

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ENGİNAR BİTKİSİNDE BULUNAN CYNARİN VE İNÜLİN  
POLİFENOLLERİNİN HEP3B HEPATOMA HÜCRE  
SOYUNDA APOPTOTİK VE İNFLAMATUAR CEVAPLAR  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Diyetisyen Gizem YAMAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2015**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ENGİNAR BİTKİSİNDE BULUNAN CYNARİN VE İNÜLİN  
POLİFENOLLERİNİN HEP3B HEPATOMA HÜCRE  
SOYUNDA APOPTOTİK VE İNFLAMATUAR CEVAPLAR  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Diyetisyen Gizem YAMAN**

**Tez Danışmanı  
Yard.Doç.Dr. Şule Beyhan ÖZDAŞ**

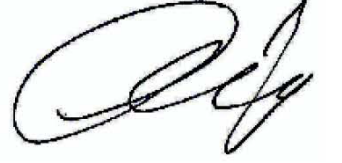
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2015**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gizem Yaman



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	6
4.1.SAĞLIK VE BESLENME	6
4.1.1.Flavanoidler	7
4.1.2.Enginar	8
4.1.3.Cynarin (CYN)	9
4.1.4.İnülin	10
4.2.SERBEST RADİKALLER	11
4.2.1.Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	12
4.2.1.1.ROS'ların Biyolojik Aktiviteleri	13
4.2.2.Serbest Radikallerin Membran Lipidleri Üzerine Etkileri	15
4.2.3.Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri	16
4.2.4.Serbest Radikallerin Karbonhidratlar (CHO) Üzerine Etkileri	17
4.2.5.Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri	17
4.3.OKSİDATİF STRES	18
4.4.ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	19
4.5.PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZİS)	21
4.6.KANSER VE APOPTOZİS İLİŞKİSİ	23
4.6.1.Kanser Oluşumu (Karsinogenezis)	23
4.6.2.Kanser Oluşumunda Rol Oynayan Genler	24
4.6.3.Kanserojen Ajanlar	25
4.7.HEP3B HÜCRE SOYU	26
5.MATERYAL VE YÖNTEM	27
5.1.KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR	27
5.1.1.Kullanılan Cihazlar	27
5.1.2.Kullanılan Kimyasallar	28
5.1.3. Gereçler	29

5.1.4.Antikorlar ve Kullanılan Kitler	29
5.1.4.1.Antikorlar	29
5.1.4.2. Kitler	30
5.1.5.Yazılım Programları	30
5.2.HEP3B HÜCRE SOYU VE ÇOĞALTILMASI	31
5.3.MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ	32
5.4.POLY AKRİLAMİDE JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)	34
5.4.1.Total Protein Elektroforezi	35
5.4.2.Protein Elektroforezi	36
5.5. WESTERN İŞARETLEME	37
5.5.1.Proteinlerin Jel'den Membrana Transferi	38
5.5.2.Proteinlerin Membran Üzerinde İşaretlenmesi (Blotting)	38
5.2.3.İşaretlenen Proteinlerin Görüntülenmesi	41
5.6.İMMÜNSİTOKİMYA/İMMÜNFLUORESAN (IF) BOYAMA	42
6.BULGULAR	44
6.1.HÜCRE CANLILIĞI/SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI	44
6.2.WESTERN İŞARETLEME SONUÇLARI	46
6.3.İMMÜNFLUORESAN (IF) İŞARETLEME SONUÇLARI	51
7.TARTIŞMA	56
8.SONUÇ	63
9.TEŞEKKÜRLER	64
10.KAYNAKLAR	65
EKLER	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**APAF-1** : Apoptotik proteaz aktive eden faktör

**BCL-2** : B hücresi lenfoma 2

**BSA** : Bovin serum albumin

**DMEM** : Dulbecco's minimum elzem besiyeri

**DMSO** : Dimetil sülfoksit

**DNA** : Deoksiribonükleik asit

**DSÖ** : Dünya Sağlık Örgütü

**FASL** : Fas Ligandı

**FBS** : Fetal bovin serum

**GSH** : Glutasyon

**GST** : Glutasyon-s-transferaz

**HBSS** : Hank's balanced salt solution

**HIV** : İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Hidrojen peroksit

**IAP** : Apoptozisi inhibe edici protein

**IF** : İmmünfluoresan

**IL** : İnterlökin

**LDL** : Düşük yoğunluklu lipoprotein

**MDA** : Malondialdehit

**MTT** : Tiazoyil mavi tetrazolyum bromid

**NO** : Nikrik oksit

**PBS** : Phosphate buffered saline

**RNA** : Ribonükleik asit

**ROS** : Reaktif oksijen türleri

**SMAC-Diablo** : Second mitochondria-derived-activating factor 1

**SOD** : Süperoksit dismutaz

**TK** : Total kolestrol

**TNF** : Tümör nekroz faktörü

**TNF-R** : Tümör nekroz faktörü reseptörü

**TRIS** : Tris-[hidroksimetil]aminomethan

**t-BPH** : tert-bütilhidroperoksit

**WHO** : World Health Organization

**WB** : Western Blot (İşaretleme)

**μ** : mikro

**μl** : mikrolitre

**mg** : miligram

**α** : alfa

**β** : beta

**nm** : nanometre

İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'nun 28.04.2015 tarihli 30-248 sayılı kararınca etik kurul onayı alınmıştır.

**Yüksek Lisans Tez Proje No:** TGB/YL/1962014

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 4.1. Cynarin (1,3-O-dikafeoilkinik asit)	9
Şekil 4.2. İnülin'in kimyasal yapısı	10
Şekil 4.3. Hücre hasarında önemli olan biyokimyasal yollar	15
Şekil 4.4. Lipid peroksidasyonunun oluşum mekanizması	16
Şekil 4.5. Oksidatif stres	18
Şekil 4.6. Antioksidan savunma sistemleri serbest radikallerin etkilerini nötralize ederler	19
Şekil 4.7. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar	20
Şekil 4.8. Apoptozisin genel görünümü	21
Şekil 4.9. Kanser oluşum mekanizmaları	24
Şekil 5.1. Kültür ortamında Hep3B hücrelerinin invert mikroskop ile görüntülenmesi	32
Şekil 6.1. Cynarin'in Hep3B hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde farklı dozlardaki sitotoksik etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi	45
Şekil 6.2. İnülin'in Hep3B hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde farklı dozlardaki sitotoksik etkilerinin MTT testi ile gösterilmesi	45
Şekil 6.3. Farklı dozlarda Cynarin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde inflamatuvar belirteçlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'ya ait western işaretleme görüntüleri	46



Şekil 6.4. Farklı dozlarda İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde inflamatuvar belirteçlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$ 'ya ait western işaretleme görüntüleri	47
Şekil 6.5. Farklı dozlarda Cynarin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Apaf-1, caspaz-3 ve sitokrom-c'ye ait western işaretleme görüntüleri	48
Şekil 6.6. Farklı dozlarda İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Apaf-1, caspaz-3 ve sitokrom-c'ye ait western işaretleme görüntüleri	49
Şekil 6.7. Farklı dozlarda Cynarin ve İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Apaf-1, caspaz-3 ve sitokrom-c'ye ait western işaretleme görüntüleri	50
Şekil 6.8. 10 <sup>-7</sup> M Cynarin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin görüntülenmesi	51
Şekil 6.9. 10 <sup>-4</sup> M Cynarin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin görüntülenmesi	52
Şekil 6.10. %10'luk İnülin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin görüntülenmesi	53

## **TABLolar DİZİNİ**

## **Sayfa No**

Tablo 4.1. Enginar da bulunan besin ögeleri miktarları (100g)	8
Tablo 4.2. Radikal özellikleri olan ve olmayan reaktif oksijen molekülleri	13
Tablo 4.3. Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller	14
Tablo 4.4. Hücrelerde apoptozise neden olan ve inhibe eden etkenler	22
Tablo 4.5. Protoonkogenlerin işlevleri	25
Tablo 4.6. Karsinogenlerin hücredeki hedefleri ve sonuçları	26
Tablo 5.1. Ripa Buffer içeriği	35

## 1. ÖZET

Beslenme anne karnından itibaren yaşamın sonlanmasına kadar geçen her süreçte yaşamımızın vazgeçilmezi olarak yer alır. Bireylerin yeterli ve dengeli beslenmesi, kalp-damar hastalıkları, diyabet, obezite, kanser vb. hastalıkların görülme riskinin azaltılması ve tedavisinde, vitamin mineral yetersizliklerinin ve protein-enerji malnütrisyonunun önlenmesi gibi beslenme sorunlarının en aza indirilmesinde rol oynamaktadır. Aynı zamanda yeterli ve dengeli beslenme, besin öğeleri ve diğer biyoaktif maddelerin yeteri kadar alınmasını ve besin öğelerinin öğünlere dengeli olarak dağıtılmasını gerektirir.

Meyve ve sebzelerde yüksek düzeyde bulunan polifenollerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri çoğunlukla in vitro çalışmalarla ortaya konmuş olup bu bileşiklerin insanlardaki metabolik dönüşümleri ve biyoyararlılık konuları göz ardı edilmiştir. Antikanserojen ve diğer yararlı özellikler içeren bu bileşiklere doğal antioksidanlar da denilmektedir. Polifenollerin koruyucu etkisinin en önemli nedeni, antioksidan aktiviteye sahip olmalarıdır. Bu bağlamda, serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitenin belirlenmesi ile söz konusu hastalıklara yakalanma riskini azaltmak üzere tedavide antioksidan alımı önemli olmaktadır. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Reaktif oksijen türleri, kanser oluşumunda bir aracı görevi görürler ve mutagenез, karsinogenез ve programlı hücre ölümüne (apoptoz) yol açan DNA zincir kırılmalarından sorumludurlar. Apoptozis, onkogenезis ve hücre siklusu ile yakın ilişki göstermektedir. Bu nedenle apoptotik yolakların ortaya konması, bu yolaklarla kullanacağımız polifenollerimizin hücre siklusu etkileşimlerinin araştırılması oldukça büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmamızda, Hep3B hücre soyunda apoptozis ve inflamatuvar süreçte, enginar bitkisinin (*Cynara Scolymus*) polifenollerinden Cynarin ve İnülin'in etki mekanizmalarına bakılacaktır. Apoptotik belirteçlerden; kaspaz-3, Smac-Diablo, Apaf-I, ve sitokrom-c düzeylerine, inflamasyon sitokinlerinden; IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerine bakılacaktır.

Key words: Polifenoller, Cynarin, İnülin, Oksidatif stres, Hep3B, Apoptozis, Antioksidan

## 2. SUMMARY

Nutrition is the most important part in every era of our lives from mother's womb till death. Eating healthy and regularly reduces the chance of heart-vain problems, diabetes, obesity, cancer etc. and in treatment it plays a significant role in vitamin insufficiency and prevent nutrition problems like protein-energy malnutrition. At the same time, adequate and balanced nutrition ensure sufficient take of the nutritional elements and other bioactive materials and helps splitting in balance the nutritional elements to the meals.

