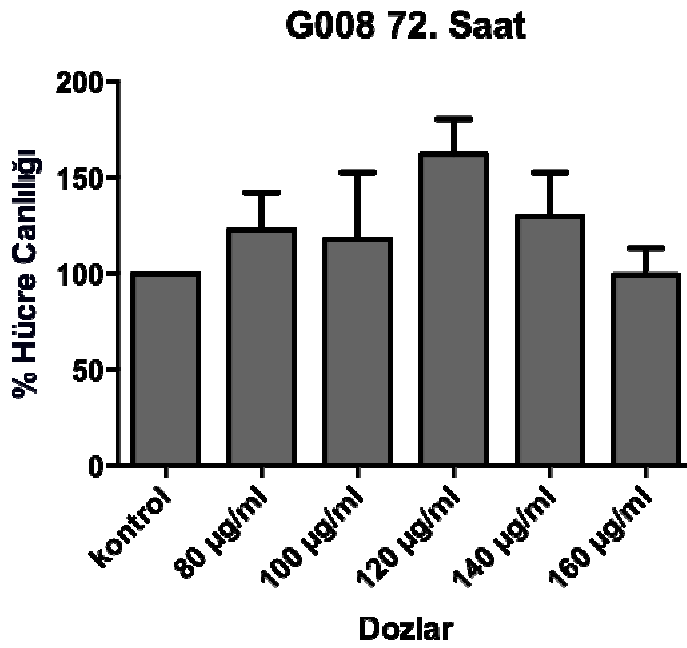
### 3.9.12.2. MCF-10A Hücre Hattı



3-31:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dütununun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

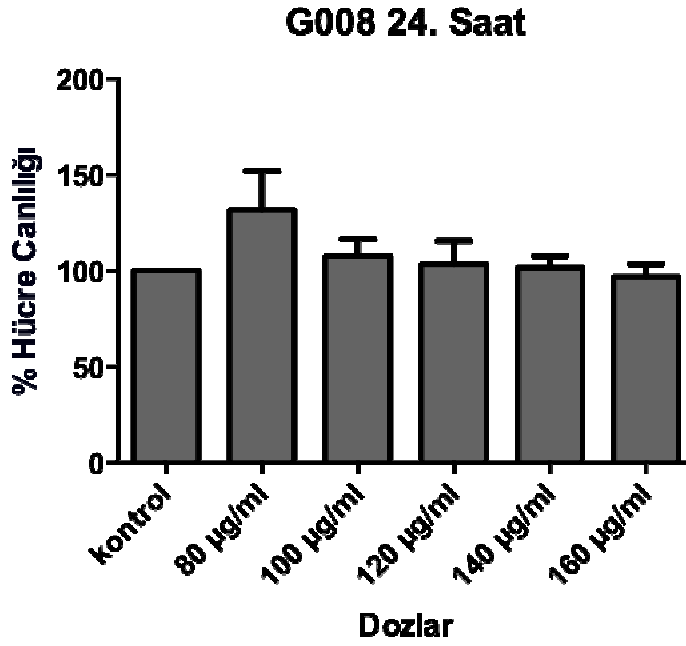


3-32:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

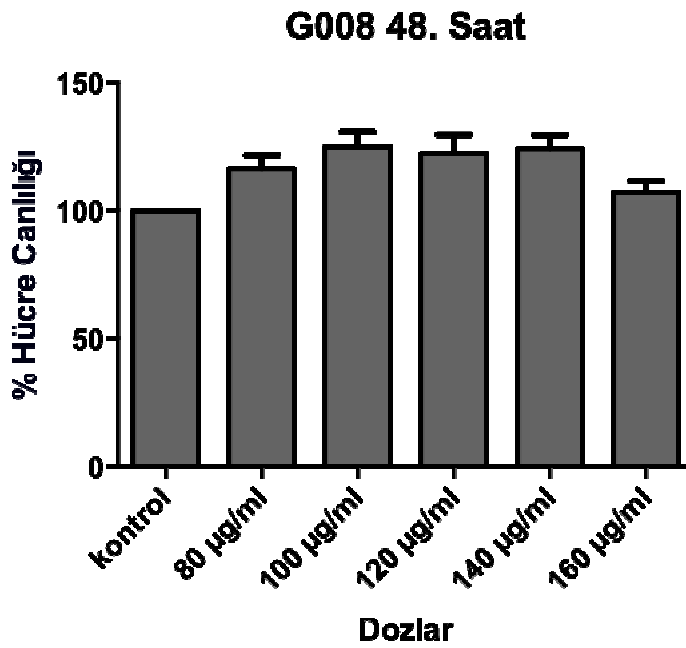


3-33:MCF-10A Hücre Hattında G008 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

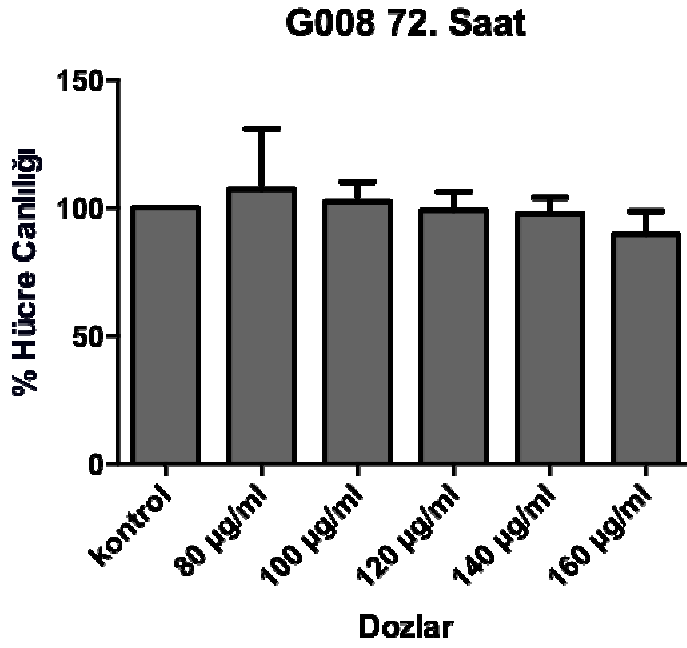
## 3.9.12.3. PDL Hücre Hattı



3-34:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



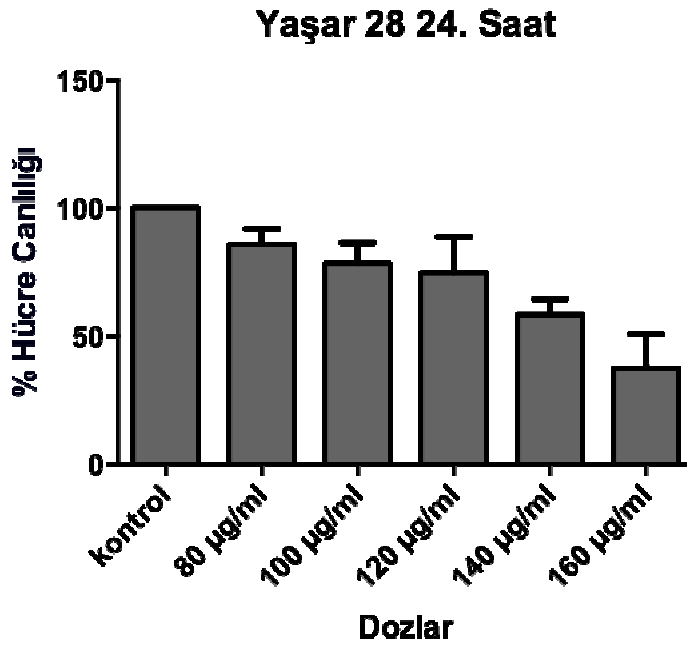
3-35:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



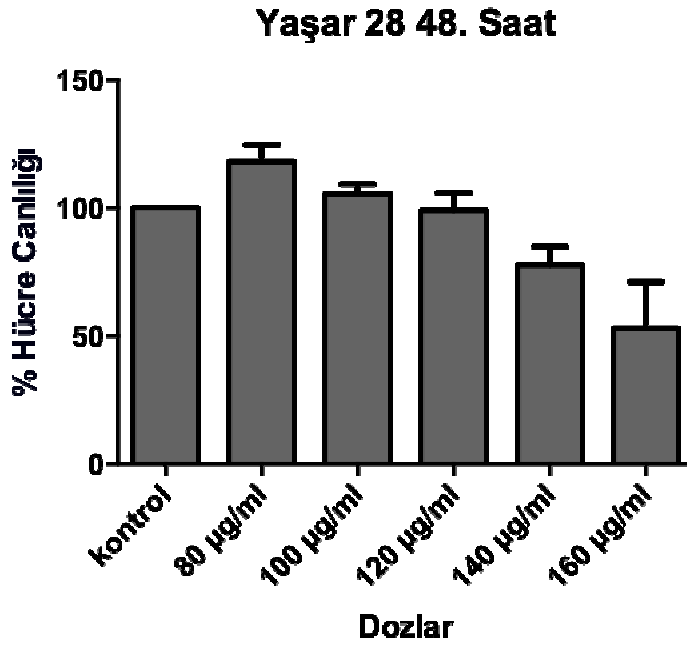
3-36:PDL Hücre Hattında G008 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.13. Yaşar - 28 Dutu Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

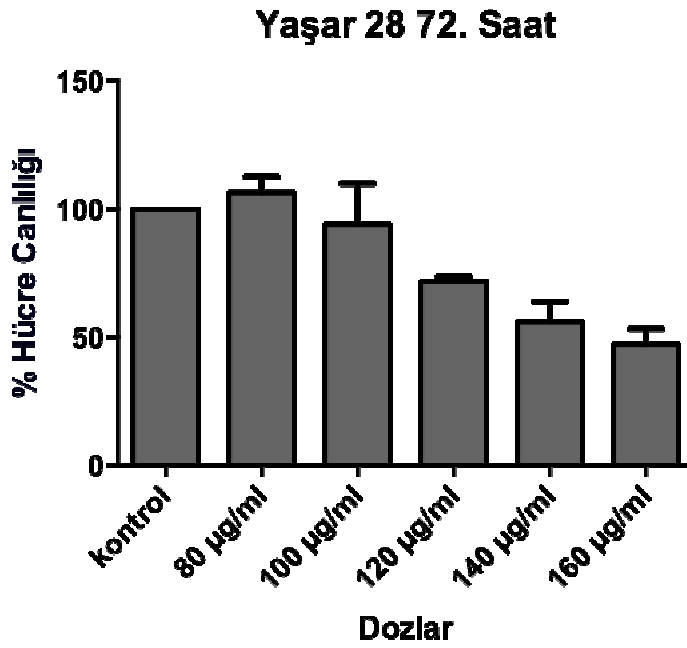
#### 3.9.13.1. MCF-7 Hücre Hattı



3-37:MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

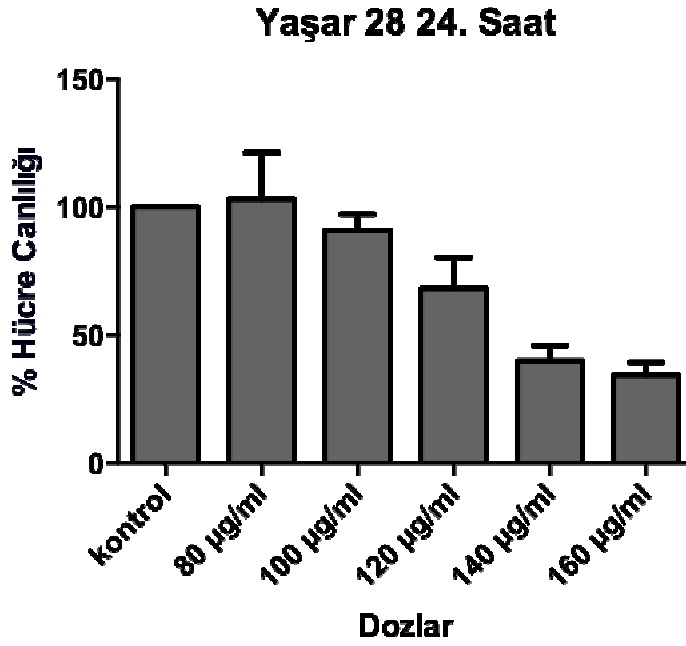


3-38: MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dütununun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

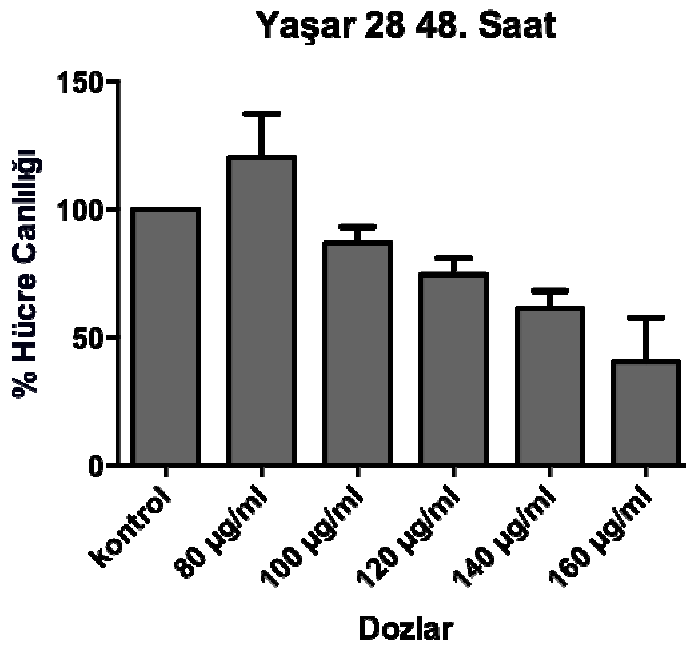


3-39: MCF-7 Hücre Hattında Yaşar - 28 Dütununun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

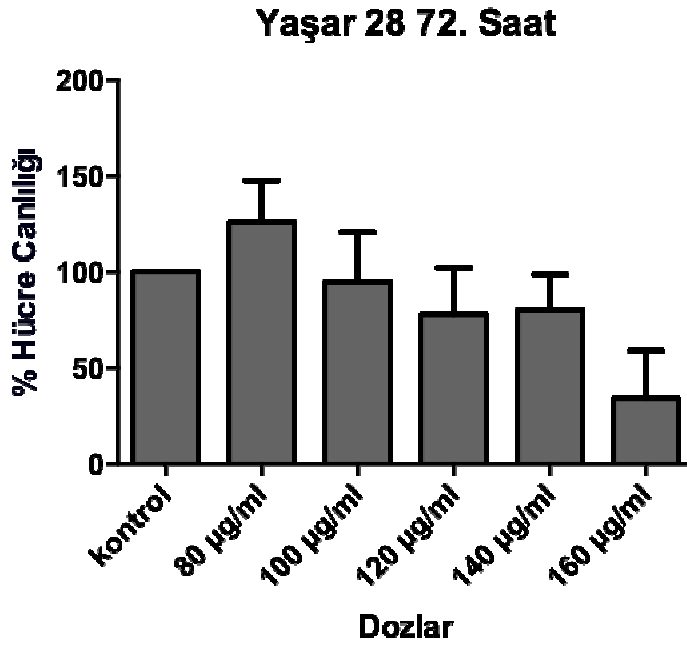
### 3.9.13.2. MCF-10A Hücre Hattı



3-40: MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

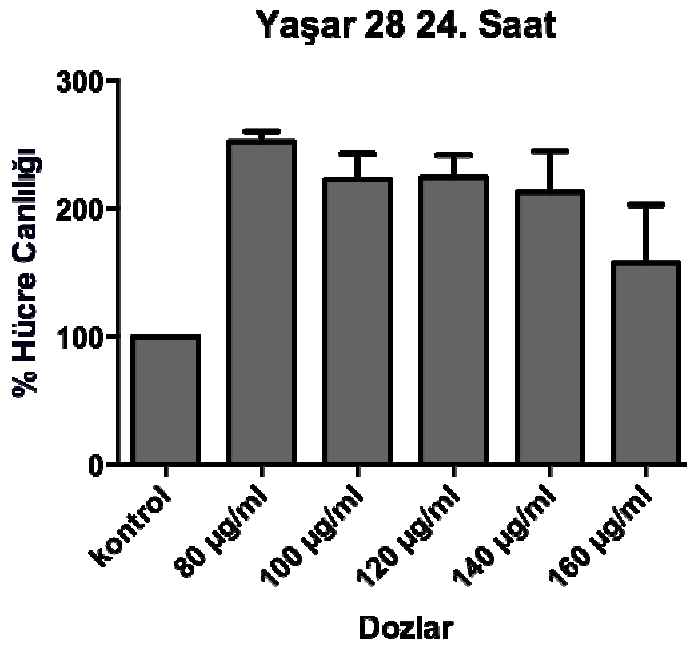


3-41: MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

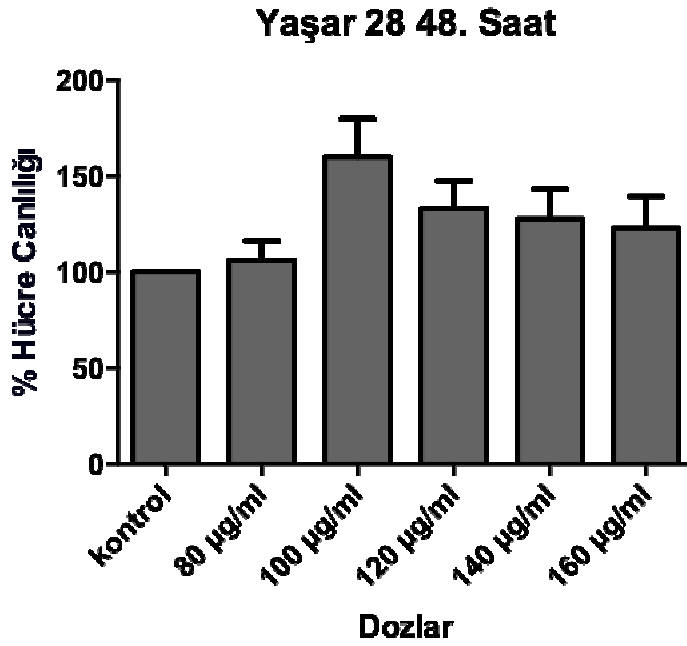


3-42:MCF-10A Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

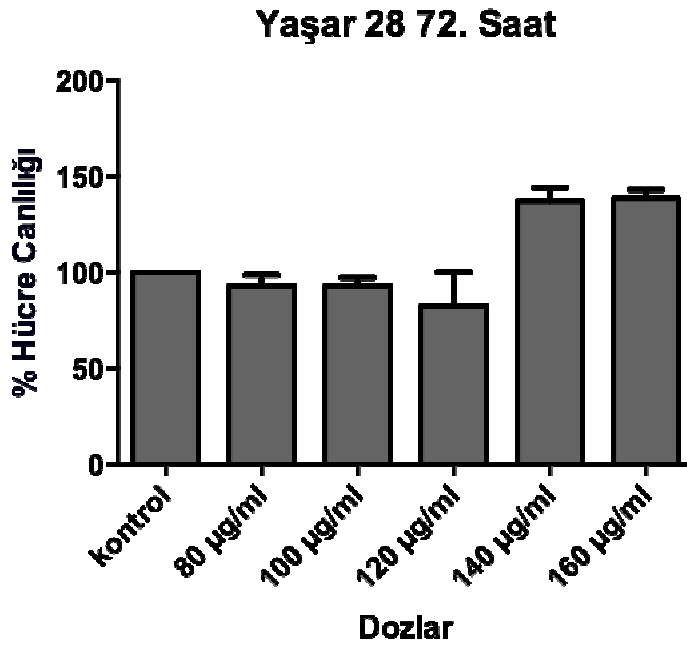
### 3.9.13.3. PDL Hücre Hattı



3-43:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 24. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



3-44:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 48. Saatteki Doza Bağlı Etkisi



3-45:PDL Hücre Hattında Yaşar - 28 Dutunun 72. Saatteki Doza Bağlı Etkisi

### 3.9.14. Hücrelere Annexin V – PI Boyama ile Apoptoz Tayinin Yapılması

Hücrelere fermente dut ekstraktlarının uygulanmasını takiben hücrelerin apoptotik sürece girişini analiz için Annexin V ve PI boyama tekniği kullanılmıştır.

Membran fosfolipidlerinden biri olan fosfatidilserin, hücrenin plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde olduğu halde, apoptotik sürecin başlaması ile hücrenin plazma membranının dış yüzüne çıkmaya başlar. Komşu hücreler, üzerinde fosfatidilserin olan hücreleri fagosite eder. Apoptozun bu fizyopatolojik özelliklerinden istifade edilerek apoptotik hücreler tespit edilebilmektedir. Anneksin V, hücrenin dış yüzünde ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, hücre yüzeylerine Anneksin V bağlanma oranı, o hücre topluluğundaki apoptoza uğramış hücrelerin oranını vermektedir. FITC-Anneksin kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği gibi flow sitometride ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara  $3 \times 10^5$  hücre 2ml medyum içerisinde olacak şekilde ekilirler. 24 saat sonra seçilen uygun doza göre dozlanır. Seçilen uygun saate göre kuyu içerisindeki medyumlar falkonlar içerisinde toplanırlar. Kuyucuklar soğuk PBS ile iki kere yıkanır ve toplanan PBS'ler tekrar aynı falkon içerisinde konulur.

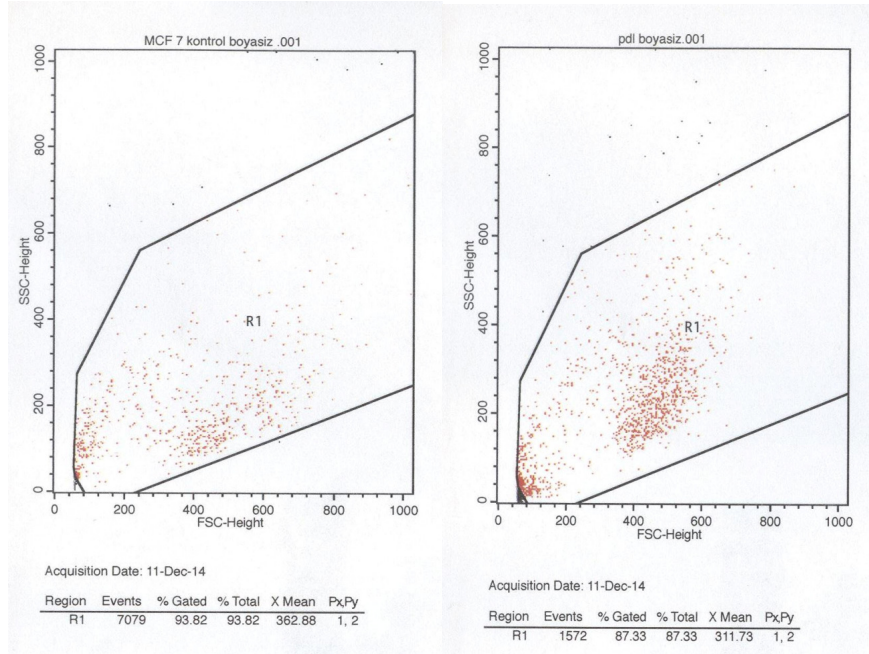
Falkon 12000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant yerine 1ml 1X Binding Buffer eklenir ve hücreler homojenize edilirler. Homojenize olan hücrelerden flow tüpü içerisinde 100 µl alınır, üzerilerine 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl PI konulur. Tüpler hafifçe karıştırılarak 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilirler. Her tüpe 400 µl 1X Binding Buffer eklenir ve 1 saat içerisinde flow sitometri ile analiz edilirler.

PDL ve MCF-7 hücreleri kuyu başına 300.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekildi. Hücreler, WST-1 Hücre Canlılık Testi sonuçlarına göre seçilen uygun doz ve uygun saate göre muamele edildi. Anneksin V – PI boyama ile hücreler boyandı ve flow sitometri cihazında okutuldu.

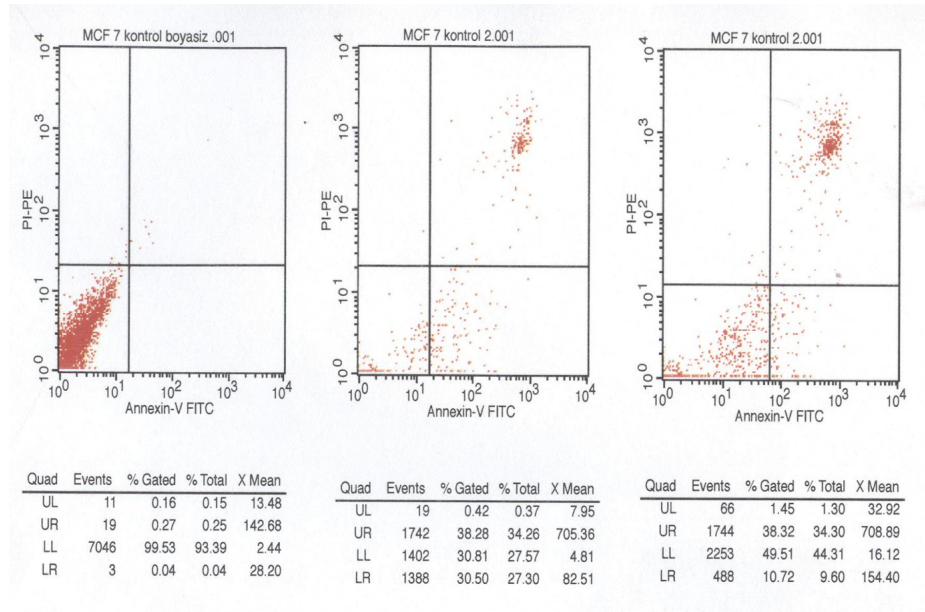
### **3.9.15. MCF-7 ve PDL Hücre Hattında Anneksin V – FITC**

MCF-7 hücre hattı ile kontrol grubu olarak PDL hücre hatlarında apoptoz tayini için fermente edilmiş dut sularından *Morus alba* ailesine ait Yaşar – 28 ve 11-24-12 dut suları hücre canlılığı açısından seçilen dozlarda bir etki yapmadıkları için; *Morus nigra* ailesine ait 14 – Kenan, 6 – İçme ve G-008 seçildi.

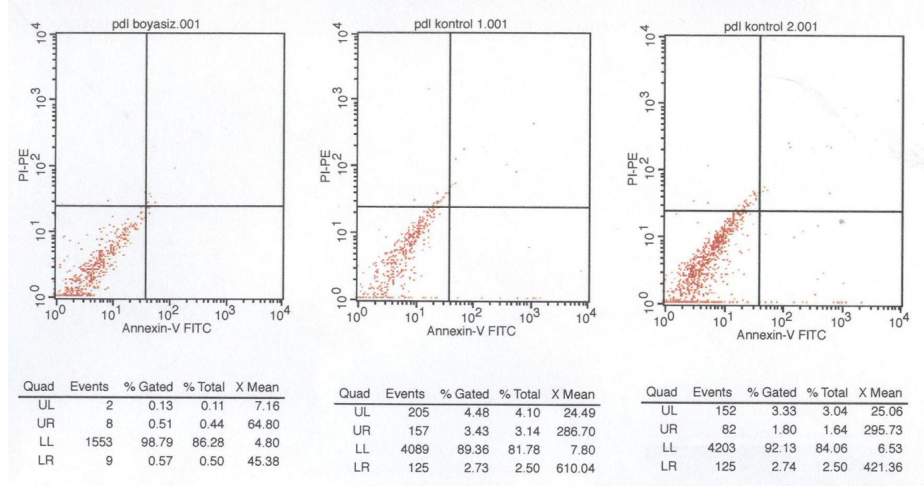
Her hücre hattı için kapılama Şekil 3.46 da olduğu gibi yapıldı. Kontrol olarak doz verilmemiş hücreler kullanıldı.



### 3-46:MCF-7 ve PDL Hücre Kapılama

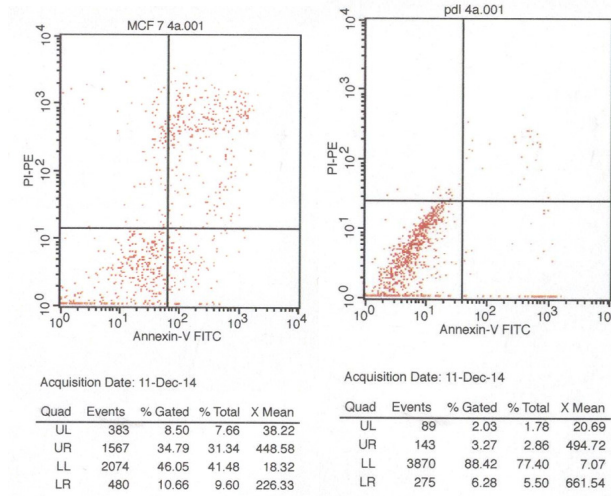


### 3-47:MCF-7 Hücresi Anneksin V- FITC Boyasız & Boyalı Kontrolleri

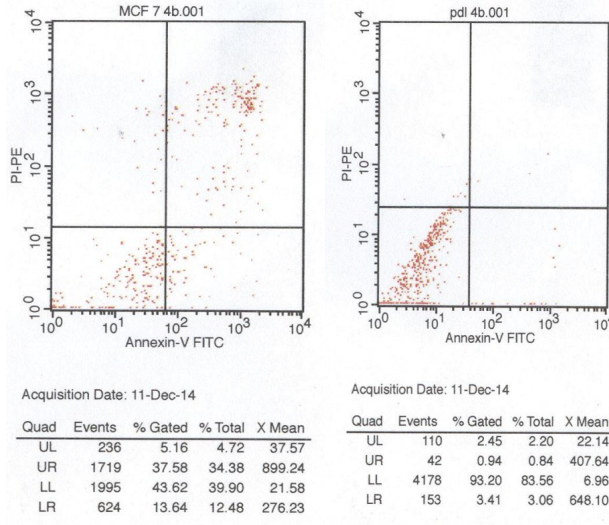


**3-48:PDL Hücresi Anneksin V- FITC Boyasız & Boyalı Kontrolleri**

### 3.9.15.1. 6 – İÇme Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi

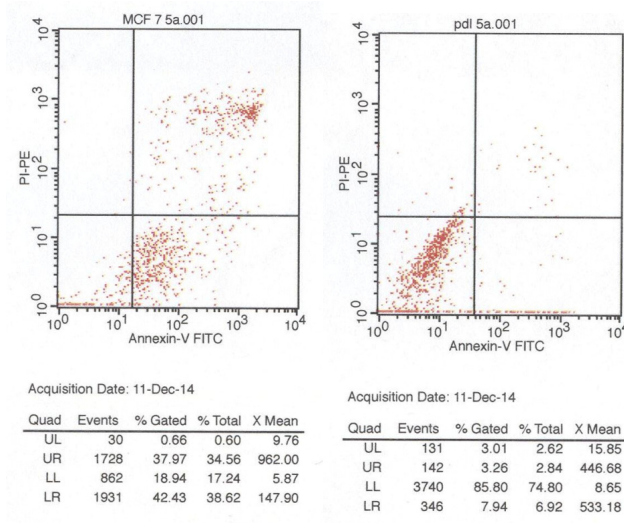


**3-49:6 – İÇme Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi**

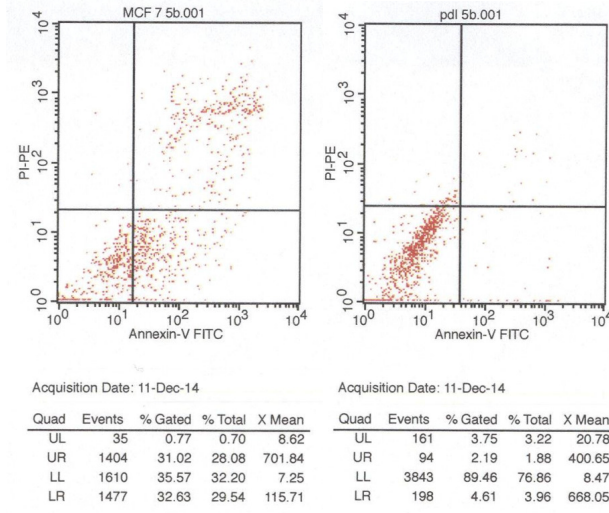


**3-50:6 – İçme Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi**

**3.9.15.2. 14 – Kenan Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi**

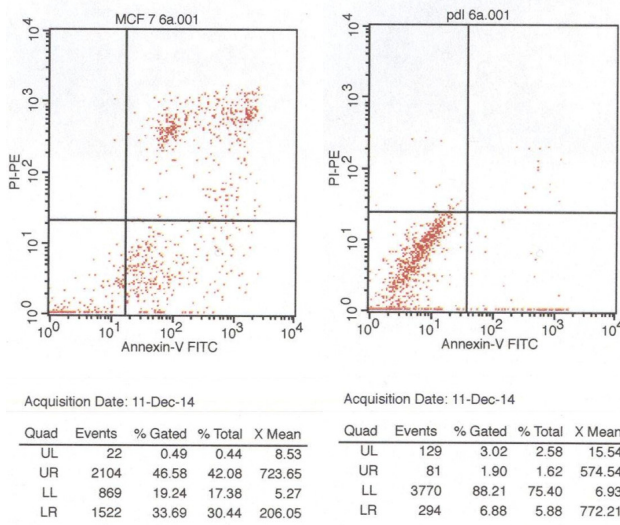


**3-51:14 - Kenan Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi**

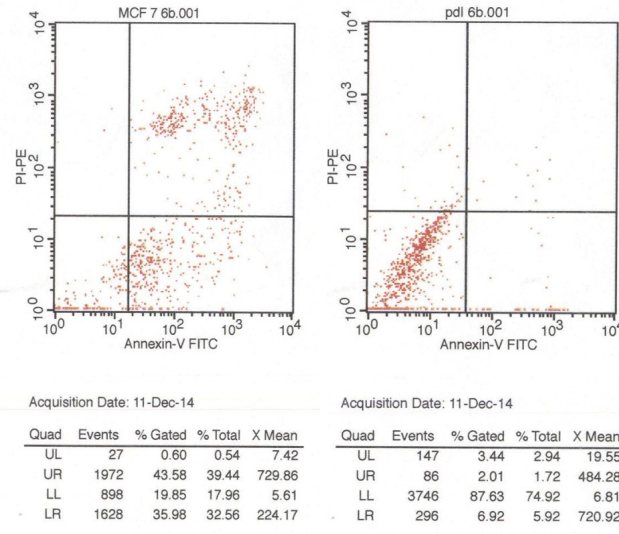


**3-52:14 - Kenan Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi**

**3.9.15.3. G008 Dutu Uygulamasının MCF-7 ve PDL Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkisi**



**3-53:G-008 Dutunun 80 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi**



### 3-54:G-008 Dutunun 100 µg / µl Dozunun 48. saatte MCF-7 ve PDL hücre hattı üzerindeki etkisi

#### 3.10. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler Graphpad Prism 6.0f paket programında yapılmıştır. Sidak-Bonferroni yöntemi düzeltilmesi ve 0,01 istatiksel anlamlılık (alpha) seçilerek multiple t testi yapılmıştır.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda 3 farklı hücre soyunda mayalanmış 5 farklı dut suyunun etkisi incelenmiştir. Yapılan hücre canlılık testi analizleri sonucuna göre fermente *Morus nigra*'ların fermente *Morus alba*'lara göre apoptotik anlamda hücreler üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur.

Yapılan çoklu t testi analizleri sonucu 6-İçme dutunun 3 hücre ve 3 saate göre analizi aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.1)

**4-1: 6-İçme dutunun analizi**

Karşılaştırılan Hücreler	Saat	Doz (µg/ml)	P Değeri
MCF7 - MCF10A	24	80	0,000317422
		80 120	3,07932E-05 0,000887373
	72	80	3,9132E-06
		100	1,90314E-05
		120	0,000490963
		160	1,55232E-07
MCF7 - PDL	24	80	0,000141966
		100	9,9399E-05
		120	9,11436E-06
		140	3,13421E-09
		160	0,000236856
	48	100	0,000472043
		120	2,64259E-05
		140	3,81684E-06
		160	0,000169283
	72	120	4,19239E-06
		140	0,000950142
		160	0,00145428
MCF10A - PDL	24	120	0,000633591
		140	1,55266E-08
	48	140	0,000214203
		160	8,41502E-05

Bu sonuçlara göre MCF7 – MCF10A ve MCF7 - PDL hücreleri üzerinde 6-İçme dutunun 24. saatte düşük dozda etkisi gözlenirken, 72. saatte yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı apoptotik etkisi gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ). MCF10A – PDL hücreleri

üzerinde 6-İçme dutunun 24. ve 48. saatte yüksek dozda etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Yapılan çoklu t testi analizleri sonucu 14-Kenan dutunun 3 hücre ve 3 saate göre analizi aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.2)

#### 4-2:14-Kenan dutunun analizi

Karşılaştırılan Hücreler	Saat	Doz ( $\mu\text{g/ml}$ )	P Değeri
MCF7 - MCF10A	24	120	3,51352E-06
	72	80	3,91487E-07
		100	2,11363E-05
		120	7,55159E-06
		140	4,42883E-13
		160	0,000177244
MCF7 - PDL	24	80	0,000671226
		100	0,00023287
		120	2,4182E-06
		140	3,50978E-05
	48	160	8,03379E-06
		80	1,04969E-07
	72	100	0,000384357
		80	4,47796E-12
		100	7,296E-13
		140	2,68936E-09
		160	2,51428E-06
	MCF10A - PDL	24	140
160			1,93601E-07
48		160	3,38306E-07
72		100	0,000474854
		120	1,69654E-08
		140	0,000152455

Bu sonuçlara göre MCF7 – MCF10A hücreleri üzerinde 14-Kenan dutunun 72. saatte yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı apoptotik etkisi gözlenmiştir ( $p < 0,0001$ ). MCF7 – PDL hücreleri üzerinde 48. saatteki 100  $\mu\text{l}$  dozu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). MCF10A – PDL hücreleri üzerinde ise 24. Ve 72. Saatteki yüksek dozda anlamlı apoptotik etki istatistiksel olarak gözlenmiştir ( $p < 0,001$ ).

Yapılan çoklu t testi analizleri sonucu 11-24-12 dutunun 3 hücre ve 3 saate göre analizi aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.3)

#### 4-3:11-24-12 Dutunun Analizi

Karşılaştırılan Hücreler	Saat	Doz (µg/ml)	P Değeri
MCF7 - MCF10A	72	80	0,000654367
		100	7,21859E-05
		160	0,000888453
MCF7 - PDL	24	140	1,10504E-07
		160	2,24309E-05
	48	120	4,75737E-07
		160	7,26947E-08
MCF10A - PDL	24	140	3,41433E-05
		160	2,76771E-06
	48	120	4,87724E-07
		160	2,08407E-11
	72	80	5,71285E-05
		100	0,00164339
140		0,000598756	

Bu sonuçlara göre MCF7 – MCF10A ve MCF10A – PDL hücreleri üzerinde 11-24-12 dutunun etkisi 72. saatte istatikselsel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Yapılan çoklu t testi analizleri sonucu G-008 dutunun 3 hücre ve 3 saate göre analizi aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.4)

#### 4-4:G-008 Dutunun Analizi

Karşılaştırılan Hücreler	Saat	Doz (µg/ml)	P Değeri
MCF7 - MCF10A	24	80	0,000376814
		160	9,93651E-06
	48	120	0,000749244
		100	2,20124E-06
		120	4,84358E-11
		140	3,97868E-07
		160	0,000127246
MCF7 - PDL	24	80	6,05388E-12
		100	6,25836E-08
		120	3,70574E-08
		140	1,47632E-09
		160	1,07142E-07
	48	80	0,000443572
		100	1,97651E-11
		120	5,34834E-15
		140	8,00402E-16
		160	4,83603E-15
	72	100	1,00574E-07
		120	1,37606E-06
		140	7,11832E-06
		160	5,33135E-06
		MCF10A - PDL	24
100	8,21011E-05		
120	2,18489E-06		
140	1,11408E-07		
160	1,96251E-12		
48	100		8,75284E-07
	120		9,73443E-09
	140		3,90773E-13
	160		2,06894E-12
72	120		6,35858E-06

Bu sonuçlara göre MCF7 – MCF10A hücreleri üzerinde G-008 dutunun 24. saatte düşük dozda ve 48. saatte yüksek dozdaki apoptotik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

Yapılan çoklu t testi analizleri sonucu Yaşar-28 dutunun 3 hücre ve 3 saate göre analizi aşağıdaki gibidir. (Tablo 4.5)

#### 4-5:Yaşar-28 Dutunun Analizi

Karşılaştırılan Hücreler	Saat	Doz (µg/ml)	P Değeri
MCF7 - MCF10A	48	120	0,00159896
MCF7 - PDL	24	80	2,39611E-14
		100	1,43031E-12
		120	5,10428E-13
		140	2,06778E-13
		160	1,70086E-10
	48	100	2,11967E-07
		120	0,000291762
		140	9,77133E-07
		160	8,61237E-10
	72	140	3,80316E-13
		160	1,23969E-14
	MCF10A - PDL	24	80
100			2,05466E-11
120			1,98696E-13
140			1,01291E-14
160			1,09496E-10
48		100	1,50925E-09
		120	1,744E-07
		140	1,25589E-08
		160	7,23726E-11
72		140	1,75874E-05
		160	7,37503E-11

Bu sonuçlara göre MCF7 – MCF10A hücrelerinde Yaşar-28 dutunun etkisi 48. saatte yüksek dozda apoptotik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (  $p < 0,001$ ).

## 5. TARTIŞMA

Fonksiyonel doğal gıdalar içerdikleri polifenolik maddelerden dolayı dikkatleri üzerine çekmiştir. Özenk ve arkadaşlarının belirttiği gibi bu gıdaların en önemli özelliklerinden biri kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabette dahil olmak üzere bir takım hastalıkların önlenmesine katkı sağlayan ve içeriklerinde bulunan flavonoid ve antosiyaninler gibi maddelerden kaynaklı antioksidan aktiviteleridir.

Çalışmamıza Türkiye'nin farklı yörelerinde yetişmiş *Morus nigra* (14 – Kenan, 6 – İçme ve G-008) ve *Morus alba* (Yaşar 28 ve 11-24-12) suları fermente edilmiştir ve üç farklı hücre hattı üzerinde uygulanmıştır.

Çalışmamızda mayalanma sonucu glikozu ortamdan uzaklaştırarak mayalanmış dut suları içerisinde bulunan sadece fenolik bileşiklerin insan meme kanseri hücre hatlarındaki etkisini gözlemlemeyi amaçladık. Hakala ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalardan fenolik bileşiklerden antosiyanin ve flavanoidlerin antikanserojenik etkisinin olduğunu biliyoruz.

Flavonoid ve antosiyaninler bitkilere renklerini vermekteler (77). Bulgularımız göz önüne alındığında çalışmamızda kullandığımız kara dutların beyaz dutlara kıyasla kanserli hücrelerde hücre canlılığını azaltmada daha etkili olduklarını gördük. Bunun sebebinin kara dutların flavanoid ve antosiyaninlerce beyaz dutlara göre daha zengin olduklarını düşünmekteyiz.

Yapılan akan hücre ölçer ile apoptoz tayini analizlerinde fermente karadut sularının seçilen dozlarının MCF-7 hücrelerini apoptoza götürürken PDL hücrelerinde ise hücre canlılığını azaltmada etkili olmadığı görülmüştür.

Özetlemek gerekirse;

- 6-İçme dutu; MCF7 hücrelerini 24., 48. ve 72. saatlerinde düşük dozlarda, MCF10A hücrelerini 24., 48. ve 72. saatlerinde yüksek dozlarda apoptoza götürmüştür. Ancak PDL hücrelerine aynı saatler ve aynı dozlarda aynı apoptotik etkiyi göstermemiştir.
- 14-Kenan dutu MCF-7 ve MCF10A hücrelerini 24., 48. ve 72. saatlerinde yüksek dozlarda apoptoza götürmüştür. Ancak PDL hücrelerine aynı saatler ve aynı dozlarda aynı apoptotik etkiyi göstermemiştir.

- G-008 dutu MCF7 hücrelerini 24., 48. ve 72. saatlerinde düşük dozlarda, MCF10A hücrelerini 24., 48. ve 72. saatlerinde yüksek apoptoza götürmüştür. Ancak PDL hücrelerine aynı saatler ve aynı dozlarda aynı apoptotik etkiyi göstermemiştir.
- 11-24-12 dutu MCF7 hücrelerine 24. ve 48. saatlerde apoptotik etki göstermemiş, 72. saat itibariyle etki etmiştir. MCF10A hücrelerine 24., 48. ve 72. saatlerinde yüksek dozlarda apoptoza götürmüştür. PDL hücrelerine aynı saatler ve aynı dozlarda aynı apoptotik etkiyi göstermemiştir.
- Yaşar-28 dutu MCF7 ve MCF10A hücrelerine 48 ve 72. saatte yüksek dozlarda apoptoza götürmüştür. Ancak PDL hücrelerine aynı saatler ve aynı dozlarda aynı apoptotik etkiyi göstermemiştir.

Çalışmamızı bu dut suları içerisindeki flavanoidlerin ve antosiyaninlerin tayini ile hücre döngüsüne olan etkisi ve kaspaz-3 aktivitesinin bulunması gibi moleküler ve teknik analizler ile destekleyerek daha da ileriye götürmeyi hedeflemekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Reszka, E., Wasowicz, W., Gromadzinska, J., 2006. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr.* Oct; 96(4):609-19.
2. Pharoah, P.D., Mackay, J. 1998. Absolute risk of breast cancer in women at National Cancer Institute. *SEER Cancer Statistics Review. 1973-1995.*
3. Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 61:69–90
4. IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Strategies. IARC handbooks of cancer prevention. Vol. 7: breast cancer screening. Lyon, France: Oxford University Press, 2002
5. Bazzano, L.A., 2005. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases In background paper of the joint FAO/WHO workshop on Fruit and Vegetables for health. Kobe, Japan: World Health Organization. 1–65
6. Wang, SY., Jiao, HJ. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals hydrogen peroxide hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*;48:5677–84
7. Seeram, NP., Adams, L.S., Zhang, Y., et al. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* 54:9329–9339
8. Meyers, KJ., Watkins, CB., Pritts, MP., et al. 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem* 51:6887–6892
9. Seeram, NP., 2008. Berry fruits Compositional elements biochemical activities and the impact of their intake on human health performance and disease. *J Agric Food Chem*;56:627–9
10. Xue, H., Aziz, R.M., Sun, N., et al. 2002. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis.* ;22:351–6
11. Park, SW., Nile, SH., 2013. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. 134–144

12. Ozrenk, K., Gazioglu Sensoy, R.I., Erdinc, C., Guleryuz, M., Aykanat, A., 2010. Molecular characterization of mulberry germplasm from Eastern Anatolia. *African J. Biotechnol.* 9 (1), 001–006.
13. Datta, R.K., 2002. Mulberry cultivation and utilization in India Mulberry for Animal Production. *FAO Animal Production and Health Paper* 147, 45–62.
14. Ozgen, M., Kaya, C., 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Sci. Hortic.* 119, 275–279
15. Naderi, GA., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N. et al. 2003. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytother Res.* 18: 365-369,
16. Hakimuddin, F., Paliyath, G., Meckling, K., 2003. Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat.* 85:65–79
17. Luísa, Z.C., Martins de Sáa et al. 2013. Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*), *Journal of Functional Foods.* p. 169-179S.
18. <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>
19. Bertos, N.R., Park, M. 2011. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest.*, 121 (10), 3789-3796.
20. Miller, T.W., Balko, J.M., Arteaga, C.L. 2011. Phosphatidylinositol 3- kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.*, 29 (33), 4452-4461.
21. Osborne, MP., 2000. Breast anatomy and development. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Diseases of the Breast*, 2nd edition: Lippincott, Williams and Wilkins.: 1-13.
22. Ellis, IO., Pinder, SE., Lee, AHS., Elston, CW., 2000. Tumors of the breast. In: *Diagnostic Histopathology of Tumors.* Fletcher C D M (ed). Second Edition. London: Churvhill Livigstone, 865-930
23. Ellis, IO., Schnitt, SJ., Sastre-Garau, X., 2003. Invasive Breast Carcinoma In: *Pathology and Genetics, Tumors of the Breast and Female Genital Organs.* Tavassoli F A, Devilee P (eds). Lyon: IARC Pres,13-59.
24. Gusterson, AB., Ross, TD., Heath, JV., 2005. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast cancer reseach.* 7,143-148.

25. Aslan, FE., Gurkan, A., 2007. Kadinlarda meme kanseri risk duzeyi. The journaol of breast health; 3:2, 063-068.
26. Aydıntug, S., 2003. Meme kanserinde erken tanı. Sted; 226-228.
27. Ries, LAG., Melbert, D., Krapcho, M., et al. 2008. SEER Cancer Statistics Review,1975–2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
28. Weigelt, B., Peterse, JL., van't Veer, LJ., 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer.5(8),591-602.
29. Sayek, I., 2003. Temel Cerrahi . Ankara: Gunes Kitabevi,: 895-1012.
30. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., 2012. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 62(1):10-29.
31. Key, TJ., Verkasalo, PK., Banks, E., 2001. Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol,2,133.
32. Ozmen, V., Ozcinar, B., Karanlik, H., 2009. Breast cancer risk factors in Turkish women--a University Hospital based nested case control study. World J Surg Oncol,8,7-37.
33. Phillips, KA., Andrulis, IL., Goodwin, PJ., 2001. Current perspectives on BRCA1- and BRCA2-associated breast cancers. Intern Med J,31,349.
34. Wohlfahrt, J., Melby, M., 2003. Age at any birth is associated with breast cancer risk. Epidemiology.12, 68-73.
35. Duffy, MJ., 1996. Proteases as prognostic markers of cancer. Clin Cancer Res 2: 613–618.
36. De Candolle, A., 1967. Origin of Cultivated Plants. Hafner Publishing Company. New York and London, 468 p
37. Gökmen, H., 1973. Kapalı Tohumlular. 1. Cilt Sıkark Matbaası. Ankara.
38. Unal, A., Ozcagıran, R., Hepaksoy, S., 1992. Kara dut ve Mor dut Çeşitlerinde Odun Celiklerinin Koklenmesi Uzerinde Bir Arastırma. Turkiye 1. Ulusal Bahce Bitkileri Kongresi, Cilt 1 (Meyve), s: 267-270, Bornova-Izmir.
39. Polat, A., 2003. Hatay'ın Antakya İlçesinde Yetistirilen Bazı Dut Tiplerinin Meyve Özelliklerinin Belirlenmesi BAHCE 33 (1-2): 67 – 73
40. Guven, S., Basaran, M., 1979. Canakkale Yoresinde Uretilen Kara Dut (Morus nigra L.) Meyvesinin Besin Teknolojisi Yonunden Degerlendirilmesi. Tarımsal Arastırma Dergisi, 1 (2): 108-117.

41. Baytop, A., 1996. Farmasotik Botanik. Ders Kitabı. Istanbul Univ. Yay. No:3637, Eczacılık Fak. Yay. No:58. Istanbul, 315 s.
42. Lale, H., Ozcagiran, R., 1996. Dut Turlerinin Pomolojik, Fenolojik ve Bazı Meyve Kalite Ozellikleri Uzerinde Bir Arastırma. *Derim*, 13 (4): 177-182.
43. Bazzano, LA., 2005. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of diabetes mellitus and cardiovascular diseases In background paper of the joint FAO/WHO workshop on Fruit and Vegetables for health. Kobe, Japan: World Health Organization; 1–65.
44. Wang, SY., Jiao, HJ.. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals hydrogen peroxide hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem*;48:5677–83.
45. Zhao, Y., 2007. Berry fruit value-added products for health promotion. Boca Raton, FL: CRC Press;
46. Anttonen, MJ., Karjalainen, RO., 2005. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *J Food Comp Anal*18:759–69.
47. Seeram, NP., 2006. Berries. In: Heber D, Blackburn G, Go VLW, Milner J, editors. *Nutritional oncology*. 2<sup>nd</sup> edition. London, UK: Academic Press;. p. 615–25.
48. Meyskens, FL., Szabo, E., 2005. Diet and cancer: the disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;14:1366–9.
49. Seeram, NP., 2008. Berry fruits Compositional elements biochemical activities and the impact of their intake on human health performance and disease. *J Agric Food Chem* ;56:627–9.
50. Xue, H., Aziz, RM., Sun, N., 2002. Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *Carcinogenesis*;22:351–6
51. Nile, SH., Won Park, S., 2013. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30 134–144
52. Beer, C., Myers, RA., Sorenson, JH., Bucci LR. 2003. Comprehensive comparison of the antioxidant activity of fruits and vegetables based on typical serving sizes from common methods. *Curr Top Nutraceutical Res*;2:227–50.

53. Parry, J., Su, L., Luther, M., 2005. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. *J Agric Food Chem* ;53:566–73.
54. Hakala, M., Lapvetelainen, A., Huopalahti, R., 2003. Effects of varieties and cultivation conditions on the composition of strawberries. *J Food Comp Anal*;16:67–80.
55. Skupien, K., Oszmianski, J., 2003. Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) grown in Northwest Poland. *Eur Food Res Technol* ;219:66–70.
56. Pantelidis, GE., Vasilakakis, M., Manganaris, GA., Diamantidis, GR., 2007. Antioxidant capacity phenol anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants gooseberries, and cornelian cherries. *Food Chem*;102:777–83.
57. Chandler, FB., 1983. Composition and uses of blueberries Maine Agr Expt Sta Bull;428:1–39.
58. Hardisson, A., Rubio, C., Baez, A., Martin, M., 2001. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. *Food Chem*;73:153–61
59. Lopes da-Silva, F., Escribano-Bailon, MT., 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT Food Sci Technol* 40:374–82.
60. Zierau, O., Bodinet, C., Kolba, S., 2002. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol*;80:125–30.
61. Kraft, BTF., Dey, M., Rogers, RB., 2008. Phytochemical composition and metabolic performance enhancing activity of dietary berries traditionally used by native North Americans. *J Agric Food Chem*;56:654–60.
62. Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., 2009. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J Agric Food Chem*;57:2274–81
63. Satue-Gracia, MT., Heinonen, M., Frankel, FN., 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithinliposome systems. *J Agric Food Chem*;45:3362–7.
64. Vant-Veer, P., Jansen, MC., Klerk, M., 2000. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Public Health Nutr*;3:103–7.

65. Marnett, L.J., Dubois, R.N., 2002. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;42:55–80.
66. Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., 2007. Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice. *Anticancer Res*;27:937–48.
67. Surh, Y.J., Na, H.K., Lee, J.Y., 2001. Molecular mechanisms underlying antitumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* CA Meyer. *J Korean Med Sci*;16:S38–41.
68. Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*;51:68–75.
69. Stoner, G.D., Wang, Z.N., Chen Li-Shu, T., 2007. Cancer prevention with freeze-dried berries and berry components. *Semin Cancer Biol*;17:403–10.
70. Wang, L., Hecht, S.S., Carmella, S.G., 2009. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer Prev Res*;2:84–93.
71. Arat, S., Çetinkaya, G., 2008. Hucre Kulturu Uygulamalı Kursu, TURKHAYGEN–1 PROJESİ □
72. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7915–22.
73. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1993. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In: Gutteridge J.M.C., Halliwell B, editors. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford, U.K.: Oxford Univ Press. p 111–35.
74. Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. ReV. Nutr*22, 19–33.
75. Cakar, Z.P., Kucukgoze, G., Alkım, C., Kısakesen, H.I., 2013. Evolutionary engineering and transcriptomic analysis of nickel-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 731-746
76. Heinonen, I.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4107-4112.

77. Ozrenk, K., Gazioglu Sensoy, R.I., Erdinc, C., 2010. Molecular characterization of mulberry germplasm from Eastern Anatolia. *African J. Biotechnol.* 9 (1), 001–006.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	AYÇA	<b>Soyadı</b>	DİREN
<b>Doğ. Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ. Tar.</b>	18.06.1989
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	21638148698
<b>Email</b>	aycadiren89@gmail.com	<b>Tel</b>	555 7408752

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Üniversitesi	2015
<b>Lisans</b>	Hacettepe Üniversitesi	2012
<b>Lise</b>	Maltepe Anadolu Lisesi	2007

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Almanca	İyi	İyi	İyi		B1

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):