

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİCUS CARİCA EKSTRAKTININ İNSAN KOLON KANSER
HÜCRE HATLARINDA PROLİFERASYON VE İNVAZYON
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Zeynep DENLİ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA- 2018

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİCUS CARİCA EKSTRAKTININ İNSAN KOLON KANSER
HÜCRE HATLARINDA PROLİFERASYON VE İNVAZYON
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Zeynep DENLİ

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202041 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2018

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Zeynep Denli tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ali ÜNLÜ
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV
Selçuk Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Selçuk Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Hakan BOYUNAGA
Kırıkkale Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç.Dr. Beyza SARAÇLIGİL
KTO Karatay Üniversitesi

İmza

İmza

İmza

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen, hoşgörüsüyle yaklaşan, üzerimde büyük emekleri olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV'e,

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sorularımı yanıtsız bırakmayan, her aşamada bana yardımcı olan hocam Doç. Dr. Serdar KARAKURT'a,

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında bulunan, engin bilgilerinden faydalandığım tüm hocalarıma,

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 16202041 nolu doktora tez projesi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü'ne,

Tez çalışmasında kullanılan incir çekirdeği yağının temininde yardımcı olan ve bilgilendiren Zade Vital genel müdürü Mevlüt BÜYÜKHELVACIGİL'e ve çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve her zaman bana destek olan arkadaşlarım Alev GÜL ve Mehmet OĞUZ'a,

Beni seven, sevdiğine inandığım, motive eden ve yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

Sevgileriyle beslendiğim, tebessüm vesilelerim olan yeğenlerime ve beni bugünlere getiren, her zaman destekleyen, dualarıyla yanımda olan, yol gösteren babam Dursun DENLİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

*Bu ve bundan sonraki tüm çalışmalarımı rahmetli annem Fatma DENLİ'ye
ithaf ediyorum...*

Zeynep DENLİ

KONYA - 2018

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	V
ÖZET.....	Vi
SUMMARY	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	2
1.2. Kolorektal Kanser	3
1.2.1. Kolorektal Kanserin Bilinen Sebepleri	5
1.2.2. Kolorektal Kanser Teşhis ve Görüntüleme	6
1.2.3. Kolorektal Kanserin Evreleri	7
1.2.4. Kolorektal Kanser Tedavi Yöntemleri	8
1.3. Hücre Proliferasyonu	12
1.4. Kanser Metastazı ve İnvazyonu	13
1.4.1. Hücreler Arası Bağlantılar	15
1.4.2. Hücre Matriks Etkileşimleri	17
1.4.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	18
1.5. <i>Ficus carica</i>	19
1.5.1. <i>Ficus carica</i> Taksonomi.....	19
1.5.2. <i>Ficus carica</i> Hakkında Genel Bilgi ve Kaynak Araştırması.....	19
1.6. İncir Çekirdeği Yağı.....	22
1.6.1. İncir Çekirdeği Yağı Analizleri.....	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
2.1. Gereçler	26
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	26
2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri	27
2.1.3. Sarf Malzeme	30
2.2. Yöntemler.....	30
2.2.1. Bitki Materyali	30
2.2.2. <i>F. carica</i> Ekstraksiyonları	30
2.2.3. Toplam Antioksidan, Fenolik ve Antioksidan Aktivite Analizleri	33
2.2.4. İncir Çekirdeği Yağının Temini	34

2.2.5. Hücre Kültürü	35
2.2.6. Hücre Proliferasyon Analizi.....	38
2.2.7. Hücre İnvazyon Analizi	38
2.2.8. İstatistiksel Analiz.....	40
3. BULGULAR.....	41
3.1. <i>F. carica</i> Ekstraktlarının Verimleri.....	41
3.2. Toplam Antioksidan, Fenolik ve Antioksidan Aktivite Analizleri	42
3.2.1. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Analizleri	42
3.2.2. Ekstraktların Toplam Antioksidan Kapasite Analizleri	43
3.2.3. Ekstraktların Antioksidan Aktivite Analizleri	45
3.3. Hücre Proliferasyon Analizleri	47
3.3.1. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının Hücrelerin Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	47
3.4. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının Hücrelerin İnvazyonu Üzerine Etkisi	52
3.4.1. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının HT-29 Hücre Hattının İnvazyonu Üzerine Etkisi.....	52
3.4.2. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının DLD-1 Hücre Hattının İnvazyonu Üzerine Etkisi.....	53
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
6. KAYNAKLAR	62
7. ÖZGEÇMİŞ.....	69

KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
FBS	Fetal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
PBS	Phosphate buffered saline
IC ₅₀	Toplam Hücre Sayısının Yarisını İnhibe Eden İlaç/ Madde Konsantrasyonu
HT- 29	Kolorektal kanser hücre hattı
DLD-1	Kolorektal kanser hücre hattı
PNT1A	Sağlıklı epitel hücre hattı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FOBT	Dışkıda gizli kan testi
gFOBT	Guaiac FOBT
FIT	Dışkı immünokimyasal testler
SIRT	Selektif dahili radyasyon terapisi
TACE	Transarteriyel kemoembolizasyon
RA	Radyofrekans ablasyon
FAB	Familial adenomatöz polipozis
DADS	Dialil disülfid
6-AGS	6-O-açıl-β-D-glukosil-β-sitosterol
DPPH	2,2 ' -diphenyl-1-picrylhydrazyl
TEAC	Troloks eşdeğerli antioksidan kapasite
FRAP	Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç
GMP	Good Manufacturing Practices
CAM	Koryoallantoik membran modeli

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ficus carica Ekstraktının İnsan Kolon Kanser Hücre Hatlarında Proliferasyon ve İnvazyon Üzerine Etkileri

Zeynep DENLİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2018

Kolorektal kanser; kalın bağırsak ve rektumda görülen malign oluşumlardır. Kolorektal kanser dünyada erkeklerde ve kadınlarda görülen kanser kaynaklı ölümlerde 3. sırada yer almaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarının çoğu kanser hücrelerine karşı seçici olmayan ve genellikle normal hücrelerde de toksisiteye sebep olan kimyasal maddelerin kombinasyonudur. İlaç direnci ve yüksek oranda hastalığın nüksetmesi mevcut kullanılan kemoterapi ilaçların çoğuyla ilişkilidir. Kullanılan doğal ilaçlar (besinler) kanser önleme ve tedavide alternatif bir metod olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Sindirim sistemi devamlı olarak besinlere maruz kalmaktadır, bu yüzden besinler bağırsak kanserlerinin önlenmesi ve tedavisinde anahtar role sahiptir.

Ficus carica ve incir çekirdeği yağının antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-mikrobiyal ve anti-kanser etkiye sahip olduğunu bilinmektedir. *Ficus carica*'nın ve incir çekirdeği yağının, HT-29 ve DLD-1 insan kolorektal kanser hücre hatları ve PNT1A fibroblast hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif, invaziv özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; Akseki/Antalya bölgesinden toplatılan olan ham ve olgun *Ficus carica* meyveleri liyofilize edilerek ayrı ayrı metanol ve suda ekstraksiyonları elde edildi. Ekstraktların ve incir çekirdeği yağının HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatlarının proliferasyonuna etkisi araştırıldı ve "Alamar Blue yöntemi" ile IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. *Ficus carica*'nın tüm ekstraksiyonlarının ve incir çekirdeği yağının HT-29 ve DLD-1 kanser hücre hatlarının invazyon potansiyelleri üzerindeki etkileri "Matrigel Invasion Assay" ile incelendi.

Sonuç olarak, su-ham, metanol-ham ekstraktları HT-29 hücresi üzerinde, su-ham, metanol-ham ve metanol-olgun ekstraktları ise DLD-1 ve PNT1A hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki göstermemiştir. HT-29 hücre hattının proliferasyonu üzerindeki su-olgun, metanol-olgun ekstraktlarının ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değeri sırasıyla 1.5, 1.75 ve 57 mg/mL olarak hesaplanmıştır. DLD-1 hücre hattının proliferasyonu üzerindeki su-olgun ekstraktı ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değeri sırasıyla 6.6 ve 32.16 mg/mL iken PNT1A için bu değerler 17.37 ve 96.6 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Su-olgun ve incir çekirdeği yağı HT-29 hücresi üzerinde sırasıyla 2.13-katlık invaziv ve 1.3-katlık anti-invaziv bir etkiye sahiptir. Su-olgun ve incir çekirdeği yağı DLD-1 hücrelerinin invazyon potansiyelini sırasıyla %30 ve %16 oranında azaltmıştır.

Anahtar Sözcükler: Anti-proliferatif; Anti-invaziv; *Ficus carica*; İncir çekirdeği yağı; Kolorektal kanser

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Effects of *Ficus carica* Extraction on Proliferation and Invasion in Human Colon Cancer Cell Lines

Zeynep DENLİ
Department of Medical Biochemistry

PhD THESIS / KONYA-2018

Colorectal cancer is a disease in which malignant cells form in the tissues of the colon and rectum. Colorectal cancer is the third leading cause of cancer death in both men and women in the world. Currently, most chemotherapeutic agents used in cancer therapy are combinations of chemical substances, which are not selective toward cancer cells and usually induce toxicity in normal cells as well. Drug resistance and high rates of disease recurrence are associated with many of the currently-used drugs. Therefore, using natural medicines as an alternative method in the prevention of cancer has been proposed. Gastrointestinal system is exposed to foods continuously, thereby foods are the important role in the prevention and treatment of colorectal cancer.

It is known that *Ficus carica* and fig-seed oil have antioxidant, anti-inflammatory, anti-allergic, antimicrobial, anti-cancer effects. The aim of this study was to investigate the effect of *Ficus carica* and fig seed oil on the anti-proliferative and invasive properties of HT-29 and DLD-1 colorectal cancer cell lines and PNT1A fibroblast cell line. Within this aim; after raw and ripe *Ficus carica* that were collected from Akseki/Antalya during harvest season were lyophilized, they were extracted into methanol and water separately. It was searched the effect of extractions and fig-seed oil on the proliferation of HT-29, DLD-1 and PNT1A and IC₅₀ values were determined by “Alamar Blue Assay”. The effect of extractions and fig-seed oil on the invasive potential of HT-29 and DLD-1 cancer cell lines was analyzed with “Matrigel Invasion Assay”.

At the end, water-raw, methanol-raw extractions on HT-29, water-raw, methanol-raw and methanol-ripe extractions on DLD-1 and PNT1A didn't show anti- proliferative effect. The IC₅₀ values of water-ripe, methanol-ripe and fig-seed oil on HT-29 proliferation was determined as 1.5, 1.75 ve 57 mg/mL. While the IC₅₀ values of water-ripe and fig-seed oil on DLD-1 proliferation were found as 6.6 ve 32.16 mg/mL, for PNT1A as 17.37 ve 96.6 mg/mL, respectively. Water-ripe and fig-seed oil showed 2.13-fold invasive and 1.3-fold anti-invasive effect on HT-29 cells. Water-ripe and fig-seed oil decreased the invasive potentials of DLD-1 cells at the rates of 30% and 16%, respectively.

Key Words: Anti-proliferative; Anti-invasive; Colorectal cancer; *Ficus carica*; Fig seed oil

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bir hücre veya hücre grubunun olması gerektiğinden daha çok bölünmesinden ya da gerektiği halde bölünmediğinden ortaya çıkan anormal doku kütlesi anlamına gelen malign yapıdaki tümörlere denmektedir.

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın üçüncü kanser türü ve ölümle sonuçlanan kanserlerden biridir (Chen ve ark 2016, Siegel ve ark 2017). Kolorektal kanser beslenme faktörleriyle ilişkilendirilebilir veya bağırsak duvarının mukoz yüzeyindeki epitel hücrelerde kişinin hayatı boyunca oluşan genetik değişimlerinin kümülatif bir sonucu olabilir ya da aile üyelerinden kalıtsal olarak geçebilmektedir (Nomoto ve ark 2004, Ginsberg ve ark 2010).

Modern tedaviler, ilerlemiş ve metastaz durumdaki kolon kanserinin tedavisinde cerrahi müdahalenin yanı sıra çoğunlukla kemoterapötiklere ve monoklonal antikörlara dayanmaktadır (Saban ve ark 2013). Amaca uygun kombine edilmiş terapi kolorektal kanser hastalarının sonuçlarını iyileştirmektedir. Fakat metastazlarla ve yüksek nüksetme oranlarıyla birlikte hastalığın geç teşhisi ölümcül problemlere sebep olmaktadır (Saban ve ark 2013). Yeni stratejiler geliştirilmiş olmasına rağmen, kemoterapi hala kolorektal kanser tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak tümör hedefli olmayışından ve spesifik olmayan biyodağılımdan dolayı günümüzdeki kemoterapi ilaçları daima düşük verime sahip olmakla birlikte bulantı, kusma, diyare, kemik iliği baskılanması, halsizlik ve nörotoksisite gibi istenmeyen yan etkileri bulunmaktadır (Egan ve ark 2004, Lammers ve ark 2012).

Doğal kaynaklı ürünler, birçok yıldır yeni terapötiklerin kaynakları olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar, birçok anti-kanser etkiye sahip doğal bitki bileşenleri farmakoloji çalışmalarında büyük ilgi görmüştür (Wang ve ark 2015, Wang ve ark 2017).

Dünyanın en değerli meyvelerinden olan incir, Moraceae familyasının *Ficus L.* cinsine mensup olup, çok sayıdaki türü içerisinde meyvecilik bakımından en önemlisi Anadolu inciri adı verilen *Ficus carica L.*'dir (Özbek 1977). İncirin meyvesi, kök ve yaprakları gastrointestinal (kolik, sindirim, iştahsızlık ve diyare), respiratuar (zatüre, öksürük, bronşiyal hastalıklar) ve kardiyovasküler bozukluklar ve

anti-inflamatuar ve anti-spazmodik tedaviler gibi birçok hastalığı tedavi etmek için geleneksel tıpta kullanılmaktadır (M. Werbach 1993, J. A. Duke 2002). İncir meyvesinin (*F. carica*) polifenolik bileşenleri antioksidan, anti-inflamatuar, anti-alerjik, anti-mikrobiyal ve anti-kanser etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Yamamoto ve Gaynor 2001, Cushnie ve Lamb 2005).

Çalışmamızda, *F. carica*'nın metanol ve su ekstraktlarının ve incir çekirdeği yağının DLD-1 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarının proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda; ham ve olgun *F. carica*'nın metanol ve suda ekstraksiyonları elde edilecek ve ekstraksiyonların total fenolik ve antioksidan miktarları belirlenmiştir. Tüm ekstraksiyonların ve incir çekirdeği yağının DLD-1 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları ve PNT1A sağlıklı epitel hücre hattı üzerine anti-proliferatif etkileri incelenmiştir. Ayrıca anti-proliferatif etki gösteren *F. carica* ekstraktlarının ve incir çekirdeği yağının DLD-1 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatlarının invazyon potansiyelleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

1.1.Kanser

Kanser, ekonomik olarak hem çok ve hem de az gelişmiş ülkeler de ölüm sebeplerinden biridir. Özellikle dünya popülasyonunun %82'sini oluşturan az gelişmiş ülkelerdeki popülasyonun artışı ve yaş dağılımından dolayı bu sağlık sıkıntısı dünya çapında gün geçtikçe artmaktadır. Dünya genelinde 2012 yılında yaklaşık 14.1 milyon yeni kanser vakası çıktığı ve 8.2 milyon kişinin kanserden öldüğü belirlenmiştir (Torre ve ark 2015).

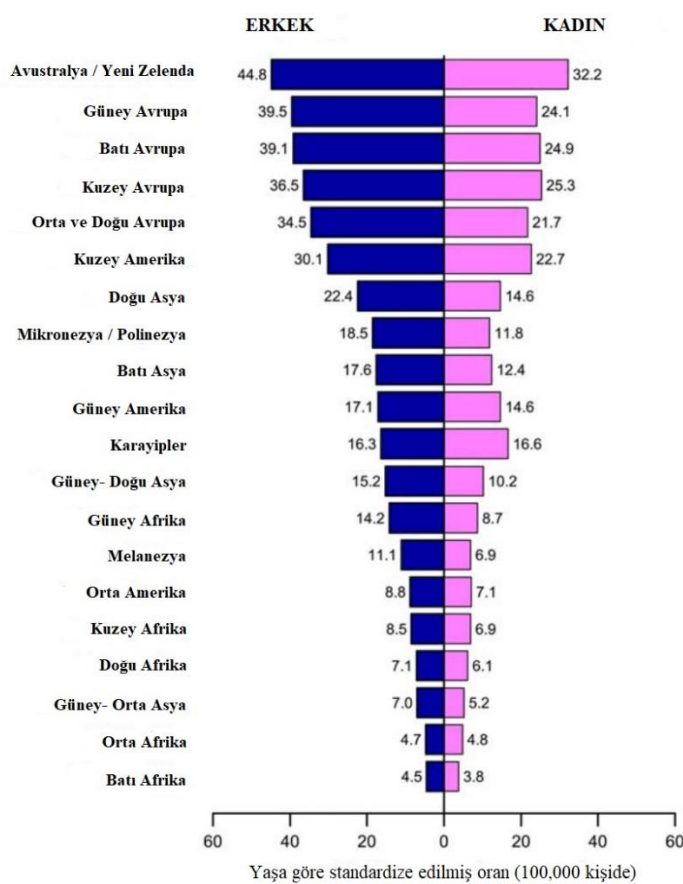
Kanser vücudun belli bir bölümündeki normal hücrelerin kontrol dışı büyümeye başlamasıyla gelişir. Birçok farklı kanser türü vardır; kanser türlerinin hepsi ölen ya da yeni normal dışı hücre oluşturmak yerine büyümeye, bölünmeye ve tekrar bölünmeye devam ederler (Sudhakar 2009).

1.2.Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser, 2012 yılında yaklaşık 693,900 ölüm ve 1.4 milyon ortaya çıkan vakaya göre erkeklerde en çok teşhis edilen üçüncü kanser türüken kadınlarda ikinci sıradadır (Torre ve ark 2015).

Görülme sıklığının aksine, dünyadaki birçok ülkede kolorektal kanser ölüm oranlarında azalma görülmektedir ve bu durum büyük olasılıkla kolorektal kanser görüntülenmesiyle, risk faktörlerinin yaygınlığının azalmasıyla ve gelişmiş tedavi yöntemleriyle ilişkilendirilebilir. (Center ve ark 2009, Edwards ve ark 2010).

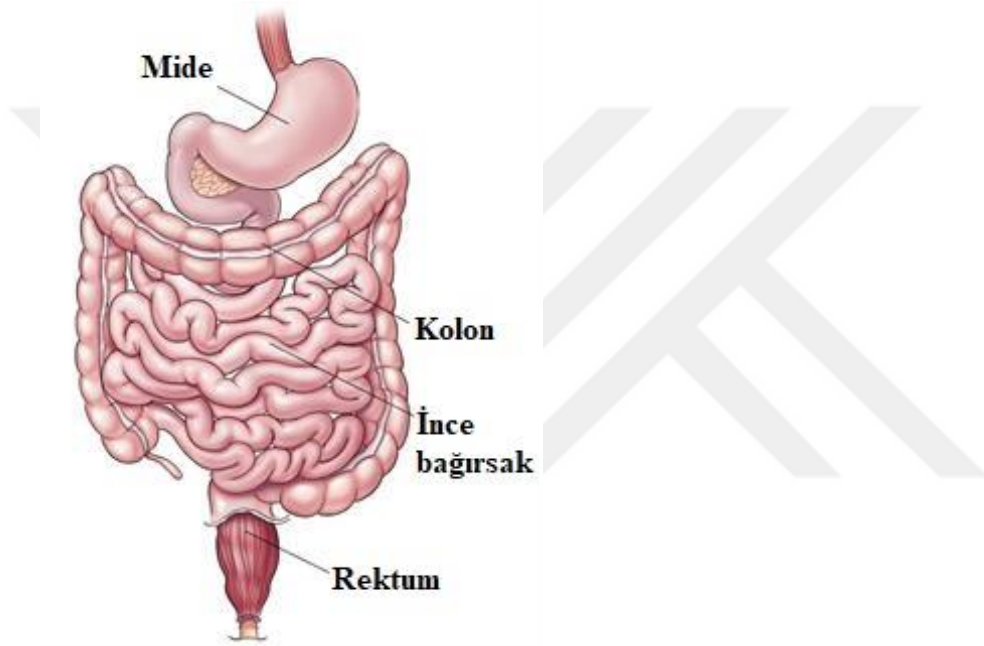
Kolorektal kanser insidans oranı Avustralya/ Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika’ da yüksekken, Afrika ve Güney-Orta Asya’da düşüktür. Dünyanın birçok yerinde kolorektal kanser insidans oranı erkeklerde kadınlara göre daha yüksektir (Şekil1.1) (Torre ve ark 2015).



Şekil 1.1. Cinsiyete ve bölgeye göre kolorektal kanser insidans oranları (Torre ve ark 2015).

T.C. Sağlık Bakanlığının 2014 Kanser İstatistikleri raporuna göre; kolorektal kanserler hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde yüz binde 22,8 ve kadınlarda ise yüz binde 13,8 sıklığında görülmektedir (Sağlık Bakanlığı 2017).

Kolon ve rektum sindirim sisteminin bir parçasıdır. Kolon, ince bağırsığı rektuma bağlayan yaklaşık 1,5 m uzunluğunda boruya benzeyen yapıdır. Rektum ise kolonun anüse yakın olan ilk 12 cm olan dışkının atılmadan önce tutulduğu sindirim sisteminin alt parçasına denir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Sindirim sisteminin anatomik yapısı (Clinic 2018).

Kolorektal kanser, kolon ve rektumda görülen malign (kötü huylu) oluşumlardır. Adenom karsinom, kolorektal malignitenin adenomatoz poliplerden geliştiği yönündeki yaygın bir düşüncüyü belirtir. Özellikle displastik değişimlerle ilişkilendirildiğinde kolorektal kanserin premalign ve oluşum evresindeki lezyonlardan kaynaklandığını gösteren birçok kanıt bulunmaktadır. Ancak, her adenomun malign tümöre evrimleşme kapasitesi olmasına rağmen sadece çok az adenom aslında invaziv kanserlere yol açar. Çoğu adenomlar gelişim süreçlerini stabilize eder veya geriletirler (Risio 2010).

Kolorektal kanserin erken evreleri büyük olasılıkla normal mukozada hücre replikasyonun ve yenilenmesinin bozulmasıyla ve proliferatif, biyokimyasal ve biyomoleküler anormallikleri gösteren önemli kriptlerin birlikte ortaya çıkmasıyla başlamaktadır. Karsinomaların genellikle oluşum evresindeki adenomlardan kaynaklandığına dair birçok kanıt gösterilmesine rağmen, bu tüm poliplerin malign değişimlere uğrayacağı ve yeni bir kanser oluşumuna sebep olacağı anlamını taşımamaktadır (düz mukoza yapısından kanser gelişimi gibi). Bu yüzden, adenomların risk belirleme süreci, uzun dönem takiplerde ve iyi öngörüler yapılmasında dahi devam etmesi gereken araştırmalar olduğu görülmektedir (Soreide ve ark 2007, Soreide ve ark 2009).

1.2.1. Kolorektal Kanserin Bilinen Sebepleri

Kolorektal kanseri olan kişinin aile geçmişi ve kendi kişisel hastalık geçmişi, kolorektal polipler, kronik inflamasyonlu bağırsak hastalıkları kolorektal kanser için büyük risk faktörleridir (Schatzkin ve ark 1994, Bernstein ve ark 1999).

Birinci dereceden akrabada (ebeveyn, kardeş ve çocuk) kolorektal kanser hastası olan kişinin kolorektal kansere yakalanma riski yaklaşık olarak iki kat artmaktadır. Bu risk akrabanın hastalığının erken yaşta teşhis edildiği veya yakınlık derecesinin yüksek olduğu durumlarda artar (Johns ve Houlston 2001, Butterworth ve ark 2006). Bu risk grubundaki kişiler için görüntülemenin yapıldığı ortalama yaş grubuna göre 50 yaşından önce tarama yaptırmaları tavsiye edilebilir. Ailevi adenomatoz polipozis veya kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (Lynch sendrom) (Lynch ve de la Chapelle 2003) gibi kalıtsal genetik değişim gösteren kişilerde kolorektal kanserin ortaya çıkma riski daha yüksektir, dikkatli bir şekilde görüntülenmeli ve belirlenmelidir (Berg ve ark 2009).

Fiziksel aktivite eksikliği, normal kilonun üzerinde veya obez olma, işlenmiş ve kırmızı et ağırlıklı beslenme değiştirilebilir potansiyelde olan kolorektal kanser için önemli risk faktörlerindendir (Colditz ve ark 1997, Tomeo ve ark 1999, Calle ve ark 2003, Hu ve ark 2004, Chao ve ark 2005, Larsson ve ark 2005, Samad ve ark 2005, Pischon ve ark 2006, Giovannucci 2007, Larsson ve Wolk 2007, Hawley ve ark 2008, Wang ve ark 2008, Danaei ve ark 2009).

Kolorektal kanser ve sigaranın arasındaki ilişkiyi açıklayan çalışmalarda, sigaranın adenomatoz polip gelişimini ve özellikle daha agresif adenomların oluşumunu artırdığı belirtilmiştir (Botteri ve ark 2008).

1.2.2. Kolorektal Kanser Teşhis ve Görüntüleme

Endüstrileşmiş ülkelerde kolorektal kanserin yaşam riski yaklaşık %5 civarlarındadır. Kolorektal kanser yaygınlığının fazla olmasından, öncüllerle teşhis edilebilmesinden (adenomas) ve erken tedavinin faydalı olmasından (adenomaların alınması, erken evrelerde cerrahi müdahale) dolayı görüntüleme için elverişlidir. Özellikle birçok görüntüleme aracı kolorektal kanser için uygundur. Ancak hala çok iyi bir görüntüleme aracı belirlenememiştir (Bretthauer 2010, 2010). Görüntüleme yöntemlerinin özellikleri hareket moduna göre kategorize edilebilir: erken belirleme testleri (dışkıda gizli kan testi (FOBT) veya kanser önleme yöntemleri (fleksible sigmoidoskopi ve kolonoskopi) (Bretthauer 2011).

FOBT görüntüleme ucuz ve invaziv değildir fakat çok sayıda yalancı-pozitif sonuç çıkar ve sıklıkla tekrar edilmesi gerekir. Uygulanan testler içerisinde, guaiac FOBT (gFOBT) görüntüleme kolorektal kanserden kaynaklanan ölümü azalttığı kanıtlanmıştır, fakat düşük duyarlılığı etkinliğini kısıtlamıştır. Dışkı immünokimyasal testler (FIT) çok daha iyi duyarlılığa ve popülasyonda yüksek kabul oranına sahiptir. Ayrıca, FIT'in kantitatif değişkenleri, kolonoskopi kaynaklarının uygunluğuna, kişisel risk profiline ve görüntülenecek popülasyondaki istenilen saptama oranına göre testin pozitifliği için eşik değerinin üzerindeki seçeneklere izin verir (van Dam ve ark 2010). Spesifik DNA değişimlerinin tespitini amaçlayan dışkı DNA testleri (sDNA) gFOBT görüntüleme ile kıyaslandığında kolorektal kanserin ve adenomların tespitini daha iyi yapabilir, ancak geniş kitleleri hedefleyen çalışmalarda yetersiz kalmaktadır (Soreide 2011). Bunların aksine, fleksible sigmoidoskopi daha invazivdir, ancak tek seferlik görüntüleme için etkilidir. Rastgele denemelerin toplu analiz sonuçlarına göre, fleksible sigmoidoskopi görüntülemeyle %30 olan kolorektal kanser mortalitesi, FOBT görüntüleme ile %16'ya düştüğü görülmektedir (Bretthauer 2010, 2010).

Kolonoskopi görüntüleme birçok ülkede kullanılmasına rağmen, faydalarını tespit edebilecek herhangi rastgele bir deneme yapılmamıştır, bu yüzden günümüzde

çok tavsiye edilmemektedir. Kolorektal kanser mortalitesini azalttığı için tavsiye edilen sadece iki yöntem vardır; dışkı gizli kan testi ve fleksible sigmoidoskopi. Kolonoskopi, FOBT ve fleksible sigmoidoskopiye göre daha yüksek potansiyele sahiptir, fakat önerilmeden önce rastgele denemelerin değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Soreide 2011).

1.2.3. Kolorektal Kanser Evreleri

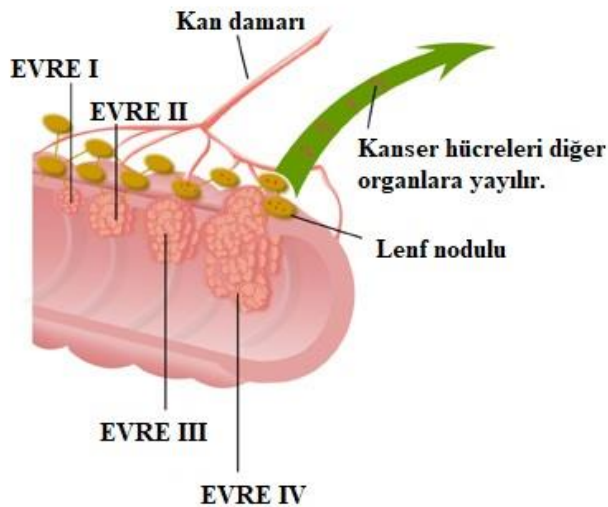
Kolorektal kanser mukoza olarak adlandırılan bağırsağın iç yüzeyinde başlar. Tümör büyüdükçe, bağırsak duvarının içine doğru yayılır ve dış kısmına kadar ilerler. Kanser hücreleri daha sonra lenf nodullarına kadar yayılır ve kolon ve rektumu çevreleyen kan damarlarına kadar ulaşır. Kanser hücreleri karaciğer gibi uzakta olan organlara kadar yayılmaktadır.

Evre I: Kanser bağırsak duvarının sadece iç yüzeyinde bulunmaktadır. Lenf nodullara veya diğer organlara yayılmamıştır.

Evre II: Kanser bağırsak duvarının tüm yüzeylerine doğru yayılmıştır, ancak lenf nodullara ve diğer organlara ulaşmamıştır.

Evre III: Kanser yakında bulunan lenf nodullara yayılmıştır ama diğer organlara yayılmamıştır.

Evre IV: Kanser karaciğer veya akciğer gibi diğer organlara yayılmıştır.



Şekil 1.3. Kolorektal kanser evreleri. (Cedars-Sinai 2018).

1.2.4. Kolorektal Kanser Tedavi Yöntemleri

Kolorektal kanserin birçok bilimsel ve alternatif tedavi yöntemi vardır. Tedavi yöntemleri hastaların hangi evrede hastalığa yakalanmış olmalarına, gençlerle kıyaslandığında yaşlı olanlarda daha kötü sonuçları olduğundan dolayı onların yaşlarına bağlı olarak daha yüksek ve düşük etkinlik göstermektedir. (Anaya ve ark 2011).

Etkili olmaması ve zararlı sonuçlar doğurabileceğinden tüm tedavi yöntemleri hastalar üzerinde denenmemelidir. Kanseri uzmanları genellikle zamanla ispatlanmış standart kanser tedavilerini önermektedirler. Tedavi sonrası beklenen olumlu sonuçlarla karşılaşıldığında, metastazı önlemek için hastanın ileride oluşabilecek semptomlarının kontrol edilmesi yeterli olmaktadır. Kolorektal kanser tedavi yönteminde seçim çok önemlidir çünkü her tümör farklı yöntemlere farklı cevaplar verir. Tümör tipi, hastalığın evresi, hastanın yaşı, hastanın sağlık durumu, hayata karşı tutum ve davranışları gibi birçok faktöre göre tedavi yöntemleri seçilmektedir. Günümüzde alternatif tıp birçok insana yardımcı olan tedavi yöntemleri sunmaktadır. Bilim insanları hastalığa deva olabilecek nitelikte birçok yeni tedavi yöntemi araştırmakta ve insanlığa sunmaktadır. Ancak kolon kanserine yönelik spesifik tedaviler çok sınırlıdır. Cerrahi, kemoterapi, radyasyon terapisi, immunoterapi ve besin terapisi gibi bu kanserin tedavisi için uygun olan birçok tedavi seçeneği olmasına rağmen, ikincil komplikasyonların ortaya çıktığı bütün bu tedavi yöntemlerinin tek başına kullanılmasıyla elde edilen başarı oranları çok umut verici değildir. Hastalardaki terapötik etkiyi en üst düzeye çıkarmak için, kombinasyonel bir yaklaşım gereklidir (Mishra ve ark 2013).

Polipektomi & Cerrahi Tedavi

Cerrahi yöntemler temelde radyasyon terapisi ve ilaç tedavisini de içerir. Hastanın tamamen iyileşmesi için cerrahi henüz kanserleşmemiş ya da kanserleşmiş tümörün cerrahi olarak alınması yüksek bir potansiyele sahiptir ve küçük ve lokalize kanser büyümeleri için daha etkili bir seçenek olabilir. Kolonoskopi boyunca poliplerin ameliyatla alınmasına polipektomi olarak adlandırılır. Nüksetme ihtimali varken, cerrahi tedavi, radyasyona ve kemoterapiye dirençli veya teşhis zamanında

ameliyat edilemeyen solid (katı) tümörlerin tedavi edilmesi için genellikle tek yoldur. (Kristjansson ve ark 2010).

Radyasyon Terapisi

Radyoterapi, malign hücrelerin proliferasyonunu kontrol etmek için iyonize edici radyasyonun kullanımudur ve birçok kanser türünün tedavisinde kullanılabilir. Radyasyon, normal dokuda radyasyondan kaynaklı kanser oluşum riski yarattığı için normal dokuya göre kanserli kısımdan daha fazla radyasyon emilen dozu sağlayarak tümörü parçalamak için birçok açıdan şekillendirilmiş radyasyon ışın demetine maruz bırakılır. Cerrahi tedaviden başka, oligometastaz için özellikle diğer teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler selektif dahili radyasyon terapisi (SIRT), transarteriyel kemoembolizasyon (TACE), ve radyofrekans ablasyon (RA)'dur. RA lokalize olmuş hastalıkların tedavisinde önemli rol oynar fakat raporlar yüksek lokal nüksetme oranına sahip olduğunu açıkça belgelemişlerdir. Geliştirilmiş yeni teknikler, lokal nüksetme oranını iyileştirebilir ve cerrahi rezeksiyondan kaçınılan bir yönde değişir (Marshall 2008).

Kemoterapi

Kemoterapi, kanser tedavilerinin içerisinde en temel uygulamadır. Kemoterapi alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, bitkisel alkaloidler, antitümör antibiyotikler, enzimler, malign hücreleri yok eden, tümör büyümesini veya bölünmesini baskılayan biyolojik cevap değiştiriciler ve hormonlar gibi ilaç alımını içerir (Mishra ve ark 2013). Ancak, normal hücrelere zarar vermeden sadece malign hücreleri yok eden ilaç henüz mevcut değil ve bu ilaçların oldukça tehlikeli yan etkileri vardır (Marshall 2008). Metastatik kanser tedavisi çoğunlukla tümör regresyonuna sebep olan doğrudan sitotoksite yoluyla tümör hücrelerini öldürmek için farmasotik ilaçların verilme süreci veya metodu olan kemoterapiye dayanır. Bu ilaçlar DNA replikasyonuna ve kromozal ayrımı içeren hücre bölünme yollarına engel olmaktadır ve kanser hücrelerine spesifik değildir. Vücutta hızlı bir şekilde bölünen tüm hücreler hedeflenirken, ilacın sadece küçük bir kısmı hedeflenen dokuya ulaşır. Bu da ilaç terapisine ara verildikten sonra genellikle hücrelerin kendilerini tamir ettikleri yeni hücrelerle değişimin yüksek olduğu dokularda

(sindirim sistemi ve bağışıklık sistemi gibi) sağlıklı dokularında zarar görme riskini ortaya çıkarır (Mishra ve ark 2013).

Hedef Terapi

Son yıllarda kanser tedavisinde kanıtlanmış olan süreç oldukça dikkat çekmektedir. Cerrahi tekniklerde, radyasyon terapisinde ve yalnızca fluroürasilinle sınırlı tedaviye oksaliplatin ve irinotekanın eklendiği sistematik terapilerde birçok yenilik gerçekleşmiştir. Hedef terapi vasküler endotel büyüme faktör yolağına ve epitel büyüme faktör yolağına yönelik, kolorektal kanser tedavisinde önemli rol oynamaktadır (Gill ve ark 2007).

Hedeflenmiş ilaç gönderme sistemi, proksimal dokuda ilacın konsantrasyonu azalırken, kanser dokuda anti-kanser ajanlara odaklanmayı amaçlamıştır. Polimerik miçeller artırılmış geçiş ve alıkonma etkisini (enhanced permeability and retention effect(EPR)) kullanarak tümör dokularında ilacın birikimini artırır (Matsumura 2008).

İmmünoterapi

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kansere karşı savaşa yardım edebileceği gerçeğine dayanmaktadır (Carroll ve ark 2010). Bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerin kansere yakalanmaları daha mümkündür (Matsumura 2008). Bağışıklık sistemi kanser hücrelerini yabancı olarak tanımada başarısız olduğunda veya kanser hücrelerin normal hücrelerin antijenlerinden yeteri kadar farklı miktarda kendi antijenlerini ekspresyon etmediği durumlarda, bağışıklık sistemi normal olan kişilerde de kanser gelişebilir (Mishra ve ark 2013). Bazen bağışıklık sistemi kanser hücrelerini tanıyabilir, fakat vereceği cevap bu hücrelerin apoptozunu indükleyecek kadar güçlü değildir (Anaya ve ark 2011). Kanser hücreleri bağışıklık sistemini kontrol altında tutabilen immün baskılayıcıyı da kendileri gizleyebilir. Bunları aşmak için, araştırmacılar kanser hücrelerini tanıyarak ve onları yok edebilecek cevapları güçlendirerek bağışıklık sistemine yardım etmek için yollar aramaktadır. İmmünoterapinin uygulandığı tedaviler bu öncüllere dayanmaktadır. İmmünoterapi (biyolojik terapi veya biyoterapi) sadece kanser hücrelerini tespit etmek ve öldürmek için vücudun kendi bağışıklık sistemini güçlendirmez aynı zamanda birçok durumda tedaviyle ilgili yan etkileri azaltır. İmmünoterapi geleneksel terapilerin

dezavantajlarının çoğuyla ilişkilendirilmediği için onkolojide modern tedavi seçeneklerinin ayrılmaz parçalarından olmuştur (Mishra ve ark 2013).

Alternatif Tedaviler

Kolorektal kanserin evresine ve komplikasyonların derecesine bağlı olarak hastalara uygun olan birçok tedavi yöntemi vardır. Tüm terapilerin de kendi başarı oranları ve kısıtlamaları mevcuttur. Bir tedavinin etkinliği hastanın hayatta kalma oranına ve nüksetme düzeyine bağlıdır (Mishra ve ark 2013). Standart olarak uygulanan kanser tedavilerinin yeteri kadar etkili olamaması ve kısıtlamalarından dolayı alternatif terapilere hem araştırmacılar hem de hastalar yönelmektedir.

Fermente edilmiş buğday tohumu ekstratı (FWGE), anti-neoplastik kemoterapi ilacı dakarbazin ile birlikte verilen FWGE yaşam süresi ve anti-metastatik süreçte hastalar için önemli bir fayda göstermiştir. FWGE önemli anti-proliferatif etki göstermiştir ve kaspaz ve poli (ADP riboz) polimeraz bağımlı yolak yoluyla kanser hücrelerin apoptozunu artırmıştır. Ayrıca Major doku uygunluk kompleksi-I (MHC-I) ekspresyonun down regülasyonu ve TNF- α ve diğer interlökinlerin indüklenmesiyle bağışıklık sistemini düzenlemektedir (Mueller ve Voigt 2011).

Curcumin, zerdeçal baharatındaki aktif madde, kolonda kanserleşmeden önce oluşan polipleri olan hastalar için fayda sağlamaktadır ve kuersetin, soğanda bulunan antioksidan, poliplerin hem sayı hem de boyutunda önemli ölçüde düşüş sağladığı görülmüştür (Cruz-Correa ve ark 2006). Kolorektal kanserini tedavi etmek ve önlemek için curcuminin potansiyeli zerdeçalı çokça tüketen Asya toplumlarındaki gözlemsel çalışmalarda olduğu gibi zerdeçalla beslenen sıçanlarda yapılan çalışmalarda da ortaya çıkmıştır. Kuersetinin de anti-kanser potansiyele sahip olduğu birçok çalışmada görülmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre, bağırsak yolunda 5 ve daha fazla polip bulunan 5 familyal adenomatöz polipozis (FAP) hastasına günde 3 kez 480 mg curcumin ve 20 mg kuersetin verilmiştir. Ortalama 6 ay sonrasında tüm hastaların polip sayısında ve boyutunda düşüş görülmüştür. Ortalama polip sayısında %60 oranında, polip boyutunda %51 oranında çok minimal yan etkilerle azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu iki bileşikten curcuminin kanser düşmanı anahtar ajan olduğu düşünülmektedir (Cruz-Correa ve ark 2006).

Sarımsak, dialil disülfid (DADS) bir organosülfür bileşimidir ve saf sarımsak yağının temel bileşenlerinden biridir. Bu besinin tüketilmesinin kolorektal kanser gelişimini engellediğine inanılır. Detaylı mekanizması bilinmemesine rağmen, DADS'ın kanser hücrelerinde apoptoza sebep olan redoks stresi artırdığı görülmüştür. DADS ile muamele edilen HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı, kaspaz-3, kaspaz-9'un ve genomik DNA parçalanmasının aktive olduğu belirtilmiştir. DADS'ın bütiratla kombinlendiğinde HT-29 hücreleri üzerindeki apoptotik etki artmıştır (Altonsy ve Andrews 2011).

Kalsiyum ve D vitaminini nispeten yüksek oranda tüketen kişiler kolon kanserine karşı ciddi derecede korunduğu görülmüştür (Carroll ve ark 2010). Besinsel faktörler tüm dünyada yaygın olan kanserlerden biri olan kolorektal kanserin risklerinde önemli olanlardan biri olduğu düşünülmektedir. Kalsiyum takviyesi kolon poliplerine karşı koruyucu olabilir. Ratlarda kalsiyum ve α -tokoferol kimyasal olarak kolon kanser oluşumunu başlatırken, gönüllü insanlarda ilgili biyomarkerları azaltmaktadır (Carroll ve ark 2010).

Balık yağı takviyesi, balık yağı kanser hastaları için faydalı olabilir. Çokça balık yağı ve diğer omega-3 yağ asitlerini tüketen kişiler kolon kanseri olma riskini azaltabilmektedir (Kim ve ark 2010).

Nar, balık, süt, domates ve birçok doğal besinin anti-kanser aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Mishra ve ark 2013). Araştırmacılar yan etkisi minimal olan ya da hiç olmayan bu anti-kanser etkiye sahip birçok besinin etkisini bilimsel olarak araştırmakta ve hem bilime hem de kanserle mücadeleye katkı sağlamaktadır.

Kolorektal kanser için sağlıklı vücut ağırlığında olma, fiziksel olarak aktif olma, sigaradan uzak durma, kırmızı ve işlenmiş et ve alkol tüketimini azaltma gibi koruyucu önlemlere başvurulmalıdır (Ferrari ve ark 2007).

1.3. Hücre Proliferasyonu

Hücre proliferasyonunda hücre döngüsü boyunca bütün makromolekülleri kopyalamak için besin, enerji, biyosentetik aktivite gerekir. Birçok organın işlevini yerine getirebilmesinde, tümör oluşumunda ve embriyogenezde hücre proliferasyonu

önemli rol oynamaktadır (DeBerardinis ve ark 2008). Birçok hücre hattının ulaşılabilir olması ve tümör oluşumuna sebep olan genetik mekanizmalarının bilinmesinden dolayı tümör hücreleri çok kullanışlıdır (Gill ve ark 2007). Ancak tümör metabolizması, hücre proliferasyonu ile eş anlamlı olmadığı bilinmelidir. Proliferasyon tümör hücrelerinin büyümesi için gerekliyken, tümör microortamı içerisinde birçok faktör, heterojen metabolik aktivite ile sonuçlanan hücre metabolizmasını etkileyebilir. Tümör hücresinde üzerinde durulması gereken önemli nokta bu hücrelerin büyümesi ve proliferasyonuna yol açan metabolik aktivitelerdir (DeBerardinis ve ark 2008).

Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}), inhibisyona sebep olduğu bilinen maddenin tamamen inhibe edeceği konsantrasyonun yarısı anlamına gelmektedir. İnhibe etme özelliği araştırılan madde hücreyle muamele edilir ve canlı olan hücreler bazı yöntemlerle (MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), Alamar blue ve xCELLigence sistemi gibi) belirlenebilmektedir.

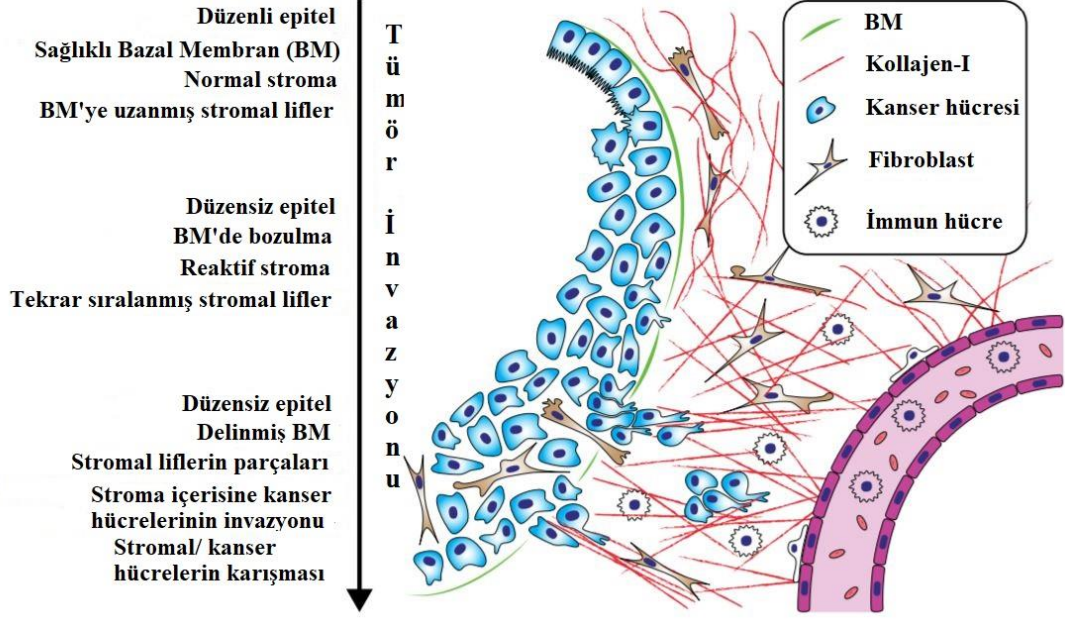
1.4. Kanser Metastazı ve İnvazyonu

Metastaz kanser hastalarının ölümüyle sonuçlanma nedenlerinden biridir. Kanser metastazı, kanser hücrelerinin tümörün olduğu yerden uzaktaki dokulara ve organlara yayılmasıdır ve bu yeni tümörlerin oluşumu kanser hastalarının ölmesine tek sebep olarak gösterilmektedir (Maghfoor 1999). Kanserın teşhis edilme zamanında, hastaların en az yarısı zaten klinik olarak teşhis edilebilen metastatik kanser hastaları oldukları görülmektedir (DeVita ve ark 1975).

Metastaz kanser hastalarının en çok korktukları durumdur. Bu süreç birçok tümör hücrelerinin metastazı tamamlayabilmesi için ardışık birbiri ardına sıralanan olaylardan oluşmasıdır ve süreç metastatik kaskat olarak isimlendirilir. Metastatik kaskad genel olarak üç ana süreçten oluşur: invazyon, intravazasyon ve ekstravazyon (Martin TA 2013). İnvazyon süreci; hücre-hücre adezyon kapasitesinin yeterli olmaması ve stroma çevresine yayılması için hücre-matriks etkileşimindeki değişimler malign tümör hücrelerinin tümör kitlesinden ayrılmasına sebep olur. Bu süreç bazal membran ve ekstraselüler matriksi parçalamak için bazı maddelerin salınmasını, hareketin ve göçün kontrolünden sorumlu proteinlerin ifade

edilmesini/baskılanmasını içermektedir. Besinlerin transferi ve 2 mm çapından daha büyük bir alanın yeterli olduğu tümör alanınınından atık ürünlerin atılması, yani tümör gelişimini devam ettirmek için tümör anjiyojenezi başlatmalıdır (Brooks 1996). İntravazasyon süreci boyunca; tümör çevresindeki kan hücreleri temas ettiği hücrelerden dolaşım sistemine girmek ve uzak yere metastaz yapmak için bir yol sağlayabilir (Folkman ve Shing 1992, Folkman 1996). Çevredeki stroma ve tümör hücreleri arasındaki etkileşim tümör anjiyojenezinin gelişimi için oldukça önemlidir (Ono ve ark 1999). Ekstravazasyon sürecinde; tümör hücreleri intravazasyon noktasına ulaşır ulaşmaz, biyokimyasal etkileşimleri başlatarak endotel hücrelerle etkileşime geçer, kuvvetli bağlar kurmak için endotel hücrelerle adezyonu geliştirir ve böylece endotel ve bazal membranın içerisine nüfus eder. Böylece yeni tümör oluşumları ikinci yerlerinde çoğalabilmektedir. Metastatik kaskad, hücreler arasındaki adezyonun eksikliğine primer tümördeki hücrelerin ayrışmasına ve hücre matriks etkileşimlerde hücredeki değişikliklerden kaynaklanan hücrelerin hareketliliğine bağlıdır (Martin TA 2013).

Tümörlerde, hipertropik hücre büyümeler, hücre-tabakalarından kalınlaşan epitel tabakanın oluşmasına neden olur. İleri evrelerde, hücreler arası etkileşimde ve sitoskeletal düzenlemede azalman dolayı tümör hücreleri apikal-bazal polaritelerini ve apikal silia özelliklerini kaybeder ve düzensiz görünebilir. Tümörün bulunduğu yerde, kanser hücreleri bazal membran tarafından hala çevrelenmektedir. Tümör hücreleri ve stromal hücreler arasındaki çatışmadan dolayı, stroma aktif hale geçer. Aktif stroma immün hücrelerin, fibroblastların artışıyla karakterize olmuştur ve bu ekstrasellüler matriksin depolanmasına ve stromal alanın tekrar düzenlenmesine yardımcı olabilmektedir. Stromal lifler gevşek bir şekilde organize olur ve kıvrılmış şekilde görülür ve daha sonra yoğunluğu artarak kalınlaşır. Daha sonraki evrelerde, kollajen kümeleri bazal membranı çevreleyen parçalar oluşturur. İnvaziv tümörlerde, tümör hücreleri stromaya yayılmak ve kan dolaşımına doğru göç etmek için bazal membranı geçer veya bozulmuş bazal membranın fonksiyon göstermediği yerlere doğru hareket eder. Stromal hücreler çeşitli birçok hücrenin karışmasına ve dokunun düzensizleşmesine neden olarak tümörün içine nüfus edebilir (Şekil 1.4) (Clark ve Vignjevic 2015).



Şekil 1.4. Kanser hücresinin invazyon aşamaları (Clark ve Vignjevic 2015).

Kolorektal kanser hücrelerinin invaziv özelliklerini etkileyen faktörler; hücreler arası bağlantılar, hücre- matriks etkileşimleri ve epitelyal mezenkimal geçiş başlıkları altında incelenebilmektedir (Clark ve Vignjevic 2015) .

1.4.1. Hücreler Arası Bağlantılar

Hücre-hücre adezyon kompleksi apikalden bazal membrana kadar uzanır ve sıkı bağlantı (tight junctions), adherens bağlantılar (AJ), gap bağlantılar (GJ), desmozomlar ve integrinlerden oluşmaktadır (Martin TA 2013).

Sıkı Bağlantı (Tight Junctions (TJ))

Endotel hücrelerdeki TJ'lar moleküllerin ve inflamasyon hücrelerinin geçebildiği bariyer olarak görev yapmaktadır. Ayrışmış kanser hücrelerinin vasküler endotel geçirgenliği ve etkileşimi kanser metastazı oluşumundan önemli bir aşamadır. Metastazın gerçekleşmesi için TJ kanser hücrelerinin aşması gereken ilk bariyerdur. İlgili TJ proteinlerinin up regülasyon veya down regülasyon olması durumunda, kanser hücrelerindeki herhangi bir değişim hücrelerin ayrışmasıyla, hücre haberleşmesinin inhibe olmasıyla kontrol dışı hücre büyümesiyle, adezyon eksikliğiyle ve bazal membranın bozulmasıyla sonuçlanır (Martin TA 2013).

Adherens Bağlantılar (AJ)

AJ'lar TJ'ın bazal tarafına lokalize olmuş ve yapışkan kuvvet oluşturan hücre mikrodomanlardır (Giepmans ve van Ijzendoorn 2009). AJ'deki integral membran proteinleri cadherin ailesindendir ve epitelde en çok bulunanı E-cadherindir. Kanseri hücrelerin ayrışmasının ve yayılmasının kontrolünde katenin kompleksinin ve E-cadherin'in önemli rolü olduğu yönünde birçok kanıt toplanmıştır. Tümör malignitesinin özelliği olan tümör invazyonu ve metastazında hücre-hücre adezyon aracılığıyla E-cadherinin eksikliğiyle karşılaşılır. E-cadherinlerin ekspresyonu hemen hemen tüm kanserlerde down regüle olduğu görülmüştür (Cavallaro ve Christofori 2004). İşlevsel E-cadherin adezyon kompleksinin yeniden oluşması farklı tümör hücre tiplerinin invaziv fenotiplerini baskıladığını birçok çalışma göstermektedir (Vleminckx ve ark 1991, Luo ve ark 1999, Hsu ve ark 2000).

Desmozomlar

Hücreler arası bağlantılarda, desmozomlar integral proteinlerin (desmoglein and desmoglein) desmoplaklar ile bağlanmasıyla oluşan dokuların içindeki hücrelerin devamlılığını sağlamak için gerekli olan yapışkan bağlantılar oluşturur (Garrod ve Chidgey 2008, Giepmans ve van Ijzendoorn 2009).

Farelerin genetik yaklaşımlarından faydalanarak yapılan son zamandaki çalışmalar, erken invazyon ve tümör gelişimini sürdürmek için adherens bağlantılardan önce olan desmozom down regülasyonunun görülmesi tümör baskılanmasında desmozomların rolü olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Dusek ve Attardi 2011).

Gap Bağlantılar (GJ)

GJ'lar, küçük moleküllerin, ikincil mesajcıların, iyonların ve komşu hücreler arasındaki diğer moleküllerin difüzyonuna izin veren hücreler arasındaki özel kanallardır. Bu kanallar, insanda tanımlanan 20'nin üzerinde üyesi olan konneksinleri (en çok ifade edileni konneksin 43) içeren integral membran proteinlerinden oluşan bu kanallar birçok aşamada düzenlenen dinamik bir süreç sonucunda açılabilir ya da kapanabilirler (Giepmans ve van Ijzendoorn 2009).

Sirnes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kolorektal kanser tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı ve kolorektal kanser gelişimi boyunca konneksin43 ekspresyonunun eksikliği hastaların yaşam sürelerinin azalmasıyla ilişkili olduğu ilk kez kanıtlanmıştır. Kolorektal kanser hücre hatlarında konneksin43'ün down regüle olması veya düzensiz yerleşmesi, hücreler arası gap bağlantılarıyla iletişim eksikliğiyle ilişkilendirilmektedir. Konneksin43'ün kolorektal kanser tümör baskılayıcısı olduğunu klinik sonuçlarda desteklemektedir (Sirnes ve ark 2012).

İntegrinler

İntegrinler, iki tane ayrı α ve β alt ünitelerden oluşan büyük ve kompleks transmembran glikoproteinlerdir. İntegrinler hücre adezyonuna, ekstrasellüler matriksin doğrudan bağlanan fibronektin, vitronektin, laminin veya kollajen gibi parçalarına aracılık eder ve hücre hareketine ve invazyonuna destek sağlar (Bendas ve Borsig 2012).

Selektinler

Selektinler, (E-selektin, P-selektin ve L-selektin) enfeksiyon ya da yaralanmaya karşı inflamatuvar cevap boyunca dolaşımdaki lökositlerin vasküler endotele bağlanmasında önemli olan adezyon molekülleridir. Selektinler damarların yüzeyini çevreleyen kanser hücrelerinin adezyonunu düzenlediğini birçok kanıt göstermektedir (St Hill 2011).

1.4.2. Hücre Matriks Etkileşimleri

Ekstrasellüler matriks ve hücreler arasındaki kontrollü etkileşim, normal gelişim, migrasyon ve proliferasyon gibi birçok süreç için önemlidir (Giepmans ve van Ijzendoorn 2009). Hücre ve matriks arasındaki etkileşim; integrinler, selektinler, cadherinler, immünoglobülinler süper familyası (Ig), CD44 ve fokal adezyonları içeren hücre adezyon molekülleri (CAM) gibi birçok yol aracılığıyla gerçekleşebilir (Martin TA 2013).

Hücre Adezyon Molekülleri (CAM)

Hücre adezyon molekülleri (CAM) hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması gibi hücresel süreçleri kolaylaştırır ve yetişkinlerde doku yapısı ve bütünlüğünü sağlamak için ve gelişimi boyunca önemlidir. CAM'lar integrinler, selektinler immünoglobülinler süper familyası (IgSF) ve cadherinlerden oluşmaktadır. Normal dokuda, CAM ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Ancak, CAM'ların anormal ekspresyonu normal hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine zarar verir ve tümör oluşumu ve metastazı kolaylaştırabilir. IgSF üyelerinin çoğu kanser ilerleyişinde biyomarker olarak tanımlanmaktadır ve birçok tümörün metastatik gelişimiyle ilişkilidir (Wai Wong ve ark 2012).

CD44

CD44 hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini içeren çok fonksiyonlu hücre yüzey adezyon molekülüdür ve tümör hücre invazyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Martin TA 2013). Short hairpin RNA (shRNA) yoluyla CD44'ün susturulması hücre proliferasyonunu inhibe eder ve hücre apoptozunu başlatır, ki bunun insan kolon kanserinde terapötik tedavi olarak kullanılması önerilmektedir (Park ve ark 2012).

1.4.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

Hücre Hareketliliği

Kanser hücrelerinin metastatik karakterini şekillendiren en büyük faktör onların hareketliliğidir. Hücre hareketliliği ve migrasyonu normal gelişim için önemlidir ve organojenezin, enflamasyonun ve yara iyileşmesinin en büyük parçasıdır. Ancak, düzenlenmesine yönelik sinyal yolağındaki değişimler hücre invazyonu ve metastazın patolojik süreçlerine neden olabilmektedir (Martin TA 2013).

Matriks Metaloproteinazlar (MMPs)

Matriks metaloproteinazlar, kanser hücrelerin yayılmasına ve göç etmesine izin veren ekstrasellüler matriks proteinlerinin bozularak hücre invazyon kapasitesini gösteren önemli parçalardan biridir (Martin TA 2013).

1.5. *Ficus carica*

1.5.1. *Ficus carica* Taksonomi

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Hamamelidae

Takım: Urticales

Aile: Moraceae

Cins: *Ficus*

Tür: *Ficus carica* L.

1.5.2. *Ficus carica* Hakkında Genel Bilgi ve Kaynak Araştırması

Ficus carica (*F.carica*) (Şekil 1.5) kışın yapraklarını döken, dünyada hem kuru hem de taze tüketimde önemli olan ve en erken ekimi yapılan meyve ağaçlarından biri olan *Moraceae* ailesine aittir (Çizelge 1.1). Dünya incir tüketiminin %70'ini Akdeniz sahillerinde bulunan ülkeler karşılamaktadır. Bu ülkelerde, uzun en sağlıklı ve en uzun hayata sahip olmakla ilişkili olduğunu düşünülen Akdeniz diyetinin en önemli parçasını incirler oluşturmaktadır (Trichopoulou ve ark 2006).



Şekil 1.5. Akseki/Antalya bölgesinden toplatılan olgun ve ham incir numuneleri.

Çizelge 1.1. *F. carica* meyvesinin genel özellikleri (TÜBİVES 2018)

Ömür	Çok yıllık
Yapı	Ağaç
Çiçeklenme	3-9
Habitat	Açık alanlar, karışık ormanlar, taşlı yamaçlar, vadiler, kaya oyuklar
Yükseklik	20-1770
Endemik	Endemik değil
Türkiye dağılımı	Adana, Gaziantep, İstanbul, Zonguldak, Kastamonu, Antalya, Aydın, Bilecik, Elazığ, Erzurum, Eskişehir, İzmir, Kırklareli, Malatya, Muğla, Ordu, Sinop, Trabzon

İncirin meyvesi, kök ve yaprakları gastrointestinal (kolik, sindirim, iştahsızlık ve diyare), respiratuar (zatüre, öksürük, bronşiyal hastalıklar) ve kardiyovasküler bozukluklar ve anti-inflamatuar ve anti-spazmodik tedaviler gibi birçok hastalığı tedavi etmek için geleneksel tıpta kullanılmaktadır (M.Werbach 1993, J. A. Duke 2002).

İncirle ilgili daha önce yapılan kimyasal çalışmalar fenolik asit, komarin ve triterpenoidlerin izolasyonuna sebep olmuştur (Saeed ve Sabir 2002, Oliveira ve ark 2009, Liu ve ark 2011, Mawa ve ark 2013) ve farmakolojik araştırmalar antioksidan, antikanser ve hepatoprotektif etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Rubnov ve ark 2001, Gond ve Khadabadi 2008, Caliskan ve Polat 2011, Mawa ve ark 2013).

F. carica lateks enjeksiyonu, benzopirenle indüklenmiş sarkomanın büyüme hızını değiştirdiği ve albino ratlarda küçük tümörleri baskıladığı görülmüştür. 6-O-açıl- β -D-glukosil- β -sitosterol (6-AGS) gibi biyoaktif bileşikler incir lateksden izole edilmiştir. AGS'nin palmitoil türevi, linoleil, stearil ve oleil türevleriyle kıyaslandığında birçok kanser hücre hatları için daha çok potansiyele sahip inhibitör olarak rol oynamaktadır ve AGS in vitro DG-75, Jurkat ve DU-145 kanser hücre

hatlarının inhibitörü olduğu rapor edilmiştir. Bu yüzden, AGS yüksek potansiyele sahip antikanser ajandır (Rubnov ve ark 2001).

F. carica lateks ve türevleri farede transplantasyon yapılan ve spontane gelişen tümörlerin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Ullman 1952, Ullman ve ark 1952). *F. carica* lateks, in vitro, mide kanseri hücre hattının proliferasyonunu inhibe etmiştir fakat normal hücrelere karşı herhangi bir sitotoksik aktivite göstermemiştir (Hashemi ve ark 2011).

F. carica lateks kanser hücrelerinin DNA sentezini inhibe ederek ve kanser hücrelerini G0/G1 fazında durmasına sebep olarak yüksek antioksidan etkiye sahiptir. *F. carica* lateksten elde edilen bazı bileşenler yeni ve potansiyel anti-kanser ajan olarak hizmet edebilir ve özellikle anti-kanser aktivitesini kanıtlamak için hayvan tümörüyle ilgili daha fazla in vivo araştırma yapılması gerekmektedir (Wang ve ark 2008).

F. carica yaprakları kabuk ve odunsu kısımlarıyla kıyaslandığında daha iyi antioksidan ve anti-proliferatif aktivite göstermektedir. Özellikle, yapraklarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 64 ve 1.48 µg/ml olan en yüksek peroksidasyon inhibisyonuna ve anti-radikal aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir. Yaprakları 3.92 µg / ml IC₅₀ değeriyle yüksek anti-proliferatif aktiviteye sahiptir. Bu çalışma non-melanom cilt kanserlerinin tedavisi için fotodinamik terapide potansiyel faydalı formülasyonların geliştirilmesine yeni bir yaklaşım sunmaktadır (Conforti ve ark 2012).

A375 (melanom) insan tümör hücre hattı üzerinde, *F. carica* meyvesinden elde edilen lateks 0.05 mg/ml IC₅₀ değeriyle anti-radikal aktiviteye sahipken, yapraklardan elde edilen lateks 1.5 µg/ml IC₅₀ değeriyle en yüksek anti-proliferatif aktiviteye sahiptir (Menichini ve ark 2012).

***F. carica* Ekstraktının HPLC Analizi ve Sonuçları**

Su-metanol ile ekstrakte edilen *F. carica*'nın HPLC analizi ikili(binary) pompa ve diyot dizi dedektörünü içeren (DAD) Shimadzu HPLC sistemle (LC-10A series, Tokyo, Japan) gerçekleştirilmiştir ve Shim-pack RP-C18 kolonla (5 µm, 250 mm×4.6 mm) (Shimadzu Co., Japan) donatılmıştır. HPLC analizi için örnek

hazırlığı: *F. carica* ekstraktı 10 000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş, oda sıcaklığında Millipore filtre (0.22 µm naylon membran) kullanılarak filtrelenmiş ve analiz için HPLC içerisine enjekte edilmiştir. Örneklerdeki fenolik bileşenler, 35 °C’de mobil fazla (solüsyon A: 0.1% formik asit, solüsyon B: 100% metanol) analiz edilmiştir. Akış hızı 0.8 ml/dakika ve enjeksiyon hacmi 10 µL’dir. Deteksiyon 280 nm’de görüntülenmiştir (Escarpa ve Gonzalez 1998, Manal Said Tawfik 2014).

HPLC analizi sonucunda *F. carica*’da bulunan fenolik bileşikler ve konsantrasyonları Çizelge 1.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.2. *F. carica*’daki fenolik bileşiklerin konsantrasyonları (mg/100g kuru ağırlık) (Manal Said Tawfik 2014).

Bileşikler	mg/100g kuru ağırlık
Gallik asit	30.99 ± 2.5
Epigallokateşin	25.44 ± 1.8
Kafein	20.23 ± 2.1
Kateşin	13.88 ± 3.1
Epikateşin	12.48 ± 1.6
Rutin	3.26 ± 1.3
Epigallokateşin gallat	2.52 ± 0.5
Epikateşin gallat	0.85 ± 0.4
Kuersetin	0.56 ± 0.7
İsorahmentin	0.29 ± 0.07
Kaempferol	0.12 ± 0.05

Analiz sonucuna göre *F. carica* ekstaktında en yüksek konsantrasyonda bulunan gallik asiti, epigallokateşin takip etmiştir ve isorahmentin ve kaempferol en düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Manal Said Tawfik 2014).

1.6. İncir Çekirdeği Yağı

Dünya çapında doğal bitki kaynaklarından elde edilen yağlardan şifa sağlamaya ve istifade etmeye yönelik ilgi artmıştır. Yüksek miktarına oranla daha az lipit bileşeni olan bitkisel yağlar insan sağlığı için büyük öneme sahiptir (Carvalho ve ark 2006).

Bitki çekirdeklerinden, özellikle *F.carica* çekirdeği, elde edilen yağlar yeni yağ kaynaklarını oluşturmaktadır. İncir çekirdeği yağının biyokimyasal bileşenleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. *F.carica* meyvesi yüksek fenolik antioksidan miktarına sahiptir ve meyveden elde edilen antioksidanlar, oksidasyon sırasında insan plazmasındaki lipoproteinleri koruyabilir ve tüketildikten sonra plazmadaki antioksidan kapasitenin ciddi bir artışına neden olabilmektedir (Vinson ve ark 2005).

F. carica çekirdek yağının total fenolik, flavonoid ve o-difenol içerikleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu bileşikler antioksidan aktiviteyle ilişkili olan biyoaktif potansiyelli ikincil bitki metabolitlerinin en büyük sınıfını oluşturur (R. Ahmad 2011).

F. carica çekirdeği yağı 144.89 mg/ kg fenolik içeriğe ve 47.27 mg/kg o-difenole sahiptir. Total flavonoid içerik ise 124.5 mg/kg'dır (Soltana ve ark 2016).

Tokoferol, düşük konsantrasyonlarına oranla çok etkili antioksidan aktivitelerinden dolayı bitkisel yağların kalitesinde önemli rol oynar. HPLC analizleri gama-tokoferol incir çekirdeği yağındaki en etkili izomer olduğunu göstermektedir. İncir çekirdeği yağındaki gama-tokoferol içerik 2.23 µg/g'dır (Soltana ve ark 2016). Benzer şekilde, gama-tokoferol ve alfa-tokoferol sırasıyla 0.3 ve 0.2 mg/100 g miktarlarında incir meyvesinde bulunan iki tokoferol izomeridir (Pande ve Akoh 2010). Gama-tokoferol, alfa-tokoferolden ya aynı ya da daha yüksek antioksidan özelliklere sahiptir ve fındık gibi yüksek oranda gama-tokoferol içeren gıdaların kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azalttığı düşünülür (Saldeen ve ark 1999, Li ve ark 2007).

Yapılan bir çalışmada, incir çekirdeği yağının yağ asitleri analizinde; iki temel yağ asidinden biri olan linolenik asit (47.77%) ve linoleik asit (25.48%) ve bunları oleik asit (14.7%),palmitik asit (8.3%) ve stearik asit (2.94%) izlemektedir. Bunlara ek olarak, incir çekirdeği yağında az miktarlarda (0.15–0.29%) gadoleik, palmitoleik ve araşidik asitler bulunmaktadır. Eser miktarda (<0.1%) margarik, trans-oleik, trans-linoleik ve margaroleik asit tespit edilmiştir (Soltana ve ark 2016).

Bir başka çalışmada, jel incir çekirdeğinden izole edilen yağda, 91.51% doymamış yağ asitlerinin içerisinde en etkili yağ asitlerinden linolenik asit (62.65%),

linoleik asit (18.24%) ve oleik asit (10.62%) bulunduğu gösterilmiştir (Chua ve ark 2008).

Omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin ve besinsel esansiyel yağ asitlerinin bir üyesi olan alfa-linolenik asit (Burdge ve Calder 2005), koroner kalp hastalığına karşı koruyabilir (Wijendran ve Hayes 2004). Linoleik asit, anti-inflamatuvar, akne azaltıcı, nem tutucu gibi ciltteki faydalı özelliklerinden dolayı kozmetik sektöründe artan popülariteye sahiptir (Letawe ve ark 1998, Darmstadt ve ark 2002).

İncir çekirdeği yağı steroller açısından oldukça zengindir. Total sterol içerik 1061.45 mg/100 g olarak bulunmuştur (Soltana ve ark 2016). Sterollerin birçok kanser riskini azalttığı ve bağışıklık fonksiyonunu artırdığı bilinmektedir (Bouic 2001).

İncir çekirdeği yağı ile yapılan 2,2 ' -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürücü aktivite yöntemi sonucunda IC₅₀ değerı 215.86 µg/ml, troloks eşdeğerı antioksidan kapasite tayin yöntemi (TEAC) sonucunda ise 95.25 mM elde edilmiştir. İncir çekirdeği yağının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görölmektedir (Soltana ve ark 2016). İncir çekirdeği yağından elde edilen bu yüksek antioksidan aktivitenin fenolik içerik (144.89 mg/kg) yönünden zengin olmasıyla ilişkilendirilebilir (Soltana ve ark 2016).

GC-MS analizleri incir çekirdeği yağının 26.50% oranında doymuş yağ asitlerinden, 73.50% doymamış yağ asitlerinden olduğuunu göstermektedir. Ayrıca oleik asit (51.41%), palmitik asit (19.45%) ve palmitoleik asit (14.76%) incir çekirdeği yağında bulunan diğer başlıca yağlardır (Wang 2013).

1.6.1. İncir Çekirdeği Yağı Analizleri

İncir çekirdeği yağı ticari olarak Zade Vital firmasından temin edilmiştir. İncir çekirdeği yağında bulunan yağ kompozisyonu Shimadzu GC FID 2010 cihazıyla (Çizelge 1.3) ve E vitamini analizi Shimadzu HPLC Floresans dedektör (Çizelge 1.4) ile firma tarafından analiz edilmiş ve bilimsel kullanım için izin alınmıştır.

Çizelge 1.3. İncir çekirdeği yağının % yağ asitleri analizi.

Yağ Asitleri	Sonuçlar (%)
Palmitik Asit (C-16:0)	6,72
Stearik Asit (C- 18:0)	2,69
Oleik Asit (C-18:1)	16,71
Linoleik Asit (C-18:2)	33,24
Linolenik Asit (C-18:3)	39,97
Araşidik Asit (C-20:0)	0,18
Eikosenik Asit (C-20:1)	0,23
Behenik Asit (C-22:0)	0,07

İki büyük yağ asitlerinden biri olan linolenik asit %39,97 iken linoleik asit %33,24 bir orana sahiptir. Bunları sırayla oleik asit (%16,71), palmitik asit (%6,72) ve stearik Asit (% 2,69) takip eder. Ayrıca, incir çekirdeği yağı araşidik asit, eikosenik asit ve behenik asit (%0,23- 0,07) küçük oranlarda bulunmaktadır.

Çizelge 1.4. İncir çekirdeği yağının E vitamini (tokoferol) analizi.

E vitamini	Sonuçlar (mg/kg)
Alfa- tokoferol	120
Beta- tokoferol	0
Gama- tokoferol	4800
Delta- tokoferol	80

Çizelge 1.4’de gösterildiği gibi incir çekirdeği yağında 4800 mg/kg gama-tokoferol bulunmaktadır. Bunu sırayla 120 mg/kg ile alfa-tokoferol ve 80 mg/kg delta-tokoferol izlemektedir. Yapılan analizde beta-tokoferol tespit edilememiştir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kullanılan kimyasal malzemeler ve temin edildiği firmalar.

Kullanılan Kimyasallar	Temin Edilen Firma
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (A7511)
Alamar blue	Invitrogen Life Technologies
McCoy's 5A (hücre besiyeri)	ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)
RPMI 1640 (hücre besiyeri)	ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)
Fetal bovine serum (FBS)	DE14-801FH
L-glutamine	Biological Industries (1328110, Kibbutz Beit-Haemek, Israel)
Penicillin/streptomycin	Biochrom GmbH (12247, Berlin, Almanya)
Methanol	Sigma-Aldrich (24229)
Gallik asit	Sigma-Aldrich (G7384)
Askorbik asit	Sigma-Aldrich (PHR1008)
Trolox	Sigma-Aldrich (238813)
Folin - Ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich (F9252)
Sülfirik asit (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich (339741)
Sodyum fosfat	Sigma-Aldrich (342483)
Amonyum molibdat	Sigma-Aldrich (A1343)
DMSO: Dimetil Sülfoksit	Merck (1.16743.1000)
Trypsin- EDTA (% 0.25)	Sigma-Aldrich (T4049)
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich (P4417)

Çizelge 2.1 (Devam). Kullanılan kimyasal malzemeler ve temin edildiği firmalar.

Borax (disodium tetraborate decahydrate)	Sigma-Aldrich (S9640)
Toluidine blue	Sigma-Aldrich (89640)
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich (S7795)
Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O)	Sigma-Aldrich (71649)
Tripan blue	Sigma-Aldrich (T6146-1006)
Formaldehit (% 37)	Sigma-Aldrich (8.18708)

2.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan cihazlar ve kullanım amacı Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihazın Adı/ Modeli	Kullanım Amacı
CO ₂ inkübatörü/ Binder	Hücre kültürlerinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeleri ve büyütülmesinde kullanılmıştır.
pH metre / Thermo Orion 420A+ marka cam elektrot	Deneyde kullanılan çözeltilerin pH ayarlamalarını yapmak için kullanılmıştır.
Laminar akımlı kabin	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Santrifüj / Antech	Hücrelerin ayırma işlemleri için kullanılmıştır.
Analitik terazi / ANT HR250Az	0.0001 g duyarlıdaki tartım işlemlerini yapabilmek kullanılmıştır.
-20°C Buzdolabı / Samsung	+4 ve -20 °C'de saklanması gereken kimyasalları, hücre kültürü malzemeleri ve <i>F. carica</i> ekstraktlarını muhafaza etmek için kullanılmıştır.
-80°C Buzdolabı / VWR Symphon	<i>F. carica</i> örneklerini, hücreleri saklamak için kullanılmıştır.
Inverted Mikroskop / VWR	Hücrelerin görüntülenmesi ve takibinde kullanılmıştır (Şekil 2.1)
Fluorescent Cell Imager	İnvazyon deneyi sonucunda hücrelerin sayımı ve görüntülenmesi için kullanılmıştır (Şekil 2.3)

Çizelge 2.2 (Devam). Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

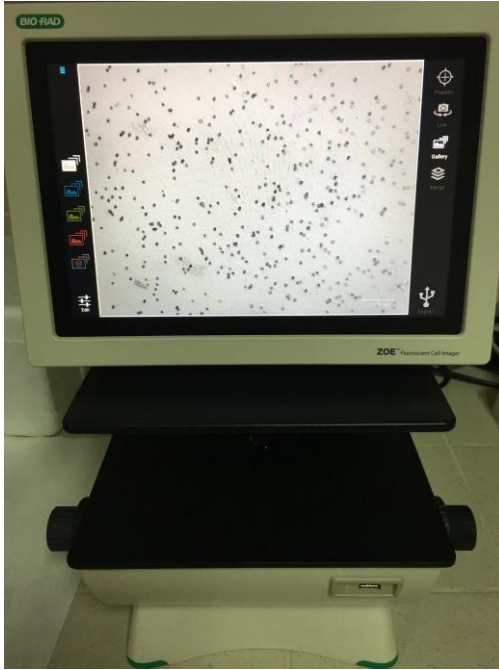
Hücre Sayım Cihazı / BIO-RAD TC10™ Automated Cell Counter	Hücre sayımı yapmak için kullanılmıştır (Şekil 2.2)
Su banyosu / Wisebath	Donmuş hücreleri çözmek, sıcaklığı 37 °C'ye getirilmesi gereken hücre besiyeri ve diğer sıvı malzemeler için kullanılmıştır.
Otoklav / Nüve	Steril olması gereken malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.
Deiyonize ultra-saf su cihazı / Elga	Ultra saf su elde etmek için kullanılmıştır.
Spektrofotometre/Thermo multiscan-90	Toplam antioksidan, fenolik ve antioksidan aktivite analizleri ve Alamar blue yöntemi analizlerini yapmak için kullanılmıştır.
Homojenizatör/WiseTis Homogenizer with Remote Digital Controller	<i>F. carica</i> meyvelerinin ekstraksiyon işlemleri için kullanılmıştır.
Rotary Evaporatör/Scilogex RE100-Pro Rotary Evaporatör	<i>F. carica</i> meyvelerinin ekstraksiyonu sonrasında çözücülerinin uzaklaştırılması için kullanılmıştır.
Liyofilizatör/Scanvac CoolSafe Freeze Dryer	<i>F. carica</i> meyvelerinin liyofilizasyonu için kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Inverted Mikroskop



Şekil 2.2. Hücre Sayım Cihazı / BIO-RAD TC10™ Automated Cell Counter



Şekil 2.3. Fluorescent Cell Imager

2.1.3. Sarf Malzeme

- Çift kuyucuklu lam
- Balon joje
- Azot tankı
- Steril filtre
- Flask
- Falcon tüp
- Kriyo tüp
- Serolojik pipet: Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, bulk packed (5, 10, 25 ml)
- Mikropipet (1000, 200, 10µl)
- Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber

2.2. Yöntemler

2.2.1. Bitki Materyali

Ham ve olgun *F. carica* meyvelerinin metanol ve su ekstraktlarının kolorektal kanser hücre hatlarının proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ham ve olgun *F. carica*, koordinatları Kuzey: 37° 02' 23" ve Doğu: 31° 46' 48" olan 1110 metre rakımda bulunan Akseki/ Antalya bölgesinden Ağustos 2016 tarihinde toplatılmıştır. Meyveler ekstraksiyon işlemlerine kadar göre -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. *F. carica* Ekstraksiyonları

Liyofilizasyon süblimasyon yoluyla buzun ya da diğer donmuş çözücülerin materyalden uzaklaştırılması esasına dayanan soğuk kurutma yöntemidir (Bhalerao 2017). Kontrollü soğuk kurutma, işlem süreci boyunca kurutma esnasında materyalin görünüşünde ve yapısında oluşabilecek değişiklikleri engellemek için materyali düşük sıcaklıkta tutar. Özellikle ısı duyarlılığı olan protein, enzim ve organik bileşikler gibi birçok hassas molekül barındıran materyallerin kurutulmasında tercih edilir. Çalışmada bu sebeplerden dolayı ham ve olgun *F. carica* numuneleri liyofilizatörde liyolifize edilmiştir (Şekil 2.4). Liyofilizatörde buzun hazne sıcaklığı -

110 °C ve basınç 0.093 Pa olarak ayarlanmıştır. Örnekler tamamen kurutulduktan sonra blenderda un haline getirilmiştir ve ardından ekstraksiyon işlemlerine kadar -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 2.4. Ham ve olgun *F.carica* meyvelerinin liyofilizasyonu.

Ham ve Olgun *F. carica*’nın Su Ekstraksiyonu

İlk önce 1 gram liyofilize edilmiş ham ve olgun *F. carica* homojenizatör kullanılarak 20 mL distile su içerisinde ekstrakte edilmiştir (Şekil 2.5.)



Şekil 2.5. Ham ve olgun *F.carica* meyvelerinin homojenizatörle ekstraksiyonu.

Ardından ekstraksiyonlar $4000\times g$ 'de 10 dakika boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilmiştir ve cam balon joje içerisine supernatant toplanmıştır. Pellete 20 mL su ilave edilerek homojenizatörde ekstrakte edilmeye devam edilmiştir. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanmış ve toplam su hacmi 80 ml ile sınırlandırılmıştır.

Ekstraksiyonda kullanılan su rotary evaporatör ile uçurulmuştur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ekstraksiyonların çözücülerinin rotary evaporatörde uçurulması.

Çözücüsü uçurulmuş ekstraksiyonlar sonraki çalışmalara kadar -20°C 'de saklanmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Çözücülerini uçurulmuş olan ekstraksiyonlar.

Ham ve Olgun *F. carica*'nın Metanol Ekstraksiyonu

Liyofilize edilmiş ham ve olgun *F. carica*'dan 1 gr alınarak 20 mL metanol çözücü eklenerek homojenizatörde ekstrakte edilmiştir (Şekil 2.5). Ardından ekstraksiyonlar 4000×g'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edilerek cam balon joje içerisine supernatant toplanmıştır. Pellete 20 mL metanol ilave edilerek ekstraksiyon işlemleri son metanol hacmi 80 mL olana kadar tekrarlanmıştır. Ekstraksiyonda kullanılan metanol Şekil 2.6'da görülen rotary evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Çözücüsü uzaklaştırılmış ekstraksiyonlar sonraki çalışmalara kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.2.3. Toplam Antioksidan, Fenolik ve Antioksidan Aktivite Analizleri

Toplam Fenolik Madde Tayini

Numunelerin total fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu prosedürü kullanılarak belirlenmiştir (V. L. Singleton 1965, Akbulut ve ark 2009). Bir tüp içerisine 0.5 mL ekstraktan (1 mg/ mL) alındıktan sonra, üzerine 2.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (0.2 N) ve 2.0 mL sodyum karbonat (75 g/ L) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Örnekler karanlık ortamda 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu işlemler tüm ekstraksiyonlar için ayrı ayrı uygulanmıştır. Kalibrasyon eğrisi ve sonuçları oluşturmak için 5-100 ppm konsantrasyonlarda gallik asit standart çözeltileri miligram gallik asit (GAE)/ kg kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Ekstraktların total fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu methodu ile standart olarak gallik asit kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrarlanmıştır.

Toplam Antioksidan Kapasite Testi

Total antioksidan kapasite fosfomolibdat testi ile belirlenmiştir (Pilar Prieto 1999). Metodun esası Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesi ve asidik ortamda yeşil renkli fosfat/ Mo (V) kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır.

Bitki ekstraktlarının konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Standart olarak ise askorbik asit 0.5 mg/mL ile 0.0375 mg/mL arasında beş farklı konsantrasyonda kullanılmıştır. Metotta kullanılacak reaktif çözeltisi için; her

birinden 25 mL olacak şekilde 0,6 M H₂SO₄, 28 mM Na₂HPO₄.12H₂O ve 4 mM amonyum molibdat hazırlanarak karıştırılmış ve reaktif çözeltisi hazır hale getirilmiştir.

Konsantrasyonu 1 mg/ ml olan ekstraktan 0,1 ml bir tüpe alınıp ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden 1 ml eklenmiştir. Tüpler karıştırılıp 95°C’de 90 dakika boyunca thermal block’ta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözeltiler oda sıcaklığına getirilip absorbansları 695 nm’de spektrofotometrede ölçülmüştür. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan askorbik asit için de yapılmıştır. Antioksidan aktivite Askorbik asit Eşdeğeri (mgAE/ g) olarak hesaplanmıştır. Tüm işlemler diğer ekstraktlar içinde yapılmış ve deneyler bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır (Pilar Prieto 1999).

Antioksidan Aktivite Testi

Antioksidan aktivite 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioksidan testine göre belirlenmiştir (W.Brand-Williams 1995). Ekstraktan alınan 0.1 mL (1 mg/ mL) üzerine 3.9 mL metanolde çözünmüş DPPH (6×10^{-5} M) eklenmiştir. Normal şartlar altında 30 dakika inkübe edildikten sonra 515 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Standart olarak 0.03-0.5 mM aralığında 5 farklı konsantrasyonda Troloks standart çözeltileri hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite prosedürleri standart çözelti olan Troloks için de tekrarlanmıştır. Sonuçlar mmol Troloks Eşdeğeri TE/kg kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Tüm işlemler diğer ekstraktlar içinde ayrı ayrı yapılmış ve deneyler bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.4. İncir Çekirdeği Yağının Temini

İncir çekirdeği yağı ticari olarak Zade Vital firmasından temin edilmiştir. İncir çekirdeği yağı soğuk sıkım ve GMP (Good Manufacturing Practices) onaylı olduğu için tercih edilmiştir.

2.2.5. Hücre Kültürü

Hücre Hatları ve Besiyerleri

Bu çalışmada, ham ve olgun *F. carica* meyvelerinin su ve metanoldeki ekstraktlarının kolorektal kanser hücre hatları HT-29, DLD-1 ve sağlıklı epitel hücre hattı PNT1A üzerindeki proliferasyonu ve kanser hücrelerinin invaziv özelliği üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan HT-29 ve DLD-1 kolorektal kanser hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) firmasından temin edilmiştir. Sağlıklı epitel hücre hattı PNT1A ise Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Aynı kanser türüne ait hücre hatları olmasına rağmen fizyolojik ve metabolik özelliklerinin farklı olabileceği, *F. carica* ekstraktlarından farklı ölçüde etkilenebileceği ve aynı zamanda yapılan çalışmanın bilimsel olarak daha anlamlı ifade edilebilmesi için iki farklı kolorektal kanser hücre hattı (HT-29 ve DLD-1) seçilmiştir. Kanser hücre hatlarında elde edilen sonuçları sağlıklı hücrelerde elde edilen sonuçlarla kontrol etmek amacıyla sağlıklı epitel hücre hattı PNT1A kullanılmıştır.

HT-29 hücre hattı, 44 yaşında kolorektal adenokarsinoma hastası olan bir kadının tümör dokusundan izole edilerek kültüre edilmesiyle elde edilen kolorektal kanser hücre hattıdır. McCoy's 5A hücre besiyerine, %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş ve +4°C saklanmıştır.

DLD-1 hücre hattı erkek bir hastadan izole edilerek kültüre edilen bir kolorektal kanser hücre hattıdır. RPMI 1640 hücre besiyerine, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş ve +4°C saklanmıştır.

PNT1A hücre hattı 35 yaşındaki erkek bireyin ölümünden sonra elde edilerek kültüre edilen bir hücre hattıdır. RPMI 1640 hücre besiyerine %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş ve +4°C saklanmıştır.

F. carica ekstraksiyon örnekleri hücrelerin kendi besiyerlerinde çözdürülmüştür.

Hücre Açma

Hücre açma işleminden önce hücre kültür laminar akımlı kabin steril hale getirilmiş ve 37°C su banyosunda bekletilmiş olan hücre besiyeri alkolden geçirilerek kabine alınmıştır. Steril T-75 flaskın üzeri etiketlenmiş ve içerisine 10 mL hücre besiyeri konmuştur. Sıvı azot tankından dondurma tüplerinde bulunan donmuş haldeki hücre çıkarılmış ve sıcaklığı 37°C olan su banyosunda ağzı kapalı bir şekilde çözündürülmüştür. Çözündükten sonra hücre hızlı bir şekilde kabine alınmış ve içerisinde hücre besiyeri olan T-75 flaska aktarılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ bulunduran inkübatör ortamında inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücre besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak 10 mL yeni hücre besiyeri eklenmiştir. Böylece hücrenin dondurulması için konmuş olan DMSO hücrelerden tamamen uzaklaştırılmıştır. HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatları için tüm bu işlemler yapılmıştır.

Hücre Dondurma

Deney tamamlandıktan sonra hücreyi başka çalışmalarda kullanmak için kalan hücre isteğe bağlı olarak dondurulabilir.

İlk önce laminar akımlı kabinde flaskta bulunan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Flaska tripsin-EDTA ilave edilmiş ve hücreler flask yüzeyinden kalkana kadar inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra kabine alınmış ve tripsin-EDTA'yı inaktif hale getirmek için hacmin yaklaşık 2 katı besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra hücreler pipetlenerek homojen süspansiyon haline getirilmiş ve steril bir falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 400xg de 23°C'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellete 1 ml besiyeri ilave edilmiş ve etiketlenmiş dondurma tüplerine aktarılmıştır. Üzerine hücrenin özelliğine göre %5 ya da %10 oranında DMSO ilave edilerek karıştırılmıştır. Ardından hızlı bir şekilde dondurma tüpleri buza gömülüp - 80°C derin dondurucuya kaldırılmıştır. En az 24 saat sonra dondurma tüplerindeki hücreler sıvı azot tankına transfer edilebilir.

Hücre Pasajlanması, Sayımı ve Ekimi

Hücrelerin pasajlanabilmeleri için hücre kültür kaplarının yüzeyini %80-90 oranında kaplamış olması gerekmektedir. Hücre pasajlanacağı zaman, hücre kültür kabındaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanmıştır. Ardından PBS aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA eklenmiş ve hücreler yüzeyden kalkana kadar inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra tripsin-EDTA, hacmin en az iki katı besiyeriyle inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlendikten sonra elde edilen hücre süspansiyonu bir falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonunun son hacmi 10 mL'ye besiyeriyle tamamlanmıştır.

Tripan Blue boyasından 10 µl ependorf tüpe konmuş ve hücre süspansiyonundan 10 µl üzerine eklenmiştir. Pipetleme yapılarak 10 µl alınmış ve lama yayılmıştır. Lam hücre sayım cihazına (BIO-RAD TC10™ Automated Cell Counter) yerleştirilmiş ve cihaz canlı hücre sayısını otomatik olarak hesaplamıştır. Ekimi yapılacak hücre sayısına göre hesap yapılmış ve 24 kuyucuklu plakalara 2'li tekrarlar şeklinde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra ekimi yapılmış hücreler, ekstraksiyonlarla muamele edilmeye hazır hale gelmektedir.

Hücresinin *F. carica* Ekstraksiyonları ile Muamele Edilmesi

Ekstraksiyonlar 0.1-10 mg/mL konsantrasyon aralığında hücre besiyerlerinde çözdürülerek hazırlanmış ve vorteksle karıştırılarak ekstraksiyon solüsyonu homojen hale getirilmiştir. Daha önce ekilmiş olan hücrelerin hücre besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Farklı konsantrasyondaki ekstraksiyon solüsyonu hücrenin üzerine ilave edilmiş ve inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Hücresinin İncir Çekirdeği Yağı ile Muamele Edilmesi

İncir çekirdeği yağı önce DMSO ile çözdürülmüştür. Sonrasında hücre için %0.2'den fazla DMSO'nun olması toksisiteye sebep olduğu için bu oranın altında olacak şekilde hücre besiyeriyle seyreltilmiş ve vorteksle homojen hale getirilmiştir. Hücreyle muamele etmek için 6-60 mg/mL konsantrasyon aralığında incir çekirdeği yağı solüsyonları hazırlanmıştır. Daha önce ekilmiş olan hücrelerin hücre besiyerleri

aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Farklı konsantrasyondaki incir çekirdeği yağı solüsyonu hücrenin üzerine ilave edilmiş ve inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

2.2.6. Hücre Proliferasyon Analizi

F. carica ekstraktlarının ve incir çekirdeği yağının HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatlarının proliferasyonu üzerine etkisi ve IC₅₀ değerleri, *F. carica*'nın 0.1 –10 mg/mL ve incir çekirdeği yağının 6-60 mg/mL arasında değişen çeşitli konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiştir. Hücre büyümesindeki farklılıklar, spektrofotometrik olarak resazurinin (mavi renk) resorufine (pembe renk) dönüşümünün ölçülmesi esasına dayanan Alamar Blue metodu ile görüntülenmiştir.

Su banyosunda 37°C'de bekletilmiş hücre besiyeri ve Alamar Blue karanlık laminar akımlı kabine alınmıştır. Hücre besiyeri ve Alamar blue 10: 1 oranında karıştırılmıştır. Ekstraksiyon ile muamele edilen hücrelerin sıvı içerikleri aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra bu karışım hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve 37°C ve %5 CO₂ bulunduran inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 96 kuyucuklu plakalara aktararak spektrofotometre cihazında 570 nm ve 600 nm dalga boylarında absorbansları ölçülmüş ve hesaplama yapılmıştır. Elde edilen hesaplama sonucunda proliferasyon grafikleri çizilmiştir. Daha sonra %50 hücre büyümesini engelleyen ekstraksiyon konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplanmıştır.

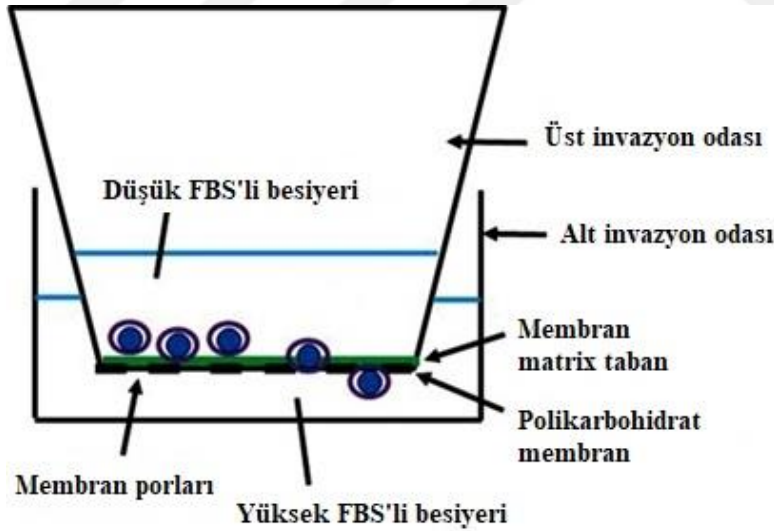
2.2.7. Hücre İnvazyon Analizi

F. carica'nın ve incir çekirdeği yağının HT-29 ve DLD-1 hücre mobilitesi üzerindeki etkisi tabanı membran matriks kaplı BioCoatMatrigel invazyon odaları (BD Biosciences) ile değerlendirilmiştir.

HT-29 ve DLD-1 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara 2'li tekrar olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra *F. carica* ekstraktları ve incir çekirdeği yağı ile IC₅₀ değerlerinde muamele edildikten sonra 48 saat boyunca inkübatörde inkübe edilmiştir.

Matrigel, besiyeri içerisinde 2 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda tekrar hidratlanmıştır. *F. carica* ve incir çekirdeği yağı ile muamele edilen

hücrelerdeki besiyerleri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Ardından PBS ile yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Tripsin-EDTA eklenmiş ve inkübatöre konmuştur. Hücreler kalktıktan sonra hacmin yaklaşık 2 katı besiyeri ile tripsin-EDTA inhibe edilmiştir. Hücreler ependoflara alınmış ve 400xg de 23°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Supernatan kısmı aspire edilmiştir. Pellete düşük oranda FBS içeren besiyeri ilave edilmiş ve pipetlenerek homojen hale getirilmiştir. Düşük oranda FBS içerisinde bulunan hücreler, 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilmiş olan matrigel invazyon odasının içerisine konurken dışarısına yüksek oranda FBS içeren besiyeri konur. Düşük oranda FBS içeren besiyerindeki kanser hücreleri, yüksek oranda FBS içeren besiyeri bulunan alt odaya doğru göç etmeleri için 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra invazyon odasının içindeki ve dışındaki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. PBS ile yıkanmış ve PBS uzaklaştırılır. Membranlar 2 dakika boyunca %3.7 formaldehit ile fikse edilmiş ve 10 dakika boyunca %100 metanol ile geçirgen hale getirilmiştir. Hücrelerin görüntülenmesi için oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika boyunca %1 toluidin ile boyanmıştır. Daha sonra alt tabakaya geçen hücreler mikroskop altında görüntülenmiş ve sayılmıştır.



Şekil 2.8. Matrigel invazyon odaları.

2.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmalar sonucunda elde edilen dataların istatistiksel analizleri için Windows GraphPad prisma (Sürüm 5.0) istatistiksel yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). İkili gruplar arasındaki istatistiksel analiz Student t-Testi ile gruplar arasındaki analiz ise One-Way ANOVA ile yapılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. *F. carica* Ekstraktlarının Verimleri

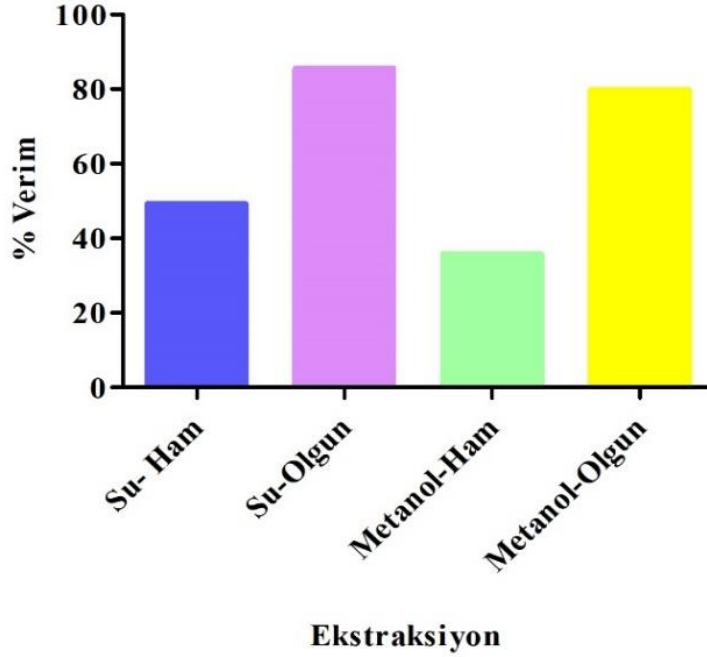
Türkiye Antalya/ Akseki bölgesinden toplanılan *F. carica* olgun ve ham meyvelerinin su ve metanol ekstraksiyonlarının verim sonuçları aşağıdaki Çizelge 3.1’ de ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Verim hesabı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Ekstraksiyonun ağırlığı (gr)} \times 100}{\text{Kuru ağırlık (gr)}} \quad (3.1)$$

Çizelge 3.1. *F.carica* ham ve olgun meyvelerin su ve metanol ekstraktlarının verimleri.

	Ekstraksiyon Verimi (%)	
	Ham <i>F. carica</i>	Olgun <i>F. carica</i>
Su	49.3	85.5
Metanol	35.8	79.7



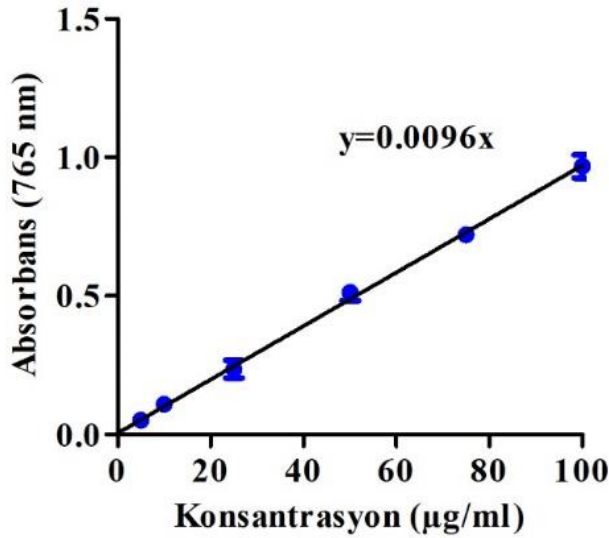
Şekil 3.1. *F.carica* ham ve olgun meyvelerin su ve metanol ekstraktlarının verimleri.

Meyvelerden elde edilen ekstraktlara göre yüzde verimleri karşılaştırıldığında, su ile elde edilen ekstraktların veriminin metanola göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Olgun *F. carica*'nın su ve metanol ekstraksiyonlardan elde edilen verim ham *F. carica*'dan elde edilen verimlere göre daha yüksek bulunmuştur. Tüm ekstraksiyonlar kıyaslandığında en yüksek verim olgun *F. carica* su ekstraksiyonunda (% 85.5), en düşük verim ham *F. carica* metanol ekstraksiyonunda (% 35.8) olduğu tespit edilmiştir.

3.2. Toplam Antioksidan, Fenolik ve Antioksidan Aktivite Analizleri

3.2.1. Ekstraktların Toplam Fenolik Madde Analizleri

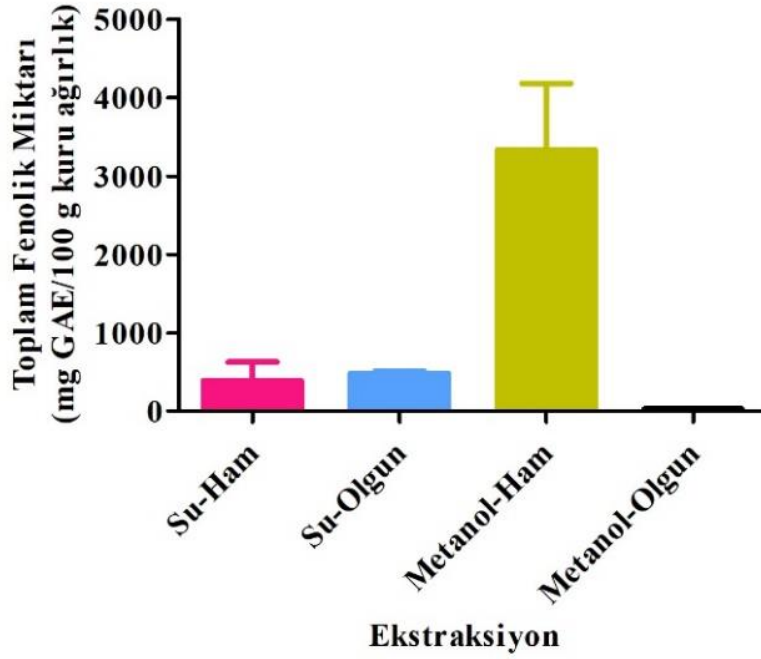
Ekstraktların toplam fenolik içeriklerini belirlemek için kullanılan gallik asit standart grafiği Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Su ve metanol ile ekstrakte edilen *F. carica* olgun ve ham meyvelerine ait toplam fenolik madde içeriği Çizelge 3.2 ve Şekil 3.3'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Gallik asit standart grafiği.

Çizelge 3.2. *F. carica* ham ve olgun meyvelerin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik miktarları.

Toplam Fenolik Miktarı (mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE)/ 100 gr kuru ağırlık)		
	Ham <i>F. carica</i>	Olgun <i>F. carica</i>
Su	388.3	482.2
Metanol	3336.5	25.3

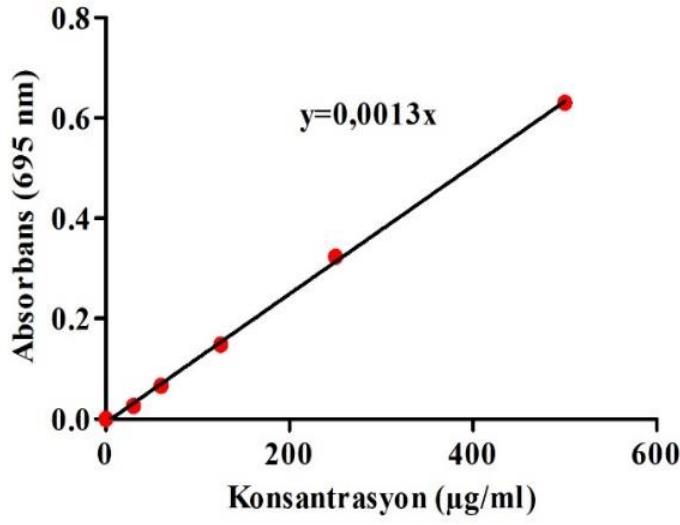


Şekil 3.3. *F. carica* ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları.

En yüksek toplam fenolik içeriği 3336.5 mg GAE/100 g kuru ağırlık ile *F. carica* ham metanol ekstraktında elde edilmiş ve bunu sırasıyla 482.2 mg GAE/100 g kuru ağırlık ve 388.3 mg GAE/100 g kuru ağırlık ile *F. carica* olgun su ekstraktı ve *F. carica* ham su ekstraktı izlemiştir. En düşük fenolik madde miktarı 25.3 mg GAE/100 g kuru ağırlık ile *F. carica* olgun metanol ekstraktından elde edilmiştir.

3.2.2. Ekstraktların Toplam Antioksidan Kapasite Analizleri

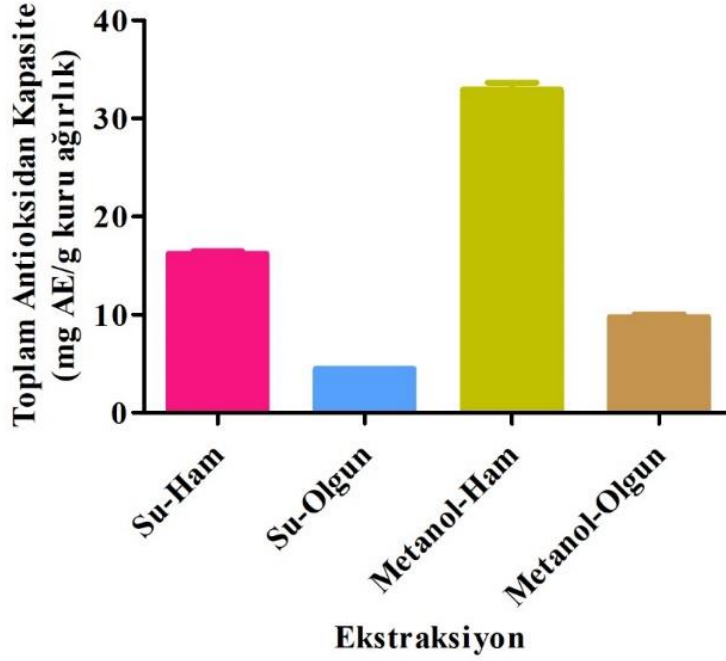
Ekstraktların toplam antioksidan kapasitelerini belirlemek için kullanılan askorbik asit standart grafiği Şekil 3.4’de gösterilmiştir. Su ve metanol ile ekstrakte edilen *F. carica* olgun ve ham meyvelerine ait toplam antioksidan kapasiteleri Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5’de gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Askorbik asit standart grafiği.

Çizelge 3.3. *F. carica* ham ve olgun meyvelerin su ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan kapasite miktarları.

Toplam Antioksidan Kapasite (mg Askorbik Asit Eşdeğeri (AE)/ g kuru ağırlık)		
	Ham <i>F. carica</i>	Olgun <i>F. carica</i>
Su	16.2	4.5
Metanol	33.0	9.8

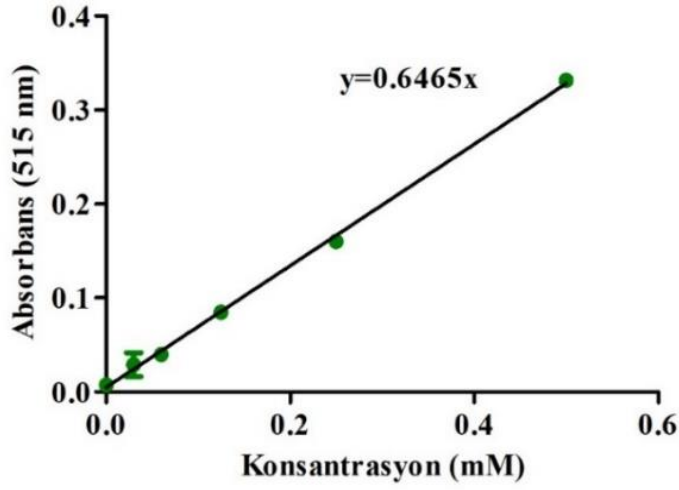


Şekil 3.5. *F. carica* ekstraktlarına ait toplam antioksidan kapasiteleri.

En yüksek toplam antioksidan kapasite 33.0 mg AE/ g kuru ağırlık ile *F. carica* ham metanol ekstraktında elde edilmiş ve bunu sırasıyla 16.2 mg AE/ g kuru ağırlık ve 9.8 mg AE/ g kuru ağırlık ile *F. carica* ham su ekstraktı ve *F. carica* olgun metanol ekstraktı izlemiştir. En düşük toplam antioksidan kapasite 4.5 mg AE/ g kuru ağırlık ile *F. carica* olgun su ekstraktından elde edilmiştir.

3.2.3. Ekstraktların Antioksidan Aktivite Analizleri

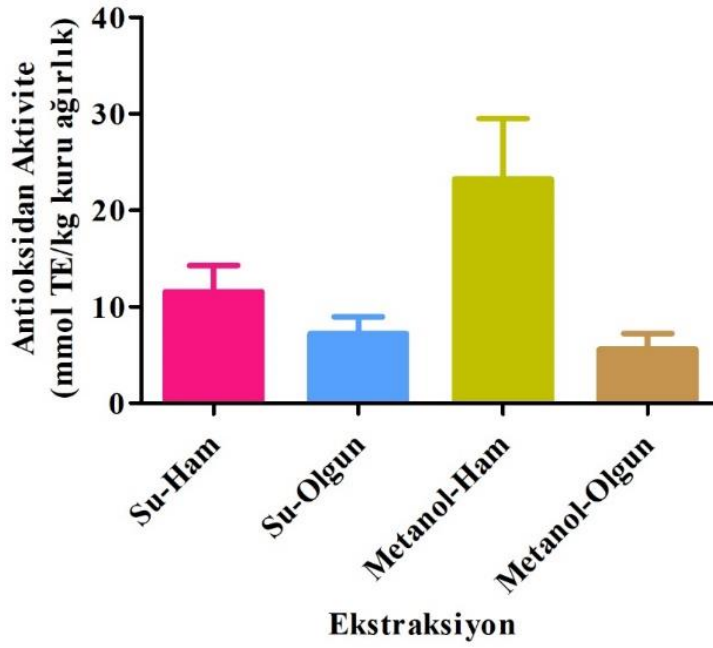
Ekstraktların antioksidan aktivite miktarını belirlemek için kullanılan Troloks standart grafiği Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Su ve metanol ile ekstrakte edilen *F. carica* olgun ve ham meyvelerine ait antioksidan aktivite analizi Çizelge 3.4 ve Şekil 3.7'de gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Troloks standart grafiği.

Çizelge 3.4. *F. carica* ham ve olgun meyvelerin su ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivite miktarları.

	Antioksidan Aktivite (mmol Trolox Eşdeğeri (TE)/kg kuru ağırlık)	
	Ham <i>F. carica</i>	Olgun <i>F. carica</i>
Su	11.6	7.2
Metanol	23.2	5.6



Şekil 3.7. *F. carica* ekstraktlarına ait antioksidan aktivite miktarları.

En yüksek antioksidan aktivite 23.2 mmol TE/kg kuru ağırlık ile *F. carica* ham metanol ekstraktında elde edilmiş ve bunu sırasıyla 11.6 mg mmol TE/kg kuru ağırlık ve 7.2 mmol TE/kg kuru ağırlık ile *F. carica* ham su ekstraktı ve *F. carica* olgun su ekstraktı izlemiştir. En düşük toplam antioksidan kapasite 5.6 mmol TE/kg kuru ağırlık ile *F. carica* olgun metanol ekstraktında elde edilmiştir.

3.3. Hücre Proliferasyon Analizleri

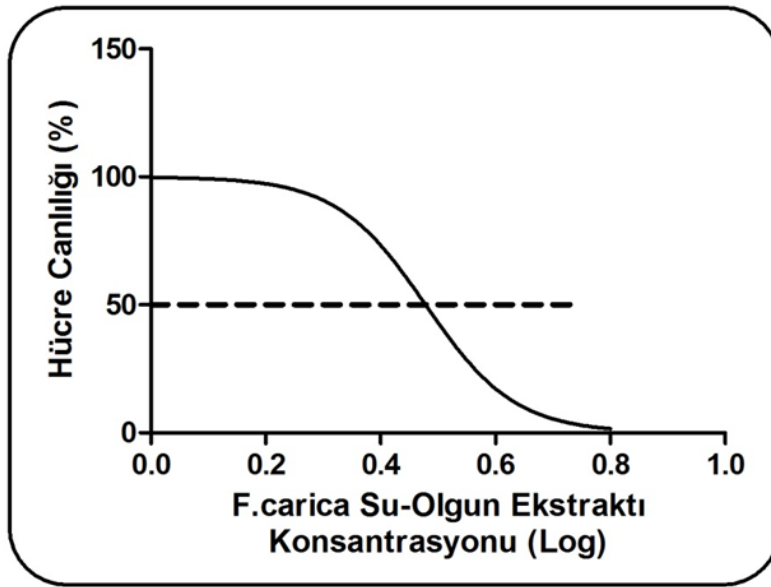
3.3.1. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının Hücrelerin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

Ekstraktların ve incir çekirdeği yağının hücrelerin %50 büyümesini engelleyen bileşik konsantrasyonunu (IC_{50}) belirlemek amacıyla ekstraktlar için 0.1-10 mg/ml konsantrasyon incir çekirdeği yağı için 6-60 mg/mL konsantrasyon aralıklarında ekstraktların ve incir çekirdeği yağının hücrelerin proliferasyonlarına etkisi gözlemlenmiştir. Ekstraktlar, hücre besiyerinde çözölmüştür, incir çekirdeği yağı ise DMSO ve hücre besiyerinde çözölmüştür ve hücrelere uygulanmıştır. Hücreler ekstraktların ve incir çekirdeği yağı içerisinde üç gün bekletildikten sonra hücrelerdeki besiyeri aspire edilmiş ve hazırlanan Alamar Blue reaktifi hücrelerin

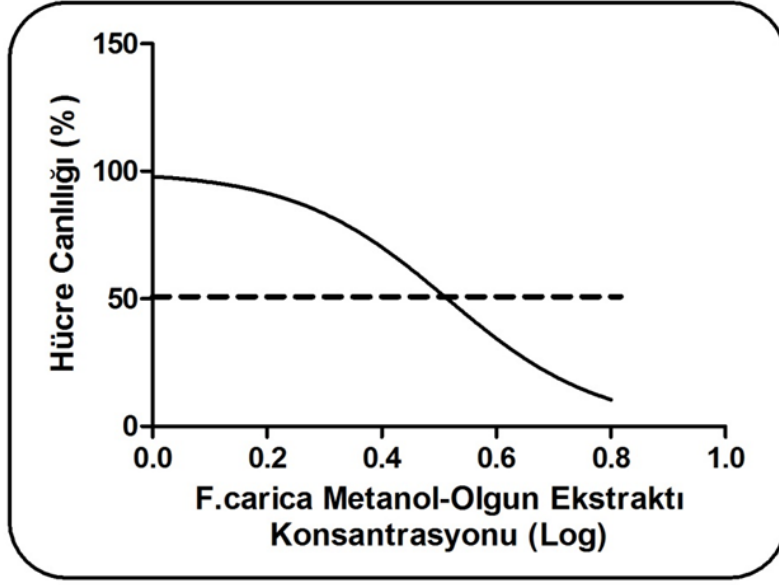
üzerine eklenmiştir. Hücreler üç saat inkübatörde (%5 CO₂, 37°C) bekletildikten sonra ölçülen absorbans değerleri ile hesaplama yapılmıştır. Konsantrasyonların logaritmaları ile absorbans değerlerinin yüzdeleri hesaplandıktan sonra IC₅₀ hesaplaması için datalar Windows GraphPad prizma (Sürüm 6) programına aktarılmış ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının HT-29 Hücre Hattının Proliferasyonu Üzerine Etkisi

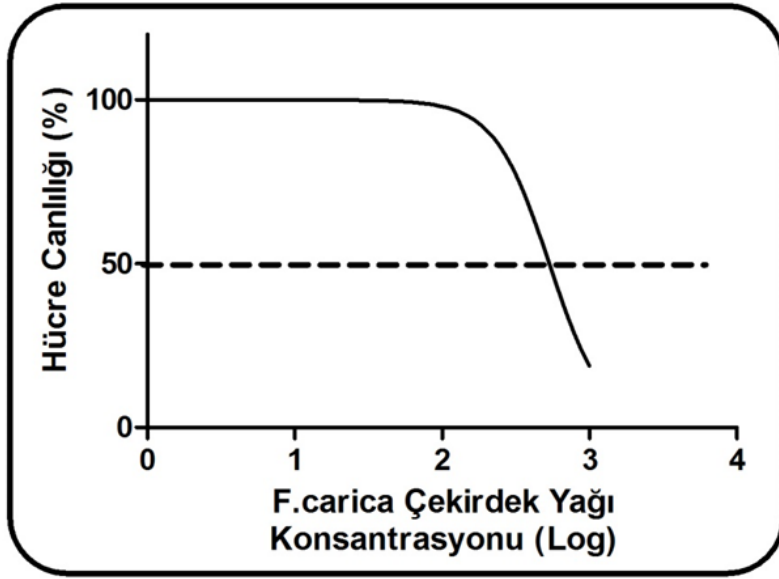
IC₅₀ çalışmaları sonucunda; ekstraktların HT-29 hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisi saptanarak IC₅₀ değeri su-olgun ekstraktı için 1.5 mg/mL, metanol-olgun ekstraktı için 1.75 mg/mL ve incir çekirdeği yağı için 57 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10).



Şekil 3.8. Su- olgun ekstraktı için IC₅₀ belirlenmesi



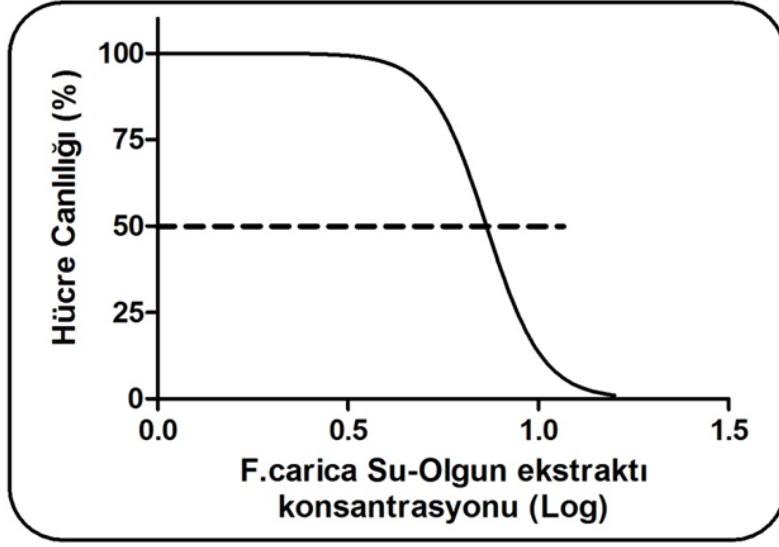
Şekil 3.9. Metanol- olgun ekstraktı için IC₅₀ belirlenmesi



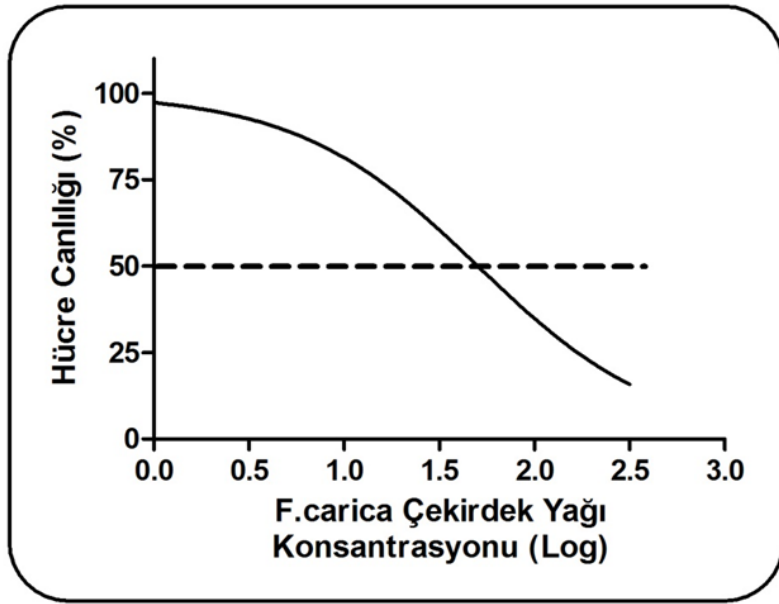
Şekil 3.10. İncir çekirdeği yağı için IC₅₀ belirlenmesi

Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının DLD-1 Hücre Hattının Proliferasyonu Üzerine Etkisi

IC₅₀ çalışmaları sonucunda; ekstraktların DLD-1 hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisi saptanarak IC₅₀ değeri su-olgun ekstraktı için 6.6 mg/mL ve incir çekirdeği yağı için 32,16 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.11, 3.12).



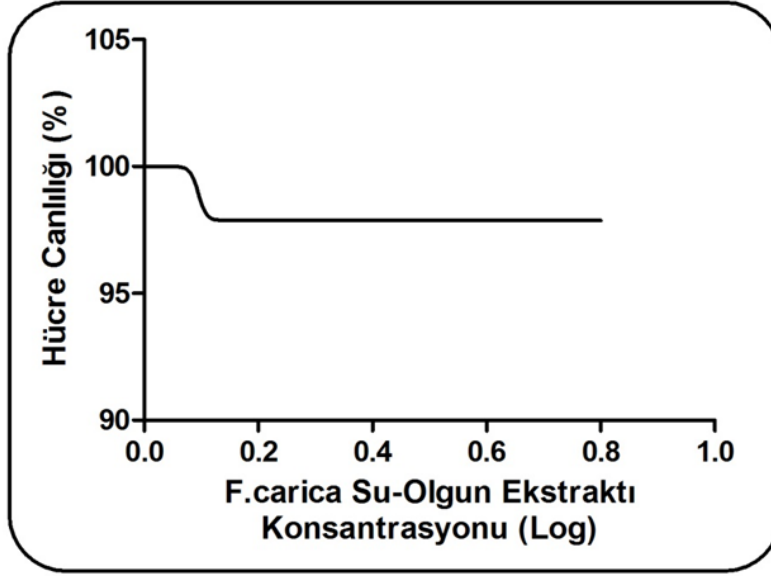
Şekil 3.11. Su-olgun ekstraktı için IC₅₀ belirlenmesi



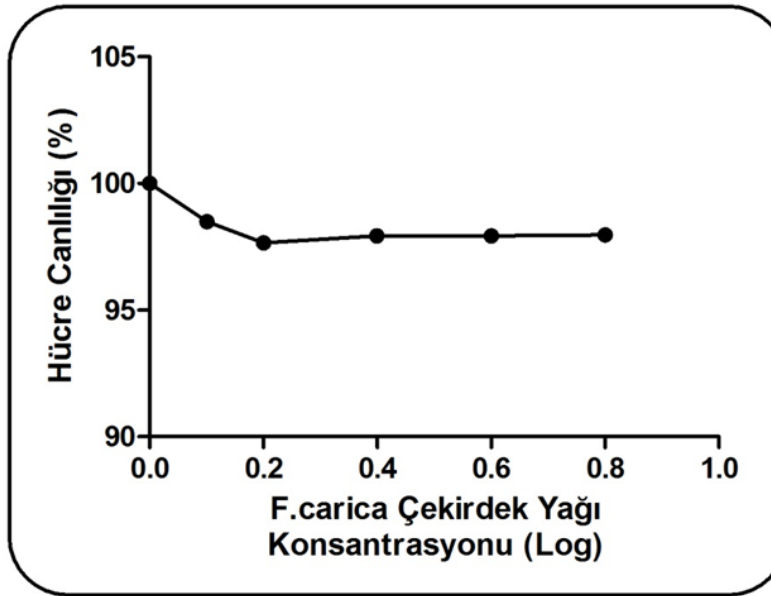
Şekil 3.12. İncir çekirdeği yağı için IC₅₀ belirlenmesi

Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının PNT1A Hücre Hattının Proliferasyonu Üzerine Etkisi

IC₅₀ çalışmaları sonucunda; ekstraktların PNT1A hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisi saptanarak IC₅₀ değeri su-olgun ekstraktı için 17.37 mg/mL ve incir çekirdeği yağı için 96.6 mg/mL (Şekil 3.13, 3.14).



Şekil 3.13. Su-olgun ekstraktı için IC₅₀ belirlenmesi



Şekil 3.14. İncir çekirdeği yağı için IC₅₀ belirlenmesi

Tüm ekstraksiyonların ve incir çekirdeği yağının HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatlarının proliferasyonuna etkisi IC₅₀ değerleriyle incelenmiştir. Ancak tüm hücre hatları için su-ham ve metanol-ham ekstraksiyonlarının IC₅₀ değerleri >30 mg/mL ve üzerinde çıkmıştır. DLD-1 ve PNT1A hücre hattı için, metanol-olgun ekstraksiyonunun IC₅₀ değeri >30 mg/mL üzerinde çıkmıştır. IC₅₀ değerlerinin çok yüksek olması hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkinin çok düşük olduğunu

göstermektedir ve anlamlı sonuç olmamasından dolayı ileri çalışmalarda değerlendirilmemiştir (Çizelge 3.5).

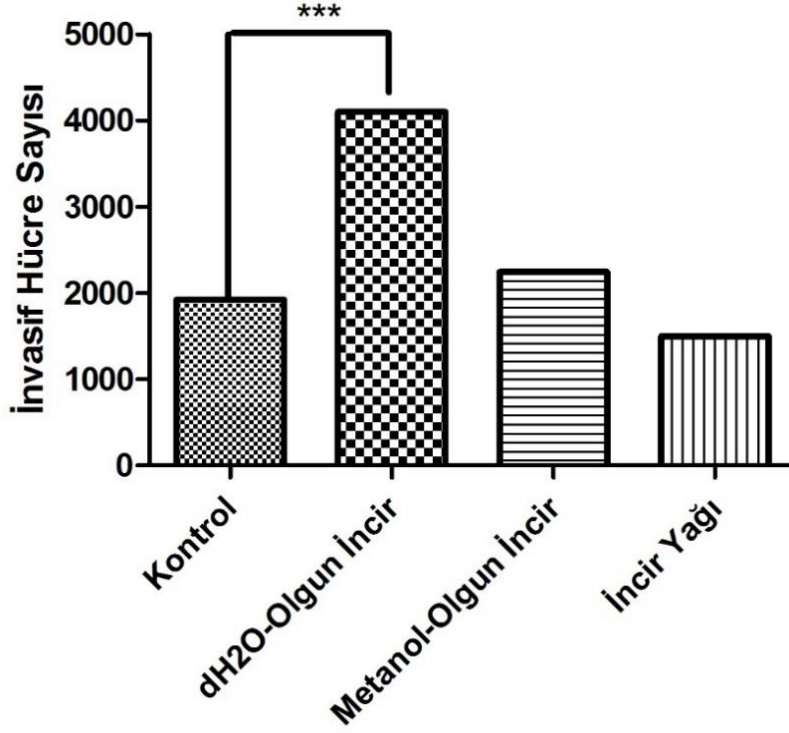
Çizelge 3.5. Ekstraksiyonların ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değerleri (mg/mL).

	Su Ham	Su Olgun	Metanol Ham	Metanol Olgun	İncir Çekirdeği Yağı
HT-29	>30	1.5	>30	1.75	57
DLD-1	>30	6.6	>30	>30	32.16
PNT1A	>30	17.37	>30	>30	96.6

3.4. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının Hücrelerin İnvazyonu Üzerine Etkisi

3.4.1. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının HT-29 Hücre Hattının İnvazyonu Üzerine Etkisi

F. carica ekstratlarından anti-proliferatif etki gösteren su-olgun ve metanol-olgun ekstratlarının ve incir çekirdeği yağının HT-29 hücresi üzerinde anti-invaziv etkisinin analizi Şekil 3. 15’de gösterilmektedir.

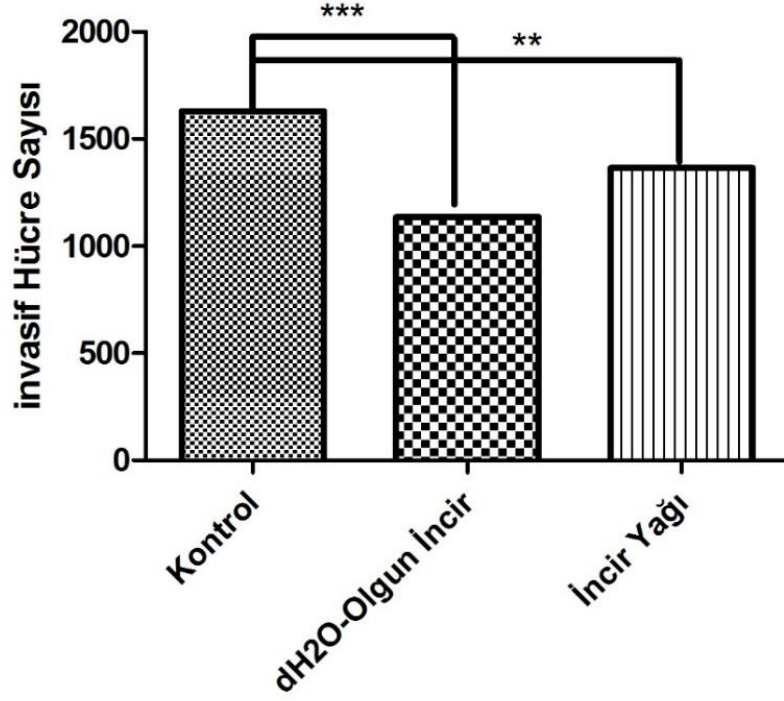


Şekil 3.15. Su, metanol ve incir çekirdeği yağı ile muamele edilmiş HT-29 hücrelerinin kantitatif invazyon analizleri (**p<0.0001).

Olgun *F. carica* su ekstraksiyonunun HT-29 hücresi üzerinde 2.13-katlık bir invaziv etkisi vardır. (**p<0.0001). İncir çekirdeği yağının HT-29 hücresi üzerinde 1.3-katlık anti-invaziv bir etkisi vardır (** p<0.001).

3.4.2. Ekstraktların ve İncir Çekirdeği Yağının DLD-1 Hücre Hattının İnvazyonu Üzerine Etkisi

F. carica ekstratlarından anti-proliferatif etki gösteren su-olgun ve metanol-olgun ekstratlarının ve incir çekirdeği yağının DLD-1 hücresi üzerinde anti-invaziv etkisinin analizi Şekil 3. 16'de gösterilmektedir.



Şekil 3.16. Su, metanol ve incir çekirdeği yağı ile muamele edilmiş DLD-1 hücrelerinin kantitatif invazyon analizleri (**p<0.0001 ve ** p<0.001).

Olgun *F. carica* su ekstraksiyonunun DLD-1 hücrelerinin invazyon potansiyellerini %30 oranında azaltırken (**p<0.0001), incir çekirdeği yağı ise %16 oranında azaltmaktadır (** p<0.001).

4. TARTIŞMA

Bitkilerden elde edilen biyomoleküller, hastalıkları önlemedeki rolleri açısından oldukça dikkat çekmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar bu doğal ürünlerin alımı ile kalp hastalığı mortalitesi, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların azalan oranları arasında önemli bir pozitif ilişki olduğunu göstermektedir. İnsan organizmasında bulunan serbest radikaller, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi bu hastalıkları başlatan birçok moleküllerin oksidatif hasarına neden olabilmektedir (Garcia- Alonso 2004).

Fenolikler, organik asitler, vitamin E ve karotenoidler gibi antioksidan bileşikler serbest radikalleri temizlemekte ve böylece dejeneratif hastalıklara yol açan oksidatif mekanizmayı inhibe etmektedirler (du Toit ve ark 2001, Silva ve ark 2004).

Hem kuru hem de yaş incir insan beslenmesinde zengin lif kaynağı, mineraller, antioksidan fenoller, proteinler, şeker, önemli yağ asitleri, serbest kolesterol ve organik asitler açısından önemli bir yer tutmaktadır.

Çalışmada, incir meyvesindeki total fenolik madde miktarını 345.26 mg/100 g kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda Türkiye, Dama ve ispanyaya ait kuru incirlerin total fenolik içerikleri sırasıyla 19,2, 19.1, 17.8 mg/100g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir, bu fark farklı incir türünün ve farklı mevsimlerde edinilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İncirlerin fenolik bileşik içerikleri; kuersetin sırasıyla 10.2, 13.0, 10.9 mg/100 g iken kaempferol 2, 10, 20 mg/ 100 g'dır (Fernando Vallejo 2012).

Yapılan bir çalışmada, siyah yaş incirin (*F. carica*) total fenolik bileşik miktarını 536.43 mg GAE/100 g kuru ağırlık ve antioksidan aktivitesini 71.86 mg GAE/100 g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir (Bachir Bey ve ark 2014).

Çalışmada, Çoruh vadisi Yusufeli bölgesinden temin edilen 24 lokal incir genotipi ve iki standart incir çeşidi (Sarilop ve Bursa siyahı) bitki materyali olarak kullanılmıştır. İncir genotiplerindeki total fenolik miktarı 24 ve 237 mg/100 g GAE yaş ağırlık arasında değişmektedir. Sarilop incirinin total fenolik miktarı 49 mg/100

g GAE yaş ağırlık iken, bursa siyahi incirinin 64 mg/100 g GAE yaş ağırlık olduğu görülmüştür. Ayrıca en yüksek total fenolik miktarları siyah, koyu mor ve mor renkli fenotiplerde olduğu tespit edilmiştir. İncir genotiplerin total antioksidan kapasiteleri demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ve troloks eşdeğerli antioksidan kapasite (TEAC) testleriyle belirlenmiştir. TEAC sonuçlarına göre; genotiplerin total antioksidan kapasiteleri 36- 623 µmol Troloks eşdeğerliği (TE)/100 g yaş ağırlık arasında çıkmıştır ve bursa siyahi ve sarılop total antioksidan kapasiteleri sırasıyla 116- 37 µmol Troloks eşdeğerliği (TE)/100 g yaş ağırlık olarak bulunmuştur. FRAP sonuçlarına göre; genotiplerin total antioksidan kapasiteleri 4.6-18.7 mmol Fe⁺²/ kg yaş ağırlık arasında çıkmıştır ve bursa siyahi ve sarılop total antioksidan kapasiteleri sırasıyla 8.6- 7.9 mmol Fe⁺²/ kg yaş ağırlık olarak tespit edilmiştir. Genel olarak siyah ve mor renkli genotipe sahip incirlerin diğerlerine oranla daha yüksek total antioksidana sahip olduğu görülmüştür (Ercisli ve ark 2012).

Çalışmaya göre, Akdeniz bölgesinden 76 lokal incir genotiplerinin total fenolik miktarlarını 194 ve 2200 mg/kg GAE yaş ağırlık arasında bulunmuştur (Caliskan ve Polat 2011).

Yaptığımız çalışmada; su-ham, su-olgun, metanol-ham ve metanol-olgun ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla 388.3, 482.2, 3336.5 ve 25.3 mg GAE/ 100 g kuru ağırlık olarak hesap edilmiştir. En düşük fenolik madde miktarı metanol-olgun ekstraktından elde edilirken, en yüksek metanol-ham ekstraktından elde edilmiştir. Su-ham, su-olgun, metanol-ham ve metanol-olgun ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri sırasıyla 16.2, 4.5, 33.0 ve 9.8 mg AE/ g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. En düşük total antioksidan miktarı su-olgun ekstraktından elde edilirken, en yüksek metanol-ham ekstraktından elde edilmiştir. Antioksidan aktivite miktarları su-ham, su-olgun, metanol-ham ve metanol-olgun için sırasıyla 11.6, 7.2, 23.2 ve 5.6 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır. En düşük antioksidan aktivite metanol-olgun ekstraktında iken, en yüksek metanol-ham ekstraktından elde edilmiştir. Ekstraktların total fenolik madde miktarları ve antioksidan kapasiteleri literatür sonuçları ile uyumlu çıkmıştır. Ekstraktlar arasındaki farklılığın kullanılan aynı türdeki incirin ham ve olgun formda olmasından ve çözücü farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmaya göre; *F. carica* ekstraktının HPLC fenolik bileşik analizinde gallik asit (30.99), epigallokateşin (25.44), kafein (20.23), kateşin (13.88), epikateşin (12.48), rutin (3.26), epigallokateşin gallat (2.52), epikateşin gallat (0.85), kuersetin (0.56), isorahmentin (0.29) ve kaempferol (0.12) mg/100g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir (Manal Said Tawfik 2014).

Çalışma sonucunda, *F. carica* incir çekirdeği yağının % yağ asit kompozisyonu palmitik asit (8.3 ± 0.03), stearik asit (2.94 ± 0.03), oleik asit (14.7 ± 0.18), lineleik asit (25.48 ± 0.03), linolenik asit (47.77 ± 0.1), araşidik asit (0.29 ± 0.04) ve eikosenik asit (0.15 ± 0.02) olarak analiz edilmiştir. Ayrıca gama-tokoferol miktarı 2.23 ± 0.26 ($\mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir (Soltana ve ark 2016).

Tez çalışmamızda, kullandığımız incir çekirdeği yağının yağ asit kompozisyonu, linolenik asit (% 39.97), linoleik asit (% 33.24), oleik asit (% 16.71), palmitik asit (% 6.72), stearik asit (% 2.69) eikosenik asit (% 0.23), araşidik asit (% 0.18) ve behenik asit (% 0.07) olarak analiz edilmiştir. E-vitamini analizinde; 4800 mg/kg gama-tokoferol bulunmaktadır. Bunu sırayla 120 mg/kg ile alfa-tokoferol ve 80 mg/kg delta-tokoferol izlemektedir. Yapılan analizde beta-tokoferol tespit edilememiştir. Yapılmış olan analizlerin literatürle benzer sonuçlar göstermektedir.

İncir lateksinin aktivitesi ile ilgili ilk bilimsel araştırma Ullman ve arkadaşları tarafından 1940'lı yıllarda yapılmıştır (Ullman 1945, Ullman 1952, Ullman ve ark 1952). Sıçanlara yüksek dozlarda incir lateks enjekte edildiğinde ölümcül olduğu bulunmuştur. Benzopirenle indüklenmiş sarkoma taşıyan ratlara düşük dozlarda enjekte edildiğinde tümör büyümesinin inhibisyonuna ve küçük tümörlerin kaybolmasına sebep olmuştur (Ullman 1945).

Yapılan çalışmaya göre; incir lateksinden 6-O-açıl- β -D-glukosil- β -sitosterol (6-AGS) molekülünü izole etmiş ve bu molekülü potansiyel sitotoksik ajan olarak tanımlamışlardır. Raji Burkitt B hücre lenfoma hücre hattı 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 6-AGS molekülü ile muamele edildiğinde sırasıyla %46 ve %49 oranında hücre büyümesini inhibe ederken, DG-75 Burkitt B hücre lenfoma hücre hattının büyümesini %41 ve %87 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Jurkat T-hücre lösemi hücre hattı 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 6-AGS molekülü ile muamele edildiğinde ise sırasıyla %62 ve %81 oranında hücre büyümesini inhibe ederken, HD-MAR t-hücre lösemi hücre hattının

büyümesini %57 ve %66 oranında hücre büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. DU-145 prostat kanseri hücre hattı 25 ve 50 µg/mL 6-AGS molekülü ile muamele edildiğinde sırasıyla %61 ve %75 oranında hücre büyümesini inhibe ederken, MCF-7 meme kanseri hücre hattının büyümesini %57 ve %66 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir (Rubnov ve ark 2001).

Çalışmada, *F. carica* lateksin farklı konsantrasyonlardaki antikanser etkisi çalışılmıştır. *F. carica* lateksin 5 mg/ml konsantrasyon periferik mononükleer hücrelerin üzerinde belli bir etki oluşturmamasına rağmen mide kanser hücre hattının büyümesinin inhibisyonunda büyük etkiye sahip olduğu görülmüştür. (Hashemi ve ark 2011).

A375 (melanom) insan tümör hücre hattı üzerinde, *F. carica* meyvesinden elde edilen lateks 0.05 mg/ml IC₅₀ değeriyle anti-radikal aktiviteye sahipken, yapraklardan elde edilen lateks 1.5 µg/ml IC₅₀ değeriyle en yüksek anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Menichini ve ark 2012).

Yapılan bir çalışmada, T98G, U-138 MG ve U-87 MG insan beyin gliyoblastoma hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 2 x 10⁴ hücre /kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. *F. carica* lateks 0.125-2 mg/mL aralığında değişen farklı konsantrasyonlarda 24-72 saat boyunca hücrelerle muamele edildikten sonra hücre proliferasyonu, WST-1 hücre proliferasyon analiz kitini kullanılarak belirlenmiştir. *F. carica* lateks 0.25 mg/mL konsantrasyonda; T98G hücresinin proliferasyonunu 58.7%, U-138 MG hücresininkini 54.94% ve U-87 MG 68.81% oranında azalttığı tespit edilmiştir. İnsan mononükleer lenfositler 0.25 mg/mL *F. carica* lateksle muamele edildiğinde proliferasyonunun 24 saat içinde 14.83 ± 0.33 %, 48 saat içinde 23.00 ± 2.12 % ve 72 saat içinde 29.75 ± 2.05 % oranında inhibisyona uğradığı belirlenmiştir. Bu bulgular *F. carica* lateksin tümör olmayan hücrelerinin üzerinde çok düşük sitotoksik etkisi olduğunu göstermektedir (Tezcan ve ark 2015).

İnsan tümör hücre hattı C32 (amelanotik melanom) üzerinde *F. carica* örneklerin anti-proliferatif etkisi incelenmiştir. Analiz sonucunda; IC₅₀ değerleri sırasıyla 10.69 ve 10.0 µg/mL olan *F. carica*'nın kabuk ve odunsu kısımlarıyla kıyaslandığında yaprakları IC₅₀ 3.92 µg/mL değeriyle en yüksek anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Conforti ve ark 2012).

Yapılan çalışma, *F. carica* ekstraktlarının ve lateksin doza bağımlı analizde 2 µg/mL kadar az konsantrasyonda HeLa hücrelerinin canlılığını azaltabildiğini göstermiştir. Yaprak ve meyvelerin etanol, etil asetat ve diklorometan ekstraktların yaklaşık IC₅₀ değerleri sırasıyla 10, 19, 12 µg/mL ve 12, 12, 11.5 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Lateksin IC₅₀ değeri ise yaklaşık 17 µg/mL'dir (Khodarahmi ve ark 2011).

F. carica lateksin su ekstraksiyonunun fenolik bileşiklerinin HPLC-DAD kullanarak belirlendiği analiz sonucuna göre; protokateşik asit, kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve kuersetin 28.784 ± 0.080 , 3.06 ± 0.027 , 2.536 ± 0.005 , 2.746 ± 0.007 ve 0.562 ± 0.004 mg/L oranlarında tespit edilmiştir. *F. carica* lateks ekstraktının T98G hücresinin invazyonu üzerine etkisi koryoallantoik membran modeli (CAM) ile incelenmiştir. T98G hücreleri büyütülmüş ve neovaskülerizasyon ile uyarılmış yumurta CAM yüzeyine yerleştirilmiştir. CAM sonuçlarına göre; kontrol tümör hücrelerinin ortalama tümör büyüklüğü 0.013 ± 0.002 gr iken, *F. carica* lateks ile muamele edildiğinde tümör büyüklüğü 0.008 ± 0.001 gr olduğu görülmüştür (Tezcan ve ark 2015).

Daha önceki çalışmalar, protokateşik asit içeren bitki ekstraktlarının invazyonu önleyici potansiyelde olduğunu göstermektedir (Yin ve ark 2009, Lin ve ark 2011, Spilioti ve ark 2014). Tezcan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan beyin gliyoblastoma hücrelerinin invazyonu üzerinde *F. carica* lateks ekstraktının potansiyel etkisinin *F. carica* lateks ekstraktının protokateşik asit içeriğinden kaynaklanabileceğini ve ileri düzeyde çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini öne sürmektedirler.

Tez çalışmamızda su-ham, su-olgun, metanol-ham ve metanol-olgun *F. carica* ekstraktları ve incir çekirdeği yağının HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatlarının proliferasyonuna etkisinin analizi sonucunda; tüm hücre hatları için su-ham ve metanol-ham ekstraksiyonlarının IC₅₀ değerleri >30 mg/mL ve üzerinde çıkmıştır. Ayrıca DLD-1 ve PNT1A hücre hattı için metanol-olgun ekstraksiyonunun IC₅₀ değeri >30 mg/mL üzerinde çıkmıştır. Su-ham ve metanol-ham ekstraktlarının HT-29, DLD-1 ve PNT1A hücre hatları üzerinde ve metanol-olgun ekstraktının DLD-1 ve PNT1A hücre hatları üzerinde anlamlı bir anti-proliferatif etkiye sahip

olmadığı sonucuna varılmıştır. HT-29 hücre hattının proliferasyonu üzerindeki su-olgun, metanol-olgun ekstraktlarının ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değeri sırasıyla 1.5, 1.75 ve 57 mg/mL olarak hesaplanmıştır. DLD-1 hücre hattının proliferasyonu üzerindeki su-olgun ekstraktı ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değeri sırasıyla 6.6 ve 32.16 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Kontrol olan PNT1A hücre hattının proliferasyonu üzerindeki su-olgun ekstraktı ve incir çekirdeği yağının IC₅₀ değeri sırasıyla 17.37 mg/mL ve 96.6 mg/mL'dir. Sonuçlara göre; PNT1A sağlıklı hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmek için kanser hücrelerine göre çok daha yüksek konsantrasyonlarda su-olgun ve incir çekirdeği yağı kullanılması gerekmektedir ve bu sonuç verilen bu maddelerden sağlıklı hücrelerin minimum düzeyde yan etkilerin olabileceğini göstermektedir. Metanol-olgun ekstraktı sadece HT-29 hücrelerinde anti-proliferatif bir etki gösterirken DLD-1 ve PNT1A hücrelerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Su-olgun ekstraktı, kontrol PNT1A ve DLD-1 hücrelerine kıyasla HT-29 hücrelerinde daha yüksek anti-proliferatif etkiye sahiptir. İncir çekirdeği yağı kontrol PNT1A ile kıyaslandığında HT-29 ve DLD-1 kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerinde daha yüksek anti-proliferatif etkiye sahiptir ve en yüksek etkiyi DLD-1 hücresinde göstermiştir. Yapılan anti-proliferatif etki belirleme çalışmamızın sonuçları yukarıda belirtilen literatür çalışmalarıyla uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, su-olgun *F. carica* ekstraktı HT-29 hücresi üzerinde 2.13-katlık bir invaziv etkiye sahiptir. Metanol-olgun ekstraktının HT-29 hücresi üzerinde anti-proliferatif etkisi olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı invaziv ya da anti-invaziv bir etki tespit edilememiştir. İncir çekirdeği yağının HT-29 hücresi üzerinde 1.3-katlık anti-invaziv bir etkisi vardır. Su-olgun *F.carica* ekstraktı (%30) DLD-1 hücrelerinin invazyon potansiyellerini, incir çekirdeği yağına (%16) göre çok daha fazla azaltmıştır. İncir çekirdeği yağı her iki kanser hücre hattının invazyon potansiyelini azaltmıştır. Çalışma sonucunda sadece su-olgun ekstraktı HT-29 hücresinin invazyonunu artıran yönde etki etmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *F. carica* su-olgun, metanol-olgun ve incir çekirdeği yağının kolorektal kanser hücreleri HT-29, DLD-1 ve sağlıklı epitel hücresi PNT1A hücreleri üzerinde doza bağımlı olarak proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konmuştur. Ancak bu ekstraktların ve incir çekirdeği yağının kullanımı kanser hücrelerinin tedavisinde yeterli olmadığı ve kolorektal kanser hastaları için besinsel destekleyici tedavi olabileceği hususunda kesin bir sonuca ulaşılammıştır. İncir meyvesinden elde edilen su ve metanol ekstaktlarının ve incir çekirdeği yağının kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonu üzerine etkileri literatürde ilk kez araştırılmıştır. Bu elde edilen verilerin literatürdeki önemli bir açığı kapattığı düşünülmektedir. Ayrıca moleküler düzeyde çalışmalarla proliferasyon ve invazyon süreçlerinin aydınlatılması hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akbulut M, Ozcan MM, Coklar H, 2009. Evaluation of antioxidant activity, phenolic, mineral contents and some physicochemical properties of several pine honeys collected from Western Anatolia. *International journal of food sciences and nutrition*, 60, 7, 577-89.
- Altonsy MO, Andrews SC, 2011. Diallyl disulphide, a beneficial component of garlic oil, causes a redistribution of cell-cycle growth phases, induces apoptosis, and enhances butyrate-induced apoptosis in colorectal adenocarcinoma cells (HT-29). *Nutrition and cancer*, 63, 7, 1104-13.
- Anaya DA, Becker NS, Abraham NS, 2011. Global graying, colorectal cancer and liver metastasis: new implications for surgical management. *Critical reviews in oncology/hematology*, 77, 2, 100-8.
- Bachir Bey M, Meziant L, Benchikh Y, Louaileche H, 2014. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food chemistry*, 162, 277-82.
- Bendas G, Borsig L, 2012. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International journal of cell biology*, 2012, 676731.
- Berg AO, Grp EW, Armstrong K, Botkin J, Calonge N, Haddow J, Hayes M, Kaye C, Phillips KA, Piper M, Richards CS, Scott JA, Strickland OL, Teutsch S, 2009. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med*, 11, 1, 35-41.
- Bernstein CN, McKeown I, Embil JM, Blanchard JF, Dawood M, Kabani A, Kliwer E, Smart G, Coghlan G, MacDonald S, Cook C, Orr P, 1999. Seroprevalence of *Helicobacter pylori*, incidence of gastric cancer, and peptic ulcer-associated hospitalizations in a Canadian Indian population. *Digestive diseases and sciences*, 44, 4, 668-74.
- Bhalerao P, 2017. Lyophilization / Freeze Drying: A Review *International Journal of Parenteral and Dermatology*, 1, 1, 24-31
- Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB, 2008. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 134, 2, 388-95.
- Bouic PJD, 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr*, 4, 6, 471-5.
- Brethauer M, 2010. Evidence for colorectal cancer screening. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*, 24, 4, 417-25.
- Brethauer M, 2010. Which tool is best for colorectal cancer screening? *Brit Med J*, 340.
- Brethauer M, 2011. Colorectal cancer screening. *Journal of internal medicine*, 270, 2, 87-98.
- Brooks PC, 1996. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer metastasis reviews*, 15, 2, 187-94.
- Burdge GC, Calder PC, 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*, 45, 5, 581-97.
- Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P, 2006. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *European journal of cancer*, 42, 2, 216-27.
- Caliskan O, Polat AA, 2011. Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (*Ficus carica* L.) accessions from the eastern Mediterranean region of Turkey. *Sci Hortic-Amsterdam*, 128, 4, 473-8.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ, 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*, 348, 17, 1625-38.
- Carroll C, Cooper K, Papaioannou D, Hind D, Pilgrim H, Tappenden P, 2010. Supplemental calcium in the chemoprevention of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical therapeutics*, 32, 5, 789-803.

- Carvalho IS, Miranda I, Pereira H, 2006. Evaluation of oil composition of some crops suitable for human nutrition. *Ind Crop Prod*, 24, 1, 75-8.
- Cavallaro U, Christofori G, 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4, 2, 118-32.
- Stages of Colorectal Cancer, 2018. Erişim tarihi Ocak 2018. Erişim adresi, <https://www.cedars-sinai.edu/Patients/Programs-and-Services/Colorectal-Cancer-Center/Services-and-Treatments/Stages-of-Colorectal-Cancer.aspx>.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E, 2009. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 59, 6, 366-78.
- Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE, 2005. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama*, 293, 2, 172-82.
- Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, Jemal A, Yu XQ, He J, 2016. Cancer statistics in China, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66, 2, 115-32.
- Chua ACN, Jiang PL, Shi LS, Chou WM, Tzen JTC, 2008. Characterization of oil bodies in jelly fig achenes. *Plant Physiol Bioch*, 46, 5-6, 525-32.
- Clark AG, Vignjevic DM, 2015. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current opinion in cell biology*, 36, 13-22.
- Colorectal Cancer, 2018. Cleveland Clinic, Erişim tarihi Ocak 2018. Erişim adresi, <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/14501-colorectal-cancer>.
- Colditz GA, Cannuscio CC, Frazier AL, 1997. Physical activity and reduced risk of colon cancer: implications for prevention. *Cancer causes & control : CCC*, 8, 4, 649-67.
- Conforti F, Menichini G, Zanfini L, Tundis R, Statti GA, Provenzano E, Menichini F, Somma F, Alfano C, 2012. Evaluation of phototoxic potential of aerial components of the fig tree against human melanoma. *Cell Proliferat*, 45, 3, 279-85.
- Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, Zhao R, Hyland LM, Wexner SD, Giardiello FM, 2006. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 4, 8, 1035-8.
- Cushnie TP, Lamb AJ, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26, 5, 343-56.
- Danaei G, Ding EL, Mozaffarian D, Taylor B, Rehm J, Murray CJ, Ezzati M, 2009. The preventable causes of death in the United States: comparative risk assessment of dietary, lifestyle, and metabolic risk factors. *PLoS medicine*, 6, 4, e1000058.
- Darmstadt GL, Mao-Qiang M, Chi E, Saha SK, Ziboh VA, Black RE, Santosham M, Elias PM, 2002. Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries. *Acta Paediatr*, 91, 5, 546-54.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB, 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7, 1, 11-20.
- DeVita VT, Jr., Young RC, Canellos GP, 1975. Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. *Cancer*, 35, 1, 98-110.
- du Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z, 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 166, 1-2, 63-9.
- Dusek RL, Attardi LD, 2011. Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nature reviews. Cancer*, 11, 5, 317-23.
- Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zaubler AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LA, 2010. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*, 116, 3, 544-73.

- Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL, Caplan MJ, 2004. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*, 304, 5670, 600-2.
- Ercisli S, Tosun M, Karlidag H, Dzubur A, Hadziabulic S, Aliman Y, 2012. Color and antioxidant characteristics of some fresh fig (*Ficus carica* L.) genotypes from northeastern Turkey. *Plant foods for human nutrition*, 67, 3, 271-6.
- Escarpa A, Gonzalez MC, 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of chromatography. A*, 823, 1-2, 331-7.
- Fernando Vallejo JGM, Francisco A. Tomás-Barberán, 2012. Phenolic compound content of fresh and dried figs (*Ficus carica* L.). *Food chemistry*, 130, 3, 485-92.
- Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Jensen MK, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Rohrmann S, Linseisen J, Boeing H, Bergmann M, Kontopoulou D, Trichopoulou A, Kassapa C, Masala G, Krogh V, Vineis P, Panico S, Tumino R, van Gils CH, Peeters P, Bueno-de-Mesquita HB, Ocke MC, Skeie G, Lund E, Agudo A, Ardanaz E, Lopez DC, Sanchez MJ, Quiros JR, Amiano P, Berglund G, Manjer J, Palmqvist R, Van Guepelen B, Allen N, Key T, Bingham S, Mazuir M, Boffetta P, Kaaks R, Riboli E, 2007. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *International journal of cancer*, 121, 9, 2065-72.
- Folkman J, 1996. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American*, 275, 3, 150-4.
- Folkman J, Shing Y, 1992. Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 267, 16, 10931-4.
- Garcia-Alonso M, Pascual-Teresa, S., Santos-buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry*, 84, 1, 13-8.
- Garrod D, Chidgey M, 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1778, 3, 572-87.
- Giepmans BN, van Ijzendoorn SC, 2009. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*, 1788, 4, 820-31.
- Gill S, Blackstock AW, Goldberg RM, 2007. Colorectal cancer. *Mayo Clinic proceedings*, 82, 1, 114-29.
- Ginsberg GM, Lim SS, Lauer JA, Johns BP, Sepulveda CR, 2010. Prevention, screening and treatment of colorectal cancer: a global and regional generalized cost effectiveness analysis. *Cost effectiveness and resource allocation : C/E*, 8, 2.
- Giovannucci E, 2007. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *The American journal of clinical nutrition*, 86, 3, s836-42.
- Gond NY, Khadabadi SS, 2008. Hepatoprotective Activity of *Ficus carica* Leaf Extract on Rifampicin-Induced Hepatic Damage in Rats. *Indian J Pharm Sci*, 70, 3, 364-U2.
- Hashemi SA, Abediankenari S, Ghasemi M, Azadbakht M, Yousefzadeh Y, Dehpour AA, 2011. The Effect of Fig Tree Latex (*Ficus carica*) on Stomach Cancer Line. *Iranian Red Crescent medical journal*, 13, 4, 272-5.
- Hawley ST, Volk RJ, Krishnamurthy P, Jibaja-Weiss M, Vernon SW, Kneuper S, 2008. Preferences for colorectal cancer screening among racially/ethnically diverse primary care patients. *Med Care*, 46, 9, S10-S6.
- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M, 2000. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *The American journal of pathology*, 156, 5, 1515-25.
- Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE, 2004. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *New Engl J Med*, 351, 26, 2694-703.

- J. A. Duke MJB-g, J. Du collier, and P. K. Duke, 2002. Hand Book of Medicinal Herbs, Boca Raton, Fla, USA, CRC Press, p.
- Johns LE, Houlston RS, 2001. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. The American journal of gastroenterology, 96, 10, 2992-3003.
- Khodarahmi GA, Ghasemi N, Hassanzadeh F, Safaie M, 2011. Cytotoxic Effects of Different Extracts and Latex of *Ficus carica* L. on HeLa cell Line. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR, 10, 2, 273-7.
- Kim S, Sandler DP, Galanko J, Martin C, Sandler RS, 2010. Intake of polyunsaturated fatty acids and distal large bowel cancer risk in whites and African Americans. American journal of epidemiology, 171, 9, 969-79.
- Kristjansson SR, Nesbakken A, Jordhoy MS, Skovlund E, Audisio RA, Johannessen HO, Bakka A, Wyller TB, 2010. Comprehensive geriatric assessment can predict complications in elderly patients after elective surgery for colorectal cancer: a prospective observational cohort study. Critical reviews in oncology/hematology, 76, 3, 208-17.
- Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G, 2012. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 161, 2, 175-87.
- Larsson SC, Orsini N, Wolk A, 2005. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. Journal of the National Cancer Institute, 97, 22, 1679-87.
- Larsson SC, Wolk A, 2007. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. The American journal of clinical nutrition, 86, 3, 556-65.
- Letawe C, Boone M, Pierard GE, 1998. Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. Clin Exp Dermatol, 23, 2, 56-8.
- Li L, Tsao R, Yang R, Kramer JKG, Hernandez M, 2007. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *Cordiformis*) and persian walnut (*Juglans regia* L.). Journal of agricultural and food chemistry, 55, 4, 1164-9.
- Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ, 2011. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kappaB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. British journal of pharmacology, 162, 1, 237-54.
- Liu FF, Yang ZS, Zheng X, Luo SL, Zhang KQ, Li GH, 2011. Nematicidal coumarin from *Ficus carica* L. J Asia-Pac Entomol, 14, 1, 79-81.
- Luo J, Lubaroff DM, Hendrix MJ, 1999. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. Cancer research, 59, 15, 3552-6.
- Lynch HT, de la Chapelle A, 2003. Hereditary colorectal cancer. The New England journal of medicine, 348, 10, 919-32.
- M. Werbach, 1993. Healing with Food, New York, NY, USA, p.
- M.Werbach, 1993. Healing with Food, NewYork, NY, USA, HarperCollins, p.
- Maghfoor I, 1999. Colorectal cancer. Lancet, 353, 9157, 1013.
- Manal Said Tawfik MA, 2014. Antioxidants in Fig (*Ficus carica* L.) and their effects in the prevention of atherosclerosis in hamsters. Journal of Food and Nutrition Sciences, 2, 4, 138-45.
- Marshall JL, 2008. Managing potentially resectable metastatic colon cancer. Gastrointestinal cancer research : GCR, 2, 4 Suppl, S23-6.
- Martin TA YL, Sanders AJ, Jane Lane, and Wen G. Jiang, (2013). Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. Jandial R, Landes Bioscience, Austin (TX).
- Matsumura Y, 2008. Polymeric micellar delivery systems in oncology. Japanese journal of clinical oncology, 38, 12, 793-802.
- Mawa S, Husain K, Jantan I, 2013. *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. Evid-Based Compl Alt.

- Menichini G, Alfano C, Provenzano E, Marrelli M, Statti GA, Somma F, Menichini F, Conforti F, 2012. Fig Latex (*Ficus carica* L. cultivar Dottato) in Combination with UV Irradiation Decreases the Viability of A375 Melanoma Cells In Vitro. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12, 8, 959-65.
- Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, Kumar N, 2013. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 86, 3, 232-50.
- Mueller T, Voigt W, 2011. Fermented wheat germ extract--nutritional supplement or anticancer drug? *Nutrition journal*, 10, 89.
- Nomoto H, Iigo M, Hamada H, Kojima S, Tsuda H, 2004. Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutrition and cancer*, 49, 1, 81-8.
- Oliveira AP, Valentao P, Pereira JA, Silva BM, Tavares F, Andrade PB, 2009. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47, 11, 2841-6.
- Ono M, Torisu H, Fukushi J, Nishie A, Kuwano M, 1999. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43 Suppl, S69-71.
- Özbek S, 1977. Genel Meyvecilik, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:111.
- Pande G, Akoh CC, 2010. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food chemistry*, 120, 4, 1067-75.
- Park YS, Huh JW, Lee JH, Kim HR, 2012. shRNA against CD44 inhibits cell proliferation, invasion and migration, and promotes apoptosis of colon carcinoma cells. *Oncology reports*, 27, 2, 339-46.
- Pilar Prieto MP, Miguel Aguilar, 1999. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 2, 337-41.
- Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjonneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guernec G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PHM, Bueno-De-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E, 2006. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 13, 920-31.
- R. Ahmad HMH, Z.M. Noor, N.H. Ismail, F. Salim, N.H. Lajis and K. Shaari, 2011. Antioxidant and Antidiabetic Potential of Malaysian Uncaria. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5, 5, 587-95.
- Risio M, 2010. The natural history of adenomas. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*, 24, 3, 271-80.
- Rubnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M, Mechoulam R, 2001. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: Isolation and structure elucidation. *Journal of natural products*, 64, 7, 993-6.
- Saban N, Stepanic V, Vucinic S, Horvatic A, Cindric M, Perkovic I, Zorc B, Orsolic N, Mintas M, Pavelic K, Pavelic SK, 2013. Antitumor mechanisms of amino Acid hydroxyurea derivatives in the metastatic colon cancer model. *International journal of molecular sciences*, 14, 12, 23654-71.
- Saeed MA, Sabir AW, 2002. Irritant potential of triterpenoids from *Ficus carica* leaves. *Fitoterapia*, 73, 5, 417-20.

- Sağlık Bakanlığı TC, (2017). 2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri. Türkiye, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu: 44.
- Saldeen T, Li D, Mehta JL, 1999. Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*, 34, 4, 1208-15.
- Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA, 2005. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, 7, 3, 204-13.
- Schatzkin A, Freedman LS, Dawsey SM, Lanza E, 1994. Interpreting Precursor Studies - What Polyp Trials Tell Us About Large-Bowel Cancer. *Jnci-J Natl Cancer I*, 86, 14, 1053-7.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A, 2017. *Cancer Statistics, 2017*. CA: a cancer journal for clinicians, 67, 1, 7-30.
- Silva BM, Andrade PB, Valentao P, Ferreres F, Seabra RM, Ferreira MA, 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and Jam: antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 15, 4705-12.
- Sirnes S, Bruun J, Kolberg M, Kjenseth A, Lind GE, Svindland A, Brech A, Nesbakken A, Lothe RA, Leithe E, Rivedal E, 2012. Connexin43 acts as a colorectal cancer tumor suppressor and predicts disease outcome. *International journal of cancer*, 131, 3, 570-81.
- Soltana H, Tekaya M, Amri Z, El-Gharbi S, Nakbi A, Harzallah A, Mechri B, Hammami M, 2016. Characterization of fig achenes' oil of *Ficus carica* grown in Tunisia. *Food chemistry*, 196, 1125-30.
- Soreide K, 2011. *Advances in the Understanding and Treatment of Colorectal Cancer*.
- Soreide K, Buter TC, Janssen EA, Gudlaugsson E, Skaland I, Korner H, Baak JP, 2007. Cell-cycle and apoptosis regulators (p16INK4A, p21CIP1, beta-catenin, survivin, and hTERT) and morphometry-defined MPECs predict metachronous cancer development in colorectal adenoma patients. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, 29, 4, 301-13.
- Soreide K, Nedrebo BS, Reite A, Thorsen K, Korner H, 2009. Endoscopy, morphology, morphometry and molecular markers: predicting cancer risk in colorectal adenoma. *Expert review of molecular diagnostics*, 9, 2, 125-37.
- Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, Chinou I, Kassi E, Karabournioti S, Moutsatsou P, 2014. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PloS one*, 9, 4, e94860.
- St Hill CA, 2011. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. *Front Biosci-Landmark*, 16, 3233-51.
- Sudhakar A, 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1, 2, 1-4.
- Tezcan G, Tunca B, Bekar A, Yalcin M, Sahin S, Budak F, Cecener G, Egeli U, Demir C, Guvenc G, Yilmaz G, Erkan LG, Malyer H, Taskapilioglu MO, Evrensel T, Bilir A, 2015. *Ficus carica* latex prevents invasion through induction of let-7d expression in GBM cell lines. *Cellular and molecular neurobiology*, 35, 2, 175-87.
- Tomeo CA, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci E, Platz E, Rockhill B, Dart H, Hunter DJ, 1999. *Harvard Report on Cancer Prevention. Volume 3: prevention of colon cancer in the United States*. *Cancer causes & control : CCC*, 10, 3, 167-80.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A, 2015. *Global cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians, 65, 2, 87-108.
- Trichopoulou A, Vasilopoulou E, Georga K, Soukara S, Dilis V, 2006. Traditional foods: Why and how to sustain them. *Trends Food Sci Tech*, 17, 9, 498-504.
- Ficus carica* Taxon, 2018. Türkiye Bitkileri Veri Servisi, Erişim tarihi Ocak. Erişim adresi, http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=8427.

- Ullman SB, 1952. The inhibitory and necrosis-inducing effects of the latex of *Ficus carica* L. on transplanted and spontaneous tumours. *Experimental medicine and surgery*, 10, 1, 26-49.
- Ullman SB, Clark GM, Roan KM, 1952. The effects of the fraction R3 of the latex of *ficus carica* L. on the tissues of mice bearing spontaneous mammary tumors. *Experimental medicine and surgery*, 10, 4, 287-305.
- Ullman SB, Halberstaedter, L., Leibowitz, J. , 1945. Some pharmacological and biological effects of the latex of *Ficus carica*. *Experimental medicine and surgery*, 3, 11-23.
- V. L. Singleton JAR, 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3, 144-58.
- van Dam L, Kuipers EJ, van Leerdam ME, 2010. Performance improvements of stool-based screening tests. *Best Pract Res Cl Ga*, 24, 4, 479-92.
- Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J, 2005. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 1, 44-50.
- Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F, 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 66, 1, 107-19.
- W.Brand-Williams MEC, C.Berset, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 1, 25-30.
- Wai Wong C, Dye DE, Coombe DR, 2012. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *International journal of cell biology*, 2012, 340296.
- Wang J, Wang XJ, Jiang S, Lin P, Zhang J, Lu YR, Wang Q, Xiong ZJ, Wu YY, Ren JJ, Yang HL, 2008. Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3, 1025-33.
- Wang L, Zhang, Z., Zhao, C., Tang, X., Ma, J., 2013 Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of oil from fig fruit (*ficus carica* L.) seeds using response surface methodology. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 13 (1), pp. 37-43.
- Wang Y, Jacobs EJ, Patel AV, Rodriguez C, McCullough ML, Thun MJ, Calle EE, 2008. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. *Cancer causes & control : CCC*, 19, 7, 783-92.
- Wang Y, Yu RY, He QY, 2015. Proteomic Analysis of Anticancer TCMs Targeted at Mitochondria. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 539260.
- Wang Y, Zhang J, Huang ZH, Huang XH, Zheng WB, Yin XF, Li YL, Li B, He QY, 2017. Isodeoxyelephantopin induces protective autophagy in lung cancer cells via Nrf2-p62-keap1 feedback loop. *Cell death & disease*, 8, 6, e2876.
- Wijendran V, Hayes KC, 2004. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr*, 24, 597-615.
- Yamamoto Y, Gaynor RB, 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 107, 2, 135-42.
- Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu CK, 2009. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 14, 6468-73.

7. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Sivas'ta doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Sivas'ta tamamladı. Boğaziçi Üniversitesi Lisansla Birleştirilmiş Tezsiz Yüksek Lisans Programı, Kimya Öğretmenliği bölümünden 2010 yılında mezun oldu. Yüksek lisans eğitimini, 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Biyokimya bölümünde tamamladı ve “Yüksek Kimyager” ünvanı aldı. Doktora eğitimine 2013 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında başladı. 2015 yılında KTO Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalında “Araştırma Görevlisi” olarak çalışmaya başladı ve halen bu göreve devam etmektedir.