Polyphenols which are found in large amount in fruits and vegetables, health benefits were discovered by 'in vitro' researches and ignored the components metabolically transformations and bio-efficiency in humans. These components which contain anti-carcinogenic and other beneficial properties are called 'organic antioxidants'. The main reason for Polyphenols protection effects is having antioxidant activities. Therefor with the creation of free radicals and determining the capacity of antioxidants, avoiding and curing the diseases in question would be easier. But in some cases, the available antioxidant defense system is not enough to prevent all the free radicals and a case that is called oxidative stress, is formed. Reactive oxygen types give assignment to an instrument in cancers formation and responsible in mutagenesis, carcinogenesis and scheduled cell deformation (apoptosis). They show close relations with apoptosis, oncogenes and cell cycle. So presenting the apoptotic paths will lead to polyphenols which by using, it would open up very important ways for research of interaction of cell cycles.

Our study emphasis on Cynarin and Inuline effect mechanisms of artichoke plants (*Cynara Scolymus*) polyphenols in Hep3B cell strains apoptosis and inflammatory states. Researches include caspase-3, Smac-Diablo, Apaf-I and cytochrome c level from apoptotic identifier, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  level from inflammation cytokines.

Key words: Polyphenols, Cynarin, Inuline, Oxidative stress, Hep3B, Apoptosis, Antioxidant

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Beslenme anne karnından itibaren yaşamın sonlanmasına kadar geçen her süreçte yaşamımızın vazgeçilmezi olarak yer alır. Bireylerin yeterli ve dengeli beslenmesi, kalp-damar hastalıkları, diyabet, obezite, kanser vb. hastalıkların görülme riskinin azaltılması ve tedavisinde, vitamin-mineral ve protein-enerji malnütrisyonunun önlenmesi gibi beslenme sorunlarının en aza indirilmesinde rol oynamaktadır. Aynı zamanda yeterli ve dengeli beslenme, besin öğeleri ve diğer biyoaktif maddelerin yeteri kadar alınmasını, besin öğelerinin öğünlere dengeli olarak dağıtılmasını ve bireye özel olarak planlanmasını gerektirir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre insanlar, zamanlarının ve ekonomik imkanlarının önemli bir kısmını sağlıksız beslenmeden kaynaklanan sorunları çözebilmek için harcamaktadırlar. Bitkisel ağırlıklı beslenen bireylerin kendilerini daha zinde hissettiklerini bildiren raporda, sağlıklı ve zinde bir yaşam için diyetin büyük kısmının taze sebze ve meyvelerden oluşan bir diyet olması önerilmektedir (1). Çeşitli hastalık gruplarında yapılan çalışmalarda, sebze ve meyveden zengin diyetle beslenmenin kalp-damar hastalıkları, hipertansiyon, diyabet ve kanser gibi hastalıklara yakalanma risklerinden önemli ölçüde koruyucu potansiyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (2).

Son yıllarda ise, bitkisel ekstraktlardan farklı kullanım alanları ile ilgili çalışmalar bir çok laboratuarda sürdürülmektedir. Özellikle son dönemlerde bu ekstraktların kanser hastalığının tedavisinde, antioksidan, antimitotik, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri üzerine dikkat çekilmektedir. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda, enginar bitkisinde bulunan önemli polifenollerden olan Cynarin ve İnülin'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğu iddia edilmektedir (3). Biz de bu çalışmamızda Cynarin ve İnülin'in karaciğer hücresi kanser soyu olan Hep3B hücre soyunda apoptotik ve inflamatuvar yollardaki etki mekanizmalarını aydınlatmayı amaçladık.

İnflamatuvar yanıtta; serbest radikallerin etkisi antioksidan savunma sistemleri tarafından inaktive edilme oranına bağlıdır. Hücrede oluşan oksidatif stres, vücudun antioksidan savunmasıyla hücrelerin serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Hücrede oluşan oksidatif stres sonrası, uyarılan makrofaj ve diğer hücreler

sitokinler olarak tanımlanan, hücresel reaksiyonları yönlendiren proteinleri salgırlar ve inflamatuvar süreç başlar. Oksidatif stres ile birlikte oluşan ve reaktif oksijen türleri (ROS) / metabolitleri olarak bilinen moleküller özellikle lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. Aerobik (oksijenli solunum yapan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir (4). Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Reaktif oksijen türleri, kanser oluşumunda bir aracı görev görürler ve mutagenез, karsinogenез ve hücre ölümüne yol açan DNA zincir kırılmalarından sorumludurlar (5). Sitotoksisite, nükleik asit baz modifikasyonundan doğan kromozom değışikliklerine ve DNA bozukluklarına bağlıdır. DNA, reaktif oksijen molekülleri tarafından oksidatif hasara uğratıldığı zaman, hasar ürünü olarak modifiye nükleotidler oluşur. Bu ürünler hücrelerden ve dokulardan elde edilen DNA materyallerinde, serumda ve idrarda ölçülebilen oksidatif stres belirteçidir. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek DNA yapısında değışikliklere yol açar. Aktif nötrofillerde oluşan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), zarlardan geçip çekirdeğe ulaşır ve DNA hasarına, hatta programlı bir şekilde hücre ölümüne (apoptozis) yol açar. Bu bağlamda, serbest radikal oluşumunun ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ile söz konusu hastalıklara yakalanma riskinin azaltmak üzere tedavide antioksidan alımı önemli olmaktadır.

Apoptozis ise, çok hücreli organizmalarda artık gereksinim duyulmayan veya organizma için tehdit oluşturan hücrelerin programlı bir şekilde yok edilmesidir. Apoptozis sitoplazma ve çekirdekteki belirli proteinleri keserek apoptozisi başlatan ve kaspaz denilen proteolitik enzimlerle gerçekleşir. Kaspazlar tüm hücrelerde etkin olmayan öncüller ya da prokaspazlar olarak bulunur ve genellikle diğer kaspazlar tarafından kesilip etkinleşerek, proteolitik bir kaspaz topluluğu oluştururlar. Etkinleşme süreci, hücre içi uyarlayıcı moleküllerin bir araya gelmesine ve prokaspazları etkinleştirmesine neden olan hücre dışı veya hücre içi ölüm sinyalleri tarafından başlatılır. Uyarılan mitokondriler elektron taşıyıcı protein sitokrom-c'yi sitozole salarak burada Apaf-I adlı uyarlayıcı bir proteine bağlanmasını ve onu etkinleştirmesini sağlarlar. Bu yanıt genellikle, mitokondrilerde sitokrom-c'nin salınmasını başlatan proteinleri kodlayan genlerin yazılımını etkinleştiren p53'e ihtiyaç duyar. Kaspaz etkinleşmesi, Bcl-2 ve IAP (Apoptozisi İnhibe Edici Protein

Ailesi) tarafından düzenlenmektedir. Apoptozis sürecinde Bax yolağı ve Fas yolağı olarak birbirleriyle ilişkili iki yolak etkindir ve bu iki yolağın da son noktası kaspazların aktivasyonudur. APO-I veya CD95 olarak da bilinen Fas, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesine üye olan bir hücre zarı proteinidir. Fas yolağında parakrin ya da otokrin olarak üretilen bir Fas ligandı (FasL) Fas reseptörüne bağlanır ve bu reseptörün hücre içi ölüm bölümü daha sonra kaspaz 8'i aktive edecek olan adaptör proteinlerin eşleşmesini yapar. Kaspaz 8, hücre yıkımını başlatmak için diğer kaspazları aktifleştirir. Bax yolağında ise, Bax kanal proteini mitokondri zarına bir kaspaz aktivatörü olan sitokrom-c kaçacağını kolaylaştırmak için girer ve süreç diğer kaspazların aktivasyonu ile hücre yıkımına kadar ilerler (6,7).

Çalışmamızda etkinliğini araştıracağımız İnülin; soğan, sarımsak, pırasa, hindiba ve enginar gibi birçok sebze bulunan bir fruktoz oligomeridir (8). İnce bağırsakta sindirimi ve emilimi gerçekleşmezken, kolonda yaralı bakteriler tarafından emilimi söz konusudur (9). Başta kalsiyum olmak üzere birçok mineralin emilimini etkileyerek, kemik mineral yoğunluğunu artırır ve osteoporoz riskini azaltır. Aynı zamanda bağışıklık sistemini uyarır, karaciğer de yağ yapımını azaltır, hiperinsülinemiyi önleyerek karsiyovasküler hastalık riskini düşürür. İnülin'in kötü huylu tümörlerin gelişmesini engelleyerek veya azaltarak, kalın bağırsak kanseri riskini düşürdüğüne dair çalışmalar da bulunmaktadır (10). Enginar bitkisinde bulunan diğer fonksiyonel besin bileşenlerinden Cynarin'in ise, insanlarda yapılan çalışmalarda antioksidan savunma sistemi üzerinde potansiyel olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (11). Bazı çalışmalarda ise, karaciğer koruyucu etkisinin yanı sıra kolesterol biyosentezi inhibe ederek, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu sağladığı gözlemlenmiştir (12).

Bu çalışmamızda, Hep3B hücre soyunda apoptozis ve inflamatuvar süreçte, enginar bitkisinin polifenollerinden Cynarin ve İnülin'in uygun konsantrasyonlarda etki mekanizmalarına bakılacaktır. Apoptotik belirteçlerden; kaspaz 3, SMAC-Diablo, Apaf-1 ve sitokrom-c; inflamasyon sitokinlerinden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerine bakılacaktır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. SAĞLIK VE BESLENME

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-World Health Organisation (WHO))'nun tanımlamasına göre sağlık ‘fiziksel, zihinsel ve sosyal yönden tam bir iyilik halidir’. Beslenme ise; büyüme, gelişme, yaşamın sürdürülebilmesi ve sağlığın korunması için besinlerin kullanılmasıdır. Beslenme biliminin konusunu, beslenmede esas olan besin öğelerinin türleri, miktarları, özellikleri ve vücut çalışmasındaki görevleri; besinlerin birleşimi, fiziksel ve kimyasal özellikleri, üretimden tüketime değin uygulanan işlemlerin besin kalitesi üzerine etkileri; değışik yaş, cinsiyet, çalışma ve özel sağlık durumları olan birey ve/veya toplum için en uygun beslenme planlarının ve yaklaşımların belirlenmesi oluşturur (13).

Toplumda önemli oranda morbidite ve mortalite nedeni olan beslenmeye bağlı gelişen hastalıklar bu konuda toplumun eğitilmesi ile büyük oranda azaltılabilir (14). Bu yüzden beslenmenin amacı; bireyin yaşı, cinsiyeti ve içinde bulunduğu fizyolojik ortama göre gerekli olan besin öğelerinin yeterince alınmasıdır. Bu durum her yönden yeterli ve dengeli beslenme olarak açıklanabilir. Yeterli beslenme, organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için gereken enerjinin karşılanması ve vücudumuzun gereksinim duyduğu tüm besin öğelerinin de gerektiği kadar alınmasıdır (15). Bugüne değin yapılan bilimsel araştırmalar insanın yaşamı için 50'ye yakın türde besin öğesine gereksinimi olduğunu ortaya koymuştur (16). Besinler, içerdikleri besin öğeleri ve besin öğesi olmayan kimyasallar açısından farklıdır. Vücudun gereksinimi olan besin öğeleri ve diğer kimyasalların çeşit ve miktar olarak yeterli düzeyde sağlanabilmesi için değışik türde besinler tüketilmelidir. Öğünlerde farklı türde besinlerin tüketilmesi ile dengeli beslenme sağlanabilir. Besin çeşitliğinin az olması besin öğelerinin yetersiz alınmasına neden olabilir. Aynı besin grubunda yer alan besinlerin besin öğesi içerikleri birbirinin aynı



değildir. Bu yüzden yalnızca 4 temel besin grubunun çeşitliliği değil, aynı grupta yer alan besinlerin de çeşitliliği sağlanmalıdır (17).

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar, beslenme ve hastalıklar arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde ortaya koymaktadır ve epidemiyolojik çalışmalar beslenmenin kronik hastalıkların önlenmesindeki rolüne işaret etmektedir (18). Bununla birlikte beslenme desteğine ihtiyaç artmaktadır. Besleyici özellikleri yanı sıra vücudumuza fizyolojik yarar sağlayan ve/veya kronik hastalık riskini azaltabilen besinlere fonksiyonel besinler denilmektedir. Bu alanda giderek artan çalışmalarda, besin bileşenlerinin sağlık üzerinde olumlu etkilerinin olduğuna, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıkların önlenmesine katkı bulunduğuna dair ilişkin sonuçlar vermektedir (19).

#### **4.1.1. Flavonoidler**

Polifenoller, izoflavonlar ve flavonoidler antioksidan etkinliği güçlü mikro besinlerdir. Bu özellikleri nedeniyle sayılan fitokimyasallar oksidasyonun yarattığı hasara karşı LDL oksidasyonu inhibe ederek hücreleri korurlar. Aynı zamanda polifenoller steroidlerin metabolik profilini ve p450 substralarını değişime uğraticı etki gösterdikleri belirlenmiştir (20).

Fenolik ve protein yapıdaki bu antioksidanlar buldukları doğal ortam olan gıdalarla yapılarını koruyabilirken, sindirim yoluyla vücuda alındıklarında bir takım yapısal değişikliklere uğrayabilmektedirler. Özellikle polifenol ve protein yapısındaki antioksidanların aktiviteleri konusunda çok fazla bilgi mevcuttur (21). Polifenoller enzimlerin aktiviteleri üzerinde azalmaya veya artmaya yol açmaktadır. Fraga ve ark. polifenollerin pankreatik lipaz enziminin aktivitesini azalttıklarını gösterirken; Baxter ve ark. yaptığı çalışmada ise, fenollerin diyetle beraber alınan ve mide-bağırsak sisteminde bulunan enzimlerle etkileşime girerek besin ögesi kaybına ve toksik etkilere ulaşabileceğini bildirmişlerdir (22,23).

Genel olarak bakıldığında, flavanoid ve polifenol bileşiklerini içeren beslenme, kanser hücrelerinde antiproliferatif ve apoptozisi indüklemesi şeklinde etkiler göstermektedir (24).

#### 4.1.2. Enginar

Enginar Astracea familyasının çok eski bilinen, kapitula denilen olgunlaşmamış enginar başı, yenilebilir etki yaprakları ve tablasından oluşan dünya çapında yetiştirilen bir bitki türüdür. Aynı zamanda posa, vitamin, fenolik bileşikler, inülin ve mineralden zengindir (Tablo 4.1) (25,26)

<b>Besin Ögesi</b>	<b>Miktar</b>
Enerji (kcal)	32
Su (g)	89.22
Protein (g)	2.46
Yağ (g)	0.20
Karbonhidrat (g)	2.62
Lif (g)	4.74
Tuz (mg)	164
Demir (mg)	0.88
Sodyum (mg)	65
Fosfor (mg)	51
Kalsiyum (mg)	99
Magnezyum (mg)	55
Potasyum (mg)	425
Çinko (mg)	0.53
C vitamini (mg)	9.6
Riboflavin (mg)	0.040
Niasin (mg)	0.866
Tiamin (mg)	0.042
A vitamini (mg)	4
B6 vitamini (mg)	0.078

**Tablo 4.1.** Enginarda bulunan besin öğeleri miktarları (100g) (TürkKomp) (27)

Enginarın mineral içeriği yetiştirildikleri bölgeye, mevsim farklılıklarına ve genotiplerine göre değişkenlik göstermektedir (28).

Enginar yaprakları geçmişten günümüze alternatif tıpta kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda dispeptik, antioksidatif, koloretik, kolesterol düşürücü ve antikarsinojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (29).

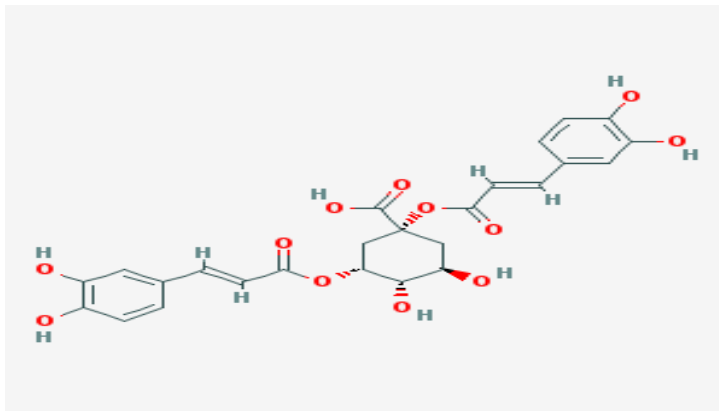
Lupetti ve ark. yaptığı çalışmada 6 hafta boyunca 28 hiperlipidemik bireyden 18'ine 20ml enginar suyu verilmiştir. Total kolesterol (TK) ve LDL (Low Density Lipoprotein) düzeylerinde bir düşüş saptanmazken, endotel fonksiyonlar üzerine olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir (30). Diğer bir çalışmada ise; TK düzeyi 210mg/dl 'den yüksek olan hiperlipidemili bireylerde enginar yaprağı ekstratı TK değerinde anlamlı bir düşüş sağlamıştır (31).

Aynı zamanda Miccadei ve ark. rat hepatosit hücre kültürü ve insan hepatoma kanser soyu olan HepG2 hücre soyunda yapılan hücre kültürü çalışmasında enginar ekstratı GSH düzeyindeki azalmayı önlerken HepG2 hücrelerinin yaşam süresini azalatarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (32).

Enginar güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmekle birlikte oluşan oksidatif streste doza bağımlı olarak stresi inhibe edici etki gösterdiği bulunmuştur (33).

#### 4.1.3. Cynarin (CYN)

Cynarin (CYN) Astracea familyasındaki bitkilerde bulunan bir dikafeoilkinik asit türevidir (Şekil 4.1) (34). En fazla enginarıda baş ve yaprak kısımlarında bulunmaktadır (35).



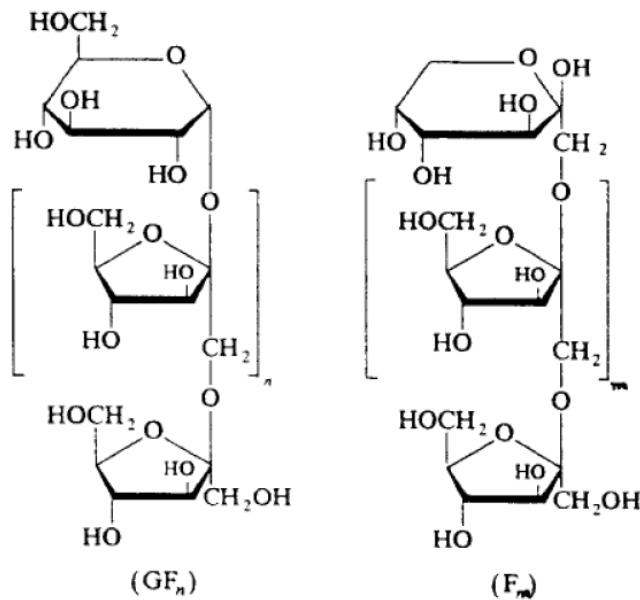
Şekil 4.1. Cynarin (1,3-O-dikafeoilkinik asit)

Flavonoidlerin in vitroda direkt hücre ile muamele edildiğinde ortaya çıkan etkisi ile organizmadaki indirekt etkileri farklıdır. İmmün cevapları değiştirmesi olasıdır. Atasever ve ark. yaptığı çalışmada CYN'nin lösemik hücreler üzerinde doğrudan sitotoksik etkisinin %20 oranında olduğu gösterilmiştir (36). Slanina ve ark. yaptığı çalışmada ise; 400  $\mu\text{M}$ ' kadar uygulanan konsantrasyonlarda HeLa hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemiştir (34).

Gebhardt ve ark. yaptığı bir çalışmada dişi Sprague-Dawley ratlardan izole edilen hepatositlere 3  $\mu\text{M}$  CYN eklenerek hepatoprotektif etkilerine bakılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre CYN'nin t-BPH (tert-butyl hidroperoxide) indüklü malondialdehit (MDA) üretimini azalttığı bulunmuştur (37).

#### 4.1.4. İnülin

İnülin ilk olarak 1804 yılında Alman bilim adamı Rose tarafından "İnula helenium" (andızotu) 'dan izole edilmiş, ancak inülin adını ilk olarak Thompson 1808' de kullanmıştır (38). Fruktoz monomerlerinin polimeridir ve soğan, sarımsak, enginar ve muz da mevcuttur. Kimyasal olarak inülin  $\beta$ -(2-1) fruktozil-fruktoz bağları içeren farklı büyüklüklerde karbonhidratlardır. Bazen bir terminal glükoz ünitesi içerebilmekte ve GF<sub>n</sub> veya F<sub>n</sub> olarak isimlendirilmektedir (Şekil 4.2) (38).



Şekil 4.2. İnülinin kimyasal yapısı

Kısa bağırsakta ki enzimatik hidrolizler, beta bağlarından meydana gelen inülini oluşturur. Bu nedenle, kalın bağırsağa girer ve neredeyse tamamen mikroflora tarafından metabolize edilir (39). Fermente olduğu zaman, asetatın propionata dönüşümünün azalması karbonhidrat için önemli risk faktörü olan serum kolesterol ve LDH değerini azaltır (40).

İnülin aynı zamanda insan kalın bağırsağında probiyotiklere benzer etki gösterir. Bifidobakterilerin büyümesinde uyarıcı etki gösterirken, patojenik bakterilerin (E. Coli, Salmonella gibi) büyümesini inhibe etmektedir (41).

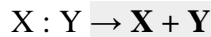
Rafter ve ark. yaptığı bir çalışmada, İnülin'in kolon kanserinde kolorektal hücre proliferasyonunun azalmasına, nekrozisin uyarılmasının, genotoksinlerin etkilerinin ve interlökin-2 (IL-2) salınımının azalmasını sağlamaktadır (41).

Cani ve ark. İnülin'in alt grubu olan oligofruktozların yetişkinlerde total enerji alımının azaldığını göstermişlerdir (42).

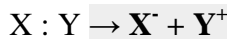
## 4.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir. Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler.

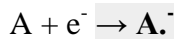
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesidir.



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesidir. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelirler.



3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesidir.



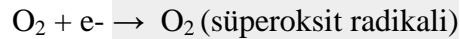
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler (43). Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Mo}^{5+}$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmış elektronlar olduğu halde serbest radikale olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (44,45).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da; serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (46).

#### 4.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksijen, aerobik yaşayan tüm canlıların temel yaşam kaynağı olan, 8 atomlu ve doğada dioksijen ( $\text{O}_2$ ) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu enerji düzeylerinde bulunan elektronların yapısı ile ilişkilidir.

Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi bir elektron bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde 'singlet  $\text{O}_2$ ' oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse oksijen radikalleri ortaya çıkar.



Oluşan bu radikaller eşleşmemiş tek elektronları nedeniyle çok kararsızdırlar ve hızla ortamdan kaybolurlar. Ancak ortamda kaybolmadan önce sahip oldukları tek elektronu bir başka moleküle vererek (oksidasyon) veya başka bir molekülden elektron alarak (redüksiyon) elektronları çift olarak bulundurma eğiliminde bulunurlar. Bunların sonucunda etkiledikleri nonradikal durumdaki yapı radikal yapıya dönüşür. Bu özellikleri nedeni ile reaktif oksijen molekülleri radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki grupta incelenebilir (Tablo 4.2) (47).

I-Radikaller		II- Radikal Olmayanlar	
Süperoksit Radikali	$O_2^-$	Hidrojen Peroksit	$H_2O_2$
Hidroksil Radikali	$OH^\cdot$	Lipid Hidroperoksit	LOOH
Peroksil Radikali	$ROO^\cdot$	Singlet Oksijen	$O_2$
Alkoksil Radikali	$RO^\cdot$	Ozon	$O_3$
Semikinon Radikali	$HQ^\cdot$	Azot Dioksit	$NO_2$

**Tablo 4.2.** Radikal özellikli olan ve olmayan reaktif oksijen molekülleri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve de yapılarının bozulmasına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki ROS'lar, süperoksit anyonu ( $2O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO^\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO^\cdot$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluştururlar (48).

#### 4.2.1.1. ROS'ların Biyolojik Aktiviteleri

Pek çok fizyolojik ve patolojik durumlarda, organizma yüksek oranlarda oksidanlarla ve serbest radikallerle karşı karşıya gelebilir. Metabolik hızın ve oksijen basıncının artması ile redoks etkinliği ksenobiyotiklerin alımının artması yanında hücrel antioksidan yetersizliği sonucunda da oksidan baskının artabileceği gösterilmiştir (49,50). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde (51). Bu dengenin ROS'ların artışı ile bozulması hücrelerde veya tüm organizmalarda meydana gelebilecek bir hasarla sonuçlanabilir. Bu hasarın büyüklüğü ROS'ların oluşum hızı ile oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan ya da tamir eden koruyucu mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır (44,45,52).

Radikalik reaksiyonlar, zincir reaksiyonlar olup, genel olarak üç basamakta incelenirler. Başlama safhası, radikalın oluşumunu kapsar. Sonra ilerleme basamağı gelir. İlerleme basamağı, ara ürün olarak ortaya çıkan serbest radikaller üzerinden yürür. Bu sırada hücrel tahribatlar meydana gelir (Tablo 4.3).

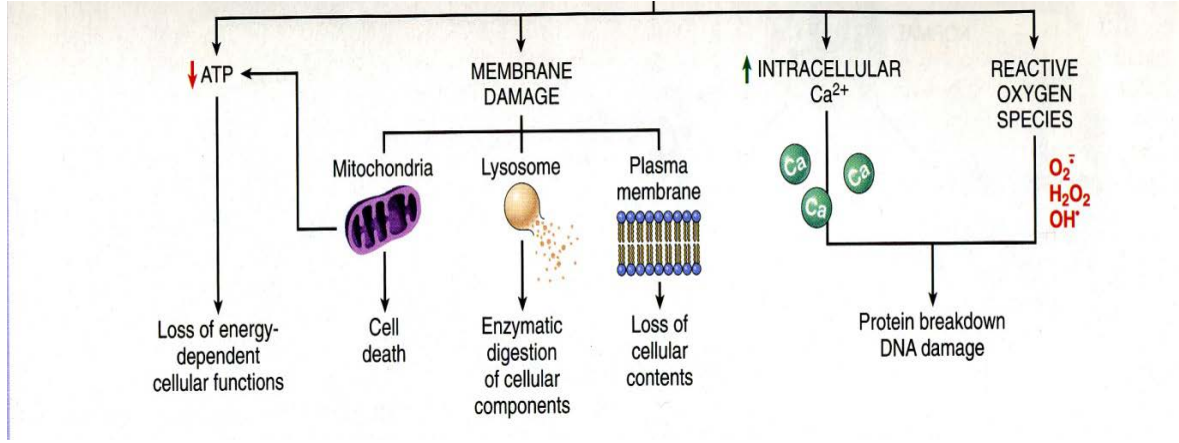
<b>Etkilenen Bileşik</b>	<b>Oluşan Hasar</b>
Doymamış ve kükürt içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu, enzim inhibisyonu, çapraz bağların oluşumu, organ ve hücre geçirgenliğinde ki değişimler
Nükleik asit bazları	Hücre döngüsünde ki değişimler ve mutasyon oluşumu
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Hyaluronik asit	Synovial sıvının viskozitesinde değişim
DNA	Bazı modifikasyonlar ve zincirde kırılmalar
Antioksidanlar	Denatürasyon ve peptid zincirinde kırılmalar
Kofaktörler	$\alpha$ -tokoferol ve $\beta$ -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Doymamış lipidler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktivitesinde azalma
Nörotransmitter	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitter miktarında ve aktivitesinde azalma

**Tablo 4.3.** Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller

İlerleme reaksiyonları, ya sonsuz devam eder ya da radikal yakalayıcı maddeler yardımı ile sonlanır. Radikal yakalayıcı maddeler, hücrenin sağlıklı gelişimi için gereklidirler. Eğer serbest radikaller, radikal yok ediciler tarafından yakalanamazlar ise; sitotoksosite ortaya çıkar (53).

Oksijen radikallerinin hücrede meydana getirebilecekleri hasarlar hücrenin pek çok bölümünü etkiler (54). Yaşlanmada, ateroskleroz ve diyabet oluşumunda, immün yanıtta, kanser radikallerin hedefi DNA ise; DNA zincir kırıkları ve baz değişiklikleri meydana gelebilmektedir (55). Hücre hasarının morfolojik değişiklikleri hücrede bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir (Şekil 4.3).



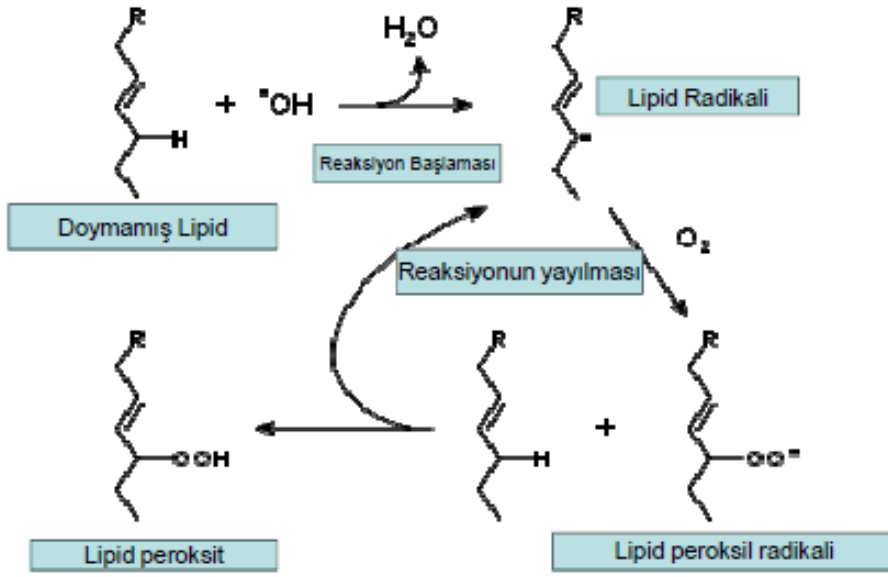


Şekil 4.3. Hücre hasarında önemli olan biyokimyasal yollar

#### 4.2.2. Serbest Radikallerin Membran Lipidleri Üzerine Etkileri

Artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Hücre zarı ekstrasellüler ortamda bulunan oksijen radikallerinin temel hedefi olduğu için büyük önem taşımaktadır.

Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörleri bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir. Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir (Şekil 4.4) (56).



**Şekil 4.4.** Lipid peroksidasyonunun oluşum mekanizması

Lipid peroksidasyonunun oluşumu, membran fonksiyonunun bozulmasına, membran akışkanlığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktivasyonuna, Ca<sup>+2</sup> gibi iyonlara karşı geçirgenliğin artmasına neden olur (57). Lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak MDA oluşur ve hücre membranından kolayca hücre içine diffüze olabilir ve hücre içindeki schift bazları ile birleşerek lipofuksin şeklinde sitoplazmada birikir.

#### 4.2.3. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı aminoasitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasitler ile triptofan, tirozin, fenilalenin, histidin gibi aromatik aminoasitler, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel membran fonksiyonları bozulmaktadır (58).

#### **4.2.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlar (CHO) Üzerine Etkileri**

Serbest radikallerin etkisiyle, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid yapısında ürünler meydana gelir. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Bu yüzden kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili oldukları düşünülmektedir (59).

#### **4.2.5. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri**

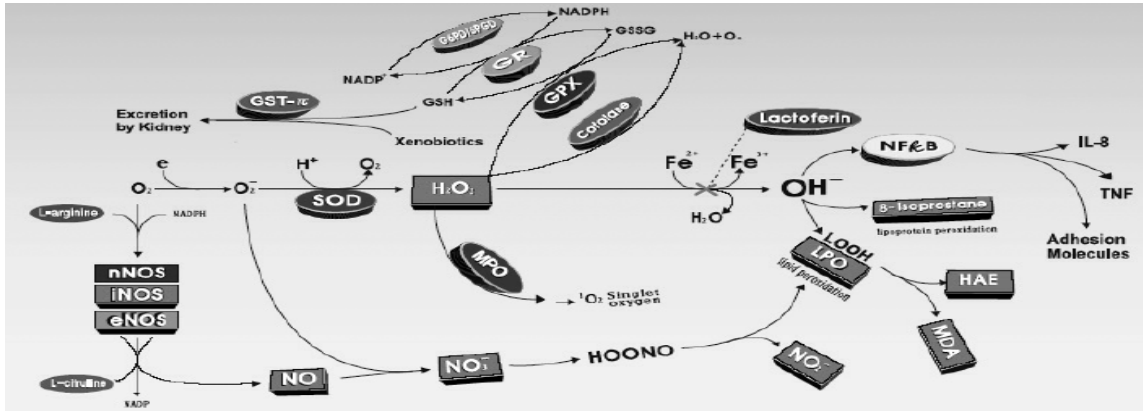
Oksijen radikallerinin bir diğer önemli hedefi de DNA'dır. Herhangi bir nedenle oluşmuş serbest radikaller ve özellikle MDA, DNA ile tepkimeye girerek mutajenik etkiye neden olurlar (43,44,60). DNA'nın temel yapıtaşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (61).

Oksidatif hasar, tümör oluşumunda rol oynar. DNA zedelenmesine, onarılmazsa mutasyonlara, tek veya çift zincir kırıklarına, kromozom kırıklarına ve kopan parçaların değişik yerlere yapışmalarına neden olur (62). DNA'da oksidan ajanlar ve serbest radikaller ile oluşturulan hasar, DNA'nın baz veya şeker yapısında olabilir. Aynı zamanda DNA-protein veya DNA-DNA arası çapraz bağlanmalar oluşabilir. DNA'nın şeker yapısındaki hasarlar deoksiriboz karbonlarının birinden H atomu çıkartılması ile başlar. Bu olayın en önemli sonucu ise iplik kırılmaları ve baz salınımıdır. Şeker yapısındaki hasarların büyük çoğunluğunda, 3' ve 5' fosfomonoesterleri oluşur.

DNA'ya en fazla zarar veren radikal OH'dır. OH hem baz dizilerinde hem de riboz-fosfat bağlarında kopmalara yol açarak DNA'da hasara neden olur. E.Coli üzerinde yapılan çalışmalarda radikaller sonucu DNA'da endonükleaz III 'e duyarlı yeni kesim bölgeleri oluştuğu ve bunun sonucu olarak da DNA'da özgün kırıklar meydana geldiği gösterilmiştir (63). O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DNA'da özgün kırıklara yol açmaları ve de onkogen aktivasyonuna neden oldukları için karsinogenezisde büyük önem taşırlar (64).

### 4.3. OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif stres denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (Şekil 4.5) (51).



Şekil 4.5. Oksidatif stres

Oksidatif stres birçok hastalığın gelişimine moleküler anlamda temel oluşturur. Metabolizmada üretilen serbest radikallerin fazlasının oluşmaması için çok erken safhalarda indirgenmesi biyomoleküllerin korunması bakımından hayati öneme sahiptir. Radikaller tepkimelerin sonlanması için ise ya oluşan radikallerin birbirleri ile tepkimeleri ya da ortamda tepkimeye girebilecek bileşik kalmaması gerekmektedir. Oksidatif stresin oluşturduğu hastalıklar arasında; ateroskleroz, diyabet, myokardiyal enfarktüs, hipertansiyon, yaşlanma, alzheimer, parkinson, huntington sendromu, otoimmün bozukluklar, akut ciğer hasarı, akut solunum zorluğu, inflamasyon, hipoksi ve kanser yer almaktadır (65).

Oksidatif strese tedavi olarak kullanılan birçok antioksidan vardır. Bunların bir kısmı vücudumuzda bulunurken ya da beslenme sırasında alınırken, bir kısmı sentetik olarak üretilir. Birçok antioksidan ters etki göstermeden serbest radikal hasarıyla savaşırlar.

#### 4.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Oksijen radikallerinin hücre ve dokularda yaratacakları zararlı etkilere karşı, hücrelerde kendilerini radikallere karşı korurlar. ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar ' antioksidan savunma mekanizmaları' olarak bilinirler.

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirken, serbest radikallerin yapısını bozarak etkilerini inaktive ederler (Şekil 4.6).



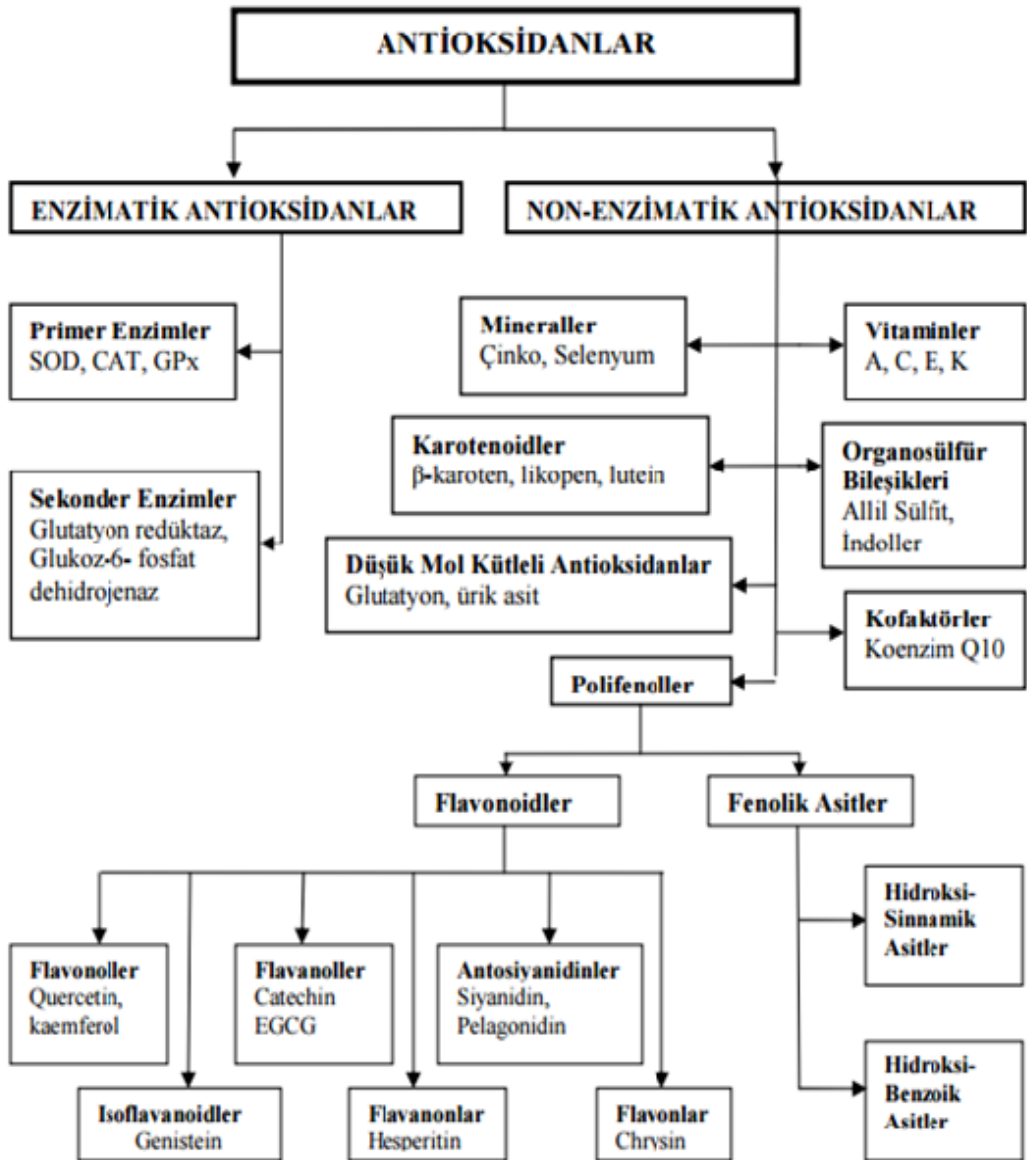
Şekil 4.6. Antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkilerini nötralize ederler

Hücre dışı savunma (preventif antioksidanlar), albümin, bilirubin, transferin, seruplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler (enzimatik antioksidanlar) asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dizmutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise, bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (66).

Antioksidanlar, oksidatif strese karşı etkilerini dört şekilde gösterirler. Örneğin;  $\alpha$ - tokoferol, lipid faz zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipid

peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları kırar. Glutasyon gibi antioksidan moleküller ise, direk olarak ROS konsantrasyonunu azaltırlar. SOD gibi antioksidan enzimler serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirirler. Bu maddeler ise geçiş metalleri ile şelat oluşturarak etkilerini gösterirler. Bu yolla laktoferritin, transferin ile ferritin demirle, seruplazmin ve albümin ise bakır ile uyarılan oksidan stresi engellerler (67).

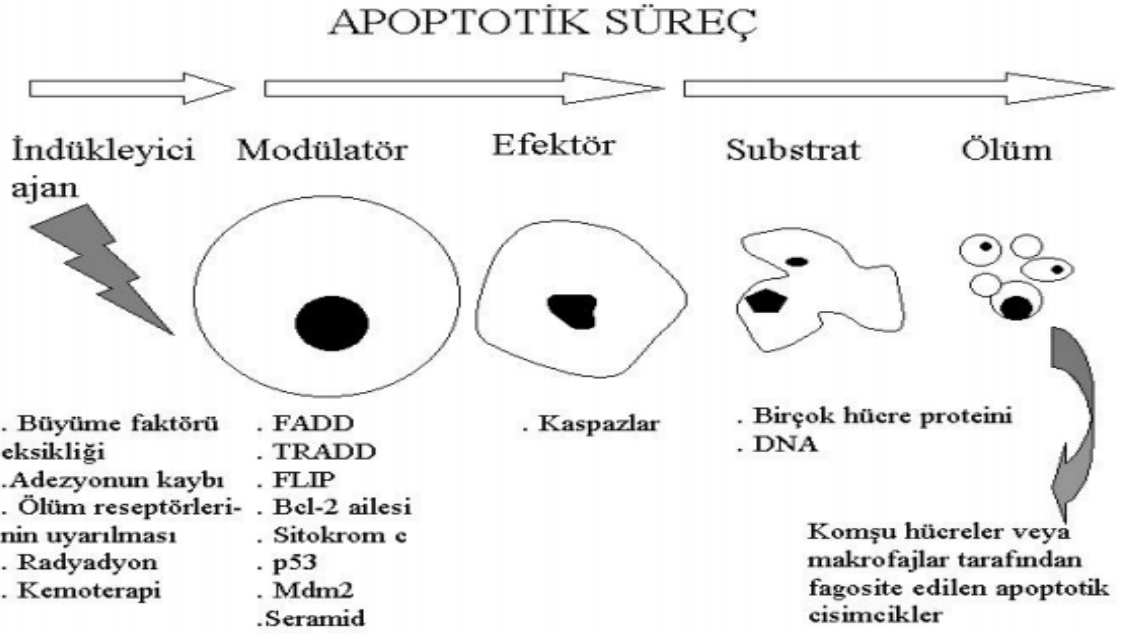
Bu sistemler enzimatik ve non-enzimatik diye iki kısma ayrılırlar (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar

## 4.5. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZİS)

Apoptozis terimi ilk olarak 1972’de J.F.K.Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen fizyolojik hücre ölümünü ifade eder (68). Birçok hücre bölünme ve bölünmeme ya da çoğalma ve ölüm arasında sürekli bir ardışık özellik göstermektedir. Özellikle çok hücreli organizmalarda, hücrelerin sayısı belli mekanizmaların kontrolü altındadır. Bu kontrol, hücre bölünme oranında olduğu gibi aynı zamanda hücre ölümünde de vardır. Eğer hücrelere daha fazla ihtiyaç yok ise, hücre içi ölüm programının aktivasyonu ile hücre intihara gider. Bu sürece programlanmış hücre ölümü (apoptozis) denir (Şekil 4.8) (69,70).



Şekil 4.8. Apoptozisin genel görünümü

Apoptozise neden olan sinyaller hücre dışından gelebildiği gibi, hücre içinden de kaynaklanabilir. Hücre dışı kaynaklı sinyaller, Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNF-R) ya da Fas reseptörü yolu ile iletilirler. Hücre içinden gelen sinyaller ise, hücrenin mitokondrisine gelen uyarılardır ve uyarılar sonucunda apoptotik mekanizma aktive olur. Günümüzde apoptozis sırasında hücre içinde oluşan değişikliklerinin çoğunun sitoplazmada yer alan kaspaz adlı proteazların aktivasyonu ile oluştuğu ortaya konmuştur.

Bir uyarı sonrasında birbirlerini proteolitik olarak aktive eden kaspazlar, aktivatör ve efektör etkili iki gruptan oluşmuş olup, hedef proteinlerini parçalayarak apoptozisle sonuçlandırılır (71). Hücrelerde apoptozise neden olan veya oluşumunu engelleyen pek çok madde bulunur (Tablo 4.4).

<b>Apoptozisi Aktive Eden</b>	<b>Apoptozisi İnhibe Eden</b>
Tümör Nekroz Faktör (TNF)	Büyüme Faktörleri
Büyüme Faktörü eksikliği	P35, IAP, crmA
Onkogenler (p53)	Sistein protez inhibitörleri
Serbest Radikaller	Tümör oluşturan ajanlar
Anti kanser ilaçlar	

**Tablo 4.4.** Hücrelerde apoptozise neden olan ve inhibe eden etkenler

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti değişir ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (72). Çekirdek DNA'sının parçalara ayrılması DNA'yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesinin arttığından önemli role sahiptir. Bu enzim aktivasyonu Ca/Mg oranının fazla oluşuna bağlı olabilir (73).

Apoptozise uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar. Hücre büzülme ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (70,74).

Apoptozis embriyonik gelişim esnasında, hücre çoğalma ve farklılaşmasında gerekli olmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasında, organ ve ekstremitelerin şekillenmesinde, içi boş olan organ ve sistemlerin oluşmasında rolü oldukça büyüktür.



Apoptozis, gelişimindeki etkilerinin yanında yaşlanmada, kalp-damar sisteminde yer alan aterosklerozun oluşumunda, iskemi sonrası perfüzyon hasarında, viral patogeneizde ve tümör gelişiminde etkin rolü olduğu bilinmektedir.

## **4.6. KANSER VE APOPTOZİS İLİŞKİSİ**

Ölüm nedenlerinin başında gelen ve yüksek ölüm insidansına sahip olan kanser pek çok hücre ve dokuyu etkileyebilen karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Neoplazi, herhangi bir sınırlama veya sonlanma göstermeyen, konak canlıların kontrol mekanizmaları dışında hareket eden, kontrolsüz hücre çoğalmasıyla ortaya çıkan anormal bir doku kitlesidir. Neoplaziler genel olarak tümör adını alırlar ve kanserleşen ve kanserleşmeyen olarak iki gruba ayrılırlar.

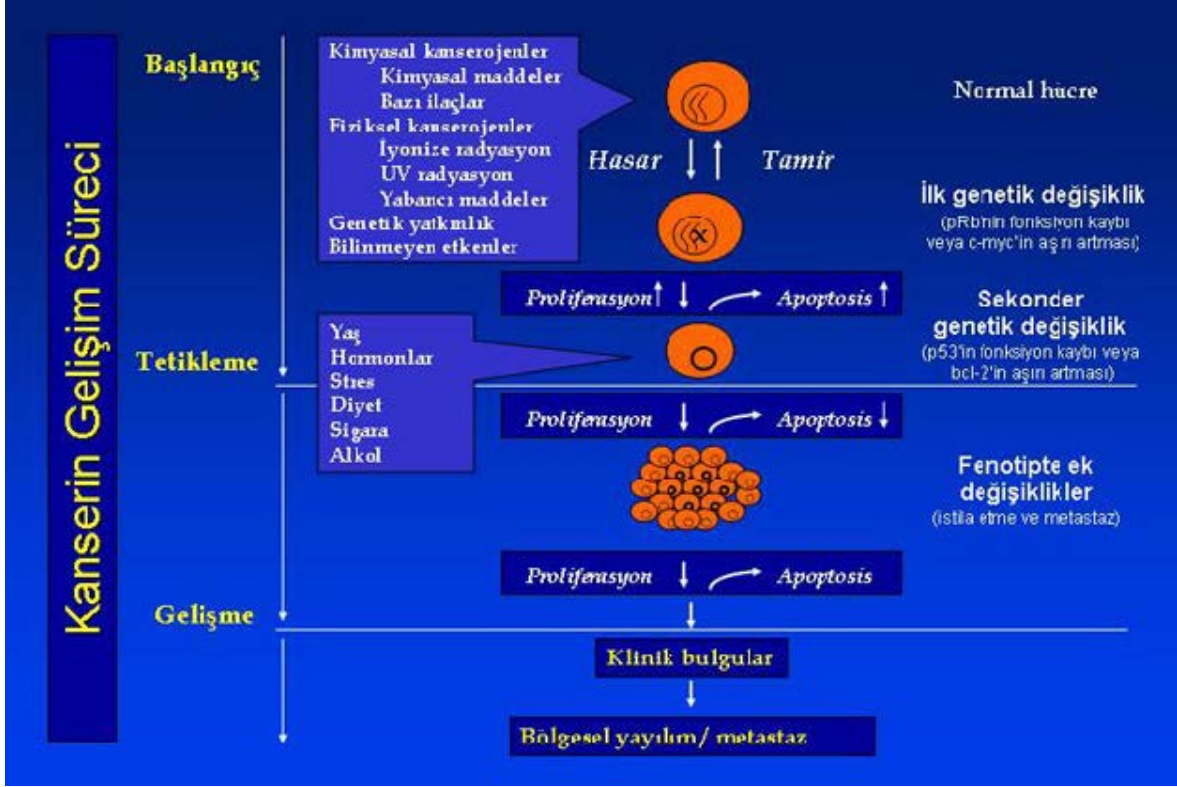
### **4.6.1. Kanser Oluşumu (Karsinogenezis)**

Kanser büyüme özellikleri kaybolmuş hücrelerin klonal yayılımıdır ve somatik genetik hastalıkların en sık ve komplike olanıdır. Bu nedenle, hücre düzeyinde düşünüldüğünde kanser genetik bir hastalıktır. Yapısal kromozom anomalileri, sayı anomalileri, nokta mutasyon gibi gen düzeyindeki değişiklikler ve gen amplifikasyonları şeklinde olabilir.

Kanser multifaktöriyel olup, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumunda rol almaktadır (75). Kansere sebep olan fiziksel etkenler içinde, radyasyon, ısı, güneş ışığı ve mekanik darbeler bulunmaktadır.

Kanser oluşumunda başlangıç aşamasında genotoksik bir etken DNA'da mutasyona neden olur. Bir kez hücre siklusu tamamlandıysa mutasyon geri dönüşümsüz hale geçer. Uyarılar tarafından poliferasyona neden olan bazı epigenetik değişimler meydana gelir. Bu değişimler üzerine hem poliferasyon artar hem de çok sayıda mutasyonun

gözlemlendiği değişimler meydana gelir. Bunun sonucunda kanser oluşumunda ve yayılımının da agresif süreç gözlemlenir (Şekil 4.9) (76).



Şekil 4.9. Kanser oluşum mekanizmaları

#### 4.6.2. Kanser Oluşumunda Rol Oynayan Genler

Kanser oluşumunda genetik olarak değişime uğrayan genler, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (77).

Proto-onkogen olarak da isimlendirilen bu genler tarafından kodlanan proteinler, hücre büyümesinde ve gelişmesinin kontrolünden sorumludurlar. Onkogenler, büyüme faktörleri ve reseptörlerini, sitoplazmik protein kinazları, apoptozis düzenleyici ürünleri, hücreler arası sinyal iletiminde görevli GTP bağlama proteinleri gibi işlevsel olarak önemli proteinleri kodlarlar ve çoğunlukla transkripsiyon faktörleri olarak görev yaparlar (Tablo 4.5).

<b>Proto-onkogen ürünlerinin işlevleri</b>	<b>Örnekler</b>
DNA kırılma kontrolü (nucleus)	Myc
Hormon/çoğalma faktör bağlanmasını bildirici protein	Src (membran bağlı tirozin kinaz)
GTP-bağlayan protein yüzeyden nükleusa sinyal iletiminde rol oynar	Ras
Çoğalma faktörleri	Sis (değişmiş PDGF- $\beta$ zinciri)
Çoğalma faktör reseptörleri	erb- $\beta$ , fms (M-CSF)

**Tablo 4.5.** Proto-onkogenlerin işlevleri

Büyümenin düzenlenmesini kontrol eden proteinler olan proto-onkogenler, onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır (78). Tümör baskılayıcı genler ise, hücre çoğalmasının kontrolünde görevli olan Bcl2, p53 ve Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi proteinleri kodlayan genlerdir. Kanserde onkogenler aktifleşirken, tümör baskılayıcı genler ise, inaktif hale geçerler.

#### **4.6.3. Karsinojen Ajanlar**

Kansere neden olan veya kanser oluşumunu teşvik eden maddelere ‘karsinojen ajanlar’ adı verilmektedir. Canlılar, büyük kısmı çevresel olan çok çeşitli karsinojenlerle yaşam boyu karşılaşabilir ve bu karsinojenler kanser oluşumundaki bu üç aşamayı da etkileyebilir. Karsinojen ajanlara duyarlılık, hücrenin genetik yapısı ile de doğrudan ilişkilidir (77,79).

Karsinojenlerle, DNA üzerindeki etkilerine göre genotoksik ve epigenetik olarak iki grupta incelenebilir. Genotoksik ajanlar, doğrudan DNA’yı etkileyerek hücrenin biyolojik olarak değişmesine neden olurlar. Epigenetik ajanlar ise, DNA dizisinde değişiklik yapmadan, etkilerini hücre bölünmesini uyararak gösterirler. Bu değişiklikler daha çok DNA metilasyonu, transkripsiyonunun aktivasyonu, translasyon kontrolü ve translasyon sonrası modifikasyonları değiştirerek gen ekspresyonunu etkilerler (79). Karsinojenlerin

başlıca hedefleri proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler, apoptozisi düzenleyici genler ve DNA tamir enzimleridir (Tablo 4.6).

<b>GEN</b>	<b>SONUÇ</b>
Protoonkogenler	KontROLSÜZ proliferasyon ve farklılaşma
Tümör baskılayıcı genler	Hücre siklusunda kontrol kaybı
Apoptozis düzenleyici genler	Apoptozis yeteneği kaybı
DNA tamir enzimleri	Mutasyon oranında artış

**Tablo 4.6.** Karsinojenlerin hücredeki hedefleri ve sonuçları

#### **4.7. Hep3B HÜCRE SOYU**

Karaciğer kanserleri çoğunlukla hepatosit adı verilen karaciğer hücrelerinden köken alırlar. Bu nedenle, karaciğer kanserlerinin %85-90'ına hepatosellüler kanser adı verilir (80).

İnsan hepatoma kanser hücre serisi olan Hep3B, ilk kez 8 yaşındaki siyahi erkek çocuktan elde edilmiştir. Bu hücreler yapışarak çoğalan epitelyal hücrelerdir ve homosapiens ailesindedir. Hep3B hattı entegre olmuş Hepatit B virüsü genomu içerdiği için biyogüvenilirliği 2. seviyededir. Aynı zamanda tümörjenik özelliklerinden dolayı farelerde tümör oluşturdıkları saptanmıştır. Özellikle Hepatit B virüsünün yaygın olduğu Güneydoğu, Asya ve Güney Afrika'da görülür (81).

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1 KULLANILAN CİHAZLAR VE KİMYASALLAR

#### 5.1.1 Kullanılan Cihazlar

CO <sub>2</sub> inkübatör	(SANYO)
Invert Mikroskop	(OLYMPUS)
Fluoresan mikroskop	(OLYMPUS)
Işık Mikroskobu	(OLYMPUS)
Su banyosu	(MERMERT)
Elektronik Hassas Tartı	(RADWAG)
Mikrosantrifüj	(HERAUS)
Vortex Mixer	(LABNET)
3D Blot Mixer	(CLEAVER SCIENTIFIC)
Trans-Blot Turbo (Membran Transfer Sistem)	(BIO RAD)
Chem analyzer- ELISA	(CHEMWELL)
pH metre	(METTER TOLEDO)
Kuru ısıtıcı ve blokları	(THERMOLYNE)
Poşet yapıştırma makinesi CNT 300	(CAS)
ECL görüntüleme cihazı	(Azure Biosystems C300)

Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGENE)

### 5.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Hanks' Balanced Salt Solution	(GIBCO)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	(GIBCO)
Dimetil sülfoksit	(GIBCO)
Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline (without Ca ve Mg)	(GIBCO)
Fetal Bovine Serum	(GIBCO)
DMSO	(GIBCO)
Thiazolyl Blue Tetra-zolium Bromide	(SIGMA)
Pen Strep	(GIBCO)
Trypsin-EDTA %0.25	(STEMCELL)
İnülin	(SIGMA)
Tween	(BIO-RAD)
Cynarin	(SIGMA)
BSA	(SIGMA)
Metanol	(MERCK)
β-Merkaptoetanol	(MERCK)
PBS tablet	(BIOMATIK)
Fluoroshield Mounting Medium with DAPI	(BIO-RAD)

### 5.1.3. Gereçler

Fast pette	(LABNET)
Microsantrifüj tüp	(COSTAR)
Santrifüj tüpü 15 mL	(CITOTEST)
Pipet 10µL-20µL-200µL-1000µl	(RAININ)
Pipet Uçları	(AXYGEN)
Serolojik pipet 5mL-10mL-25mL-50mL	(SANTA CRUZ)
Parafilm	(BEMIS)
15 mL kapaklı tüp	(FALCON)
75 cm <sup>2</sup> 'lik hücre kültürü plakları	(NEST)
25cm <sup>2</sup> 'lik hücre kültürü plakları	(ULTRACRUZ)
96 kuyucuklu hücre kültürü plakları	(CITOTEST)
Şırınga filtresi 0.22 µm	(TPP)
Distile su	

### 5.1.4. Antikorlar ve Kullanılan Kitler

#### 5.1.4.1. Antikorlar

##### Birincil Antikorlar:

IL-1β Rabbit	(ABCAM)
IL-6 Rabbit	(ABNOVA)
TNF- α Rabbit	(ABCAM)

Apaf-1 Rabbit (ABCAM)

SMAC-Diablo Mouse

(CELL SIGNALING TECHNOLOGY)

Sitokrom-c Rabbit

(CELL SIGNALING TECHNOLOGY)

Kaspaz-3 Rabbit

(CELL SIGNALING TECHNOLOGY)

#### İkincil Antikorlar:

Goat anti-rabbit HRP Conjugated

(BIO-RAD)

Goat anti-mouse HRP Conjugated

(BIO-RAD)

Goat anti-rabbit IgG H&L AlexaFluor 488

(ABCAM)

Goat anti-rabbit IgG H&L AlexaFluor 647

(ABCAM)

#### **5.1.4.2. Kitler**

Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer System RTA Transfer Kiti

(BIO-RAD)

WesternBright Sirius ICL Kiti

(ADVANSTA)

#### **5.1.5. Yazılım Programları**

Azure Spot analiz programı



## 5.2 Hep3B HÜCRE SOYU VE ÇOĞALTILMASI

### *Hep3B Hücre soyunun kültüründe kullanılan solüsyonlar:*

#### Kültür Medyumu:

90 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) (DMEM) (Gibco)

10 ml Fetal Calf Serum (FCS) (Gibco)

1 ml L-Glutamin

0,1 mM Pirüvik Asit

200 µl (0.2 ml) Penisilin-Streptomisin (Sigma)

#### Hücre Çözme Çözeltisi:

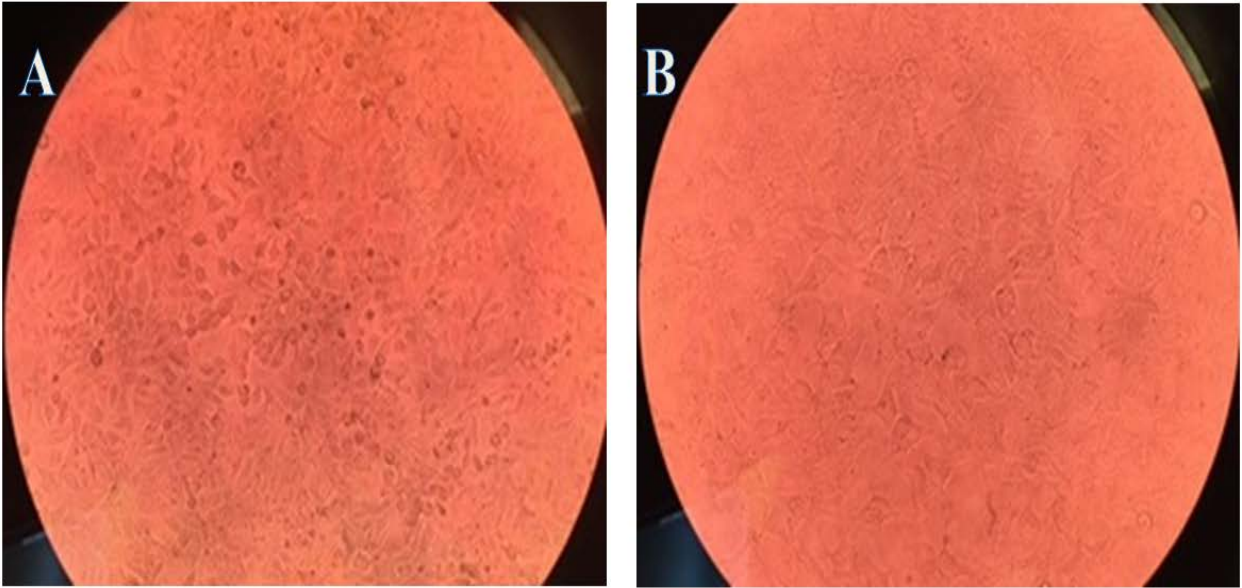
5 ml Hank's Balanced Salt Solution (Gibco)

2 ml Tripsin/EDTA (Gibco)

2 ml Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma)

Çözdürme işlemi için, sıvı nitrojenden (-196) çıkarılan insan karaciğer kanser hücre serisi (Hep3B) 37°C'deki su banyosunda 2 dakika tutuldu. Hücrelerin zarar görmemesi için 1cc FBS eklenerek 75cm<sup>2</sup>'lik flaska 2cc erimiş hücreler ekildi. Hücrelerin üzerine kültür medyumundan 10cc eklenerek 24 saat, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre bırakıldı. Flasklar ertesi gün invert (ters yönlü) mikroskopla incelendi ve hücre yoğunluğu %90-%95 olunca hücrelerden pasaj alınmasına karar verildi. İstenilen hücre yoğunluğuna ulaşılan kadar her gün eski medyum uzaklaştırılarak 15cc yeni medyum eklendi ve 37°C'deki CO<sub>2</sub> inkübatörüne bırakıldı.

Hücreler konfluent olduklarında CO<sub>2</sub> inkübatöründen alınarak flasklar dik konuma getirildi ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden besiyeri çekildi. 5 ml HBSS çözeltisiyle hücreler yıkanarak, 2 ml Tripsin/EDTA eklendi ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe 2 dakika bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrıldığında PBS eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 200g' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tüpün tabanında 1ml kalacak şekilde uzaklaştırıldı. 2x25cm<sup>2</sup>'lik flasklara pasajlandı. Her bir flaska 5 ml yeni medyum eklenerek CO<sub>2</sub> inkübatörüne kaldırıldı.



**Şekil 5.1.** Kültür ortamında Hep3B hücrelerinin invert mikroskop ile görüntülenmesi  
(A-20x büyütme B- 40x büyütme)

### 5.3 MTT HÜCRE CANLILIK TESTİ

Hücre canlılık testlerinden olan MTT yönteminde mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid ile reaksiyona girerek formazan bileşiklerini oluşturmaları esasına dayanır.

### ***MTT Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar:***

#### Medyum:

100ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) (DMEM) (Gibco)

#### Hücre Süspansiyon Solüsyonu:

Hank's Balanced Salt Solution (Gibco)

#### MTT Çözeltilisi:

3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) (Sigma) içeren HBSS çözeltisi

#### Çözücü Solüsyon:

1 :1 oranında DMSO: Etil Alkol

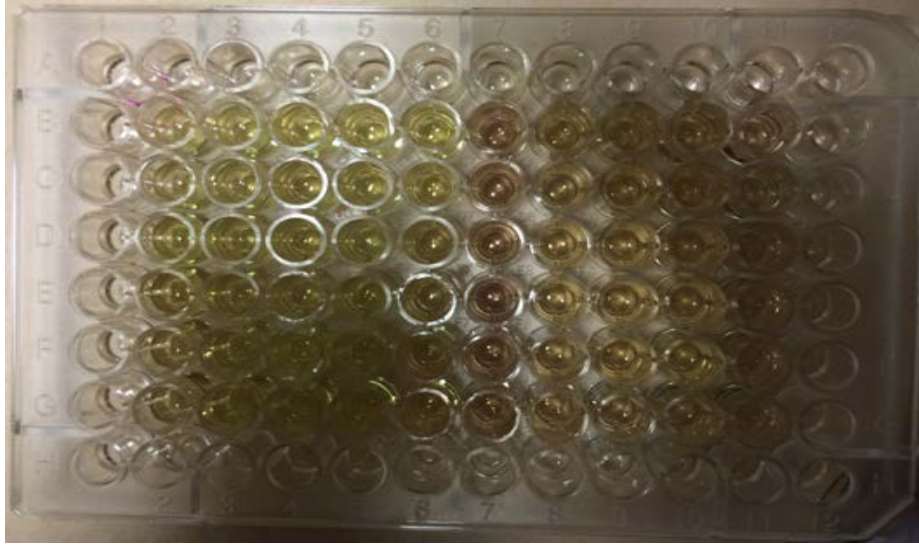
Bu yöntem aktivitesi devam eden canlı hücrelerin 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid ile inkübasyonları sonrası formazan kristalleri oluşturmalarına ve bu kristallerin 490 nm'de ve 600 nm'de verdikleri absorbanların ölçülmesine dayanır. Ölü hücreler formazan bileşikleri oluşturamadıkları için renk reaksiyonu ve buna bağlı olarak absorban alınamaz.

MTT testi 96 kuyuluk hücre kültürü kaplarında çalışıldı. Karıştırıcı ve ELİSA okuyucusu kullanıldı.

Test edilecek hücre süspansiyonlarından, 50 µl ve 100 µl olacak şekilde hücreler alındı ve 96 kuyuluk kültür kaplarına ekildi. Buharlaşmaya karşı sadece merkezdeki 60 kuyu ekim için kullanıldı. Dış kenardaki boş kuyular ise, sadece medyum ile dolduruldu. Kontrol hücrelerinden iki seri bir başa bir ortaya gelecek şekilde yerleştirildi. Bu sayede buharlaşma ve/veya sıcaklık farkına bağlı değişimlerin sonuçları etkilemesi önlenmiş olundu. Örnekler belirtilen şekilde kuyucuklara dağıtıldı ve deney gerçekleştirildi.

MTT testi için 96 kuyucuklu planelere ilk 30 kuyucuğa 50 µl+150 cc medyum, sonraki 30 kuyucuğa 100 µl+100 cc medyum hücre ekildi. Ertesi gün cynarin ve inülinde uygun konsantrasyonlarda hücrelere koyuldu. B2-G2 ve B7-G7 kontrol grubudur. 50µl

hücreler üzerine; Cynarin'den B3-D3  $10^{-4}$ , B4-D4  $10^{-5}$ , B5-D5  $10^{-6}$ , B6-D6  $10^{-7}$ , 100 $\mu$ l hücreler üzerine ise; B8-D8  $10^{-4}$ , B9-D9  $10^{-5}$ , B10-C10  $10^{-6}$ , B11-D11  $10^{-7}$ , 50 $\mu$ l hücrelerin üzerine; İnulin'den E2-G2  $10^{-4}$ , E3-G3  $10^{-5}$ , E4-G4, E5-G5  $10^{-6}$ , E6-G6, 100 $\mu$ l hücrelerin üzerine ise; E8-G8  $10^{-4}$ , E9-G9  $10^{-5}$ , E10-G10  $10^{-6}$ , E11-G11  $10^{-7}$  konsantrasyonlarında koyuldu.



#### **5.4. POLY AKRİLAMİDE JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)**

Yüklü moleküllerin bir elektrik alanı içinde yürütülerek ayrıştırılması tekniğine elektroforez denir. Elektroforezin çalışma ilkesi; molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken katettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır. Elektroforezde katedilen mesafe, net yük ile doğru; molekül büyüklüğü ve elektroforetik ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır. Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında likid bir ortamda yüklü solüt veya partiküllerin göçüdür (82).

SDS: Oligomerik proteinleri alt birimlerine ayıran bir deterjandır. Bu deterjan polipeptidlere bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu oluşan kompleks polipeptidlerin negatif yüklü kalmalarını sağlar.

PAGE: Elektriksel çekim kuvveti kullanılarak proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan ortama denir.

Protein elektroforezinde amacımız hücrede bulunan total protein büyüklüklerine göre sıralamak ve hedef proteinlerimizi total proteinlerin içinden ayırıp işaretlemektir. Bu amaçla önce farklı konsantrasyonlarda inülin ve cynarin ile muamele edilen hücre gruplarından 24 saatlik inkübasyon sonrasında total protein izolasyonu yapıldı. Daha sonra elde edilen proteinler SDS-Gel elektroforezi ile yürütülerek ayrıldı.

#### 5.4.1. Total Protein İzolasyonu

Hücrelerden total protein izolasyonu için RİPA tamponu kullanıldı.

50 Mm	Tris-HCl, pH 7.4	25 ml 1M
% 0.5	Na-deoxycholate	2.5 g
% 0.1	SDS	0.5 g
150 Mm	NaCl	15 ml 0.5M
2 Mm	EDTA	2 ml 0.5M
50 Mm	NaF	1.05 g
		Final 500 ml

**Tablo 5.1.** Ripa Buffer İçeriği

Protein izolasyonu için yapılacak işlemlerin tamamı +4°C'de gerçekleştirildi. Kullanılan çözeltiler soğutuldu. Kültür medyumunu uzaklaştırılarak hücreler iki kere yıkama solüsyonu olan HBSS ile yıkandı ve HBSS çekildi. 1 ml soğuk Ripa Buffer hücreler üzerine eklendi. Kazıyıcı yardımıyla hücreler kazınarak Ripa Buffer da çözüldü. Daha sonra tüpe alınan örneklerin üzerine proteaz inhibitörü eklendi. Her 10 dakikada bir

vortekslandı. 15 dakika +4°C'de 14,000g' de santrifüj edildi. Total proteini içeren supernatan yeni tüplere aligotlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

Protein miktar tayini fluorometrik olarak Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogene) cihazı ile ölçüldü. Elektroforez sırasında yüklenecek örnek hacimleri total protein miktarına göre ayarlandı.

#### **5.4.2. Protein Elektroforezi**

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre sıralanması ve Western Blotlama ile işaretlenebilmesi amacıyla SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır (83). Projemizde protein elektroforezi için kullanıma hazır olarak dizayn edilen Bio-Rad marka Mini-PROTEAN® TGX™ Precast jelleri kullanıldı. SDS-PAGE jellerinde proteinlerin seperasyonu sırasında yürütme (running) tamponu olarak TGS yürütme tamponu kullanıldı.

##### TGS Yürütme Tamponu (pH: 8,3)

Trisma base (25 mM) 3 gr

Glisin (192 mM) 14,4 gr

SDS (% 10 w/v) 1 gr

Önce bir miktar distile suda tüm maddeler çözüldü ve pH: 8,3' e ayarlanıp son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Protein Örneklerinin Hazırlanması: Aligotlanmış protein örneklerinden birer tüp alınarak 1:1 oranında Protein Yükleme Tamponu (2x Laemmli Sample Buffer #161-0737, BioRad) ile karıştırılıp 95°C'de 5dk su banyosunda (Thermolyne) kaynatıldı. Protein Yükleme Tamponuna kullanmadan önce %5 v/v oranında (950 ml protein yükleme tamponu için 50µl olacak şekilde) β-Merkaptoetanol (Merck) eklenmiştir. Merkaptoetanol, proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesini sağlarken yükleme tamponu da proteinleri denatüre hale getirir böylece merkaptoetanol ve kaynatma işlemleriyle birlikte proteinlerin denatüre olarak, jel üzerinde düzgün bir şekilde yürüyebilmesi sağlanır.

PAGE uygulamasında dengeleme ve ayırma jeli olmak üzere, yoğunlukları farklı iki ayırma ortamının birlikte kullanılması söz konusudur. PAGE sisteminde ayırıcı jelin konsantrasyonu analiz edilecek örneğin yaklaşık moleküler ağırlığına göre farklılık gösterirken, dengeleme jelinin konsantrasyonu sabittir.

Hazır olarak alınan jel karışımlarından ayırıcı jel örneğin asıl analiz edildiği yapı olup, çalışmamızda % 10-12 konsantrasyonuna sahip jeller kullanılmıştır. Kullanılan jel sisteminde de dengeleme jeli, ayırıcı jelin üstünde yer almakta ve örneklerin yüklenmesi için tarak gözlerinin oluşturulduğu bölümde bulunmaktadır.

Jelde bulunan tarak, oluşan örnek yükleme gözlerini yırtmadan çıkarıldı ve örnek yükleme tamponu ile karıştırılmış protein örneklerinden 45 µL (0.1µg/ml olacak şekilde) kuyucuklara yüklendi. Elektroforez işlemi sonunda moleküler ağırlıkları doğru saptamak için kuyucuklardan birine moleküler ağırlığı bilinen protein standart'ı (marker) olan Precision Plus Protein Marker, HRP Conjugated (BioRad) koyuldu. Örnek yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez uygulaması başlatıldı. Örnekte bulunan izleme boyası ayırma jeli içine girinceye kadar yaklaşık 30 mA, 120 V daha sonra 20 mA, 80V akım uygulandı. İzleme boyası jelin diğer ucuna 2 cm uzaklığa ulaştığı zaman elektroforez işlemi sonlandırılır (82,83).

## **5.5. WESTERN İŞARETLEME**

Western Blot (işaretleme); dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik sayesinde dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması için kullanılan bir yöntemdir.

PAGE ile jelde büyüklüklerine göre sıralanan proteinler işaretleme yapılacak membrana aktarılmak üzere hazırlandı. Bu işlem için öncelikle hazır jellerin üç kenarından belirtilen yerlerden kırılarak iki levha arasındaki jel açığa çıkarıldı. Zarar vermeden ortaya çıkarılan jelin üst kenarındaki kuyucuklar ve eğer alt kenarında kalıp dışına taşan çıkıntılar

varsa, düzgün bir şekilde bistüri ile kesildikten sonra, jel parçalanmamasına özen gösterilerek çıkartıldı.

### **5.5.1 Proteinlerin Jel'den Membrana Transferi**

Çalışmamızda Trans-Blot® Turbo™ Transfer System RTA Transfer Kit'i kullanıldı. Membran olarak PVDF (Poli-viniliden florür) membran kullanıldı. Membrana, protein kontaminasyonunu engellemek için dokunulmadan, iki filtre kağıdının arasından pens yardımıyla yırtılmamasına özen gösterilerek hafifçe alınarak 30sn. Metanol' de (metanol ve distile su) sallanıp rehidrasyon sağlandıktan sonra, Transfer tamponu (BioRad Transfer Buffer, 5x) bulunan kaba alındı. Aynı kap içine jel de alınarak çalkalayıcıda 60rpm devirde 2-3 dakika sallanarak dengeleme yapıldı. Transfer filtreleri (kurutma kâğıtları) de aynı şekilde transfer tamponu ile ıslatıldı. Transfer için yarı-ıslak yöntem (TransBlotTurbo, Biorad) kullanıldı.

Transfer kasetine öncelikle ıslatılmış filtreler yerleştirildi. Üstüne ıslatılıp dengelenmiş membran dikkatlice koyuldu. Membranın üzerine dikkatli bir şekilde jel yerleştirildikten sonra en üste tekrar filtreler yerleştirildi. Hazırlanan jel-membran sandviçinin kaymamasına dikkat edilerek aradaki hava kabarcıkları giderildi. Kaset kapağı sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra kaset yuvaya yerleştirildi. Transfer edilecek proteinler farklı moleküler ağırlıklara sahip oldukları için Mixed MW programı seçilerek 2.5 A sabit akımda 25V 7dk. transfer gerçekleştirildi.

Transfer sonrasında membran dikkatli bir şekilde alınarak blotlama (İşaretleme) işlemine geçildi.

### **5.5.2 Proteinlerin Membran Üzerinde İşaretlenmesi (Blotting)**

Membran üzerindeki proteinlerin antikorlar ile işaretlenmesinden önce bloklama işlemi yapıldı. Bloklama, membranla antikorlar arasındaki Nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulandı. Bloklama işlemi membran bir saat boyunca %5 BSA'lı TBS-T içine koyularak oda sıcaklığında 1saat 3D Blot Mixer'de karıştırıldı.



Sulandırılan protein çözeltisi olan TBS-T içinde çözünen %5 BSA (Bovin Serum Albumin) proteinleri membran üzerinde, hedef proteinden yoksun olan tüm bölgeyi kaplayarak kullanacağımız primer antikorların sadece hedef proteinlere bağlanmaları sağlanmış oldu. Bu sayede zemin kirliliğinden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar da önlenmiş oldu.

Blotting işleminin tamamında yıkama tamponu olarak TBS-T kullanıldı.

Tris Buffered Salline (TBS): (10x)

24.23 gr Tris-HCL

80.06 gr NaCl

800 ml Distile su

pH:7.6 olacak şekilde ayarlandı. Çalışmada kullanılmak üzere dH<sub>2</sub>O ile 1x'e sulandırıldı.

Yıkama Solüsyonu (TBS-T):

500µl Tween 20 (BIO-RAD)

500ml 1x Tris Buffered Salline (TBS) (BIO-RAD)

%5' BSA'lık TBS-T Hazırlama:

2.5 gr BSA

50ml 1x TBS-T

Bir saat sonunda membran 3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.

Membran yıkama sonrası birincil (Primer) antikor ile muamele edilmek üzere poşete alındı. Bu sayede daha az hacimde inkübasyonlar sağlanarak antikor israfı önlenmiş oldu. Poşetler daha sonra kapatıcı ile kapatıldı.



#### Primer Antikor Hazırlama:

Çalışmamızda hedef proteinlerimiz apoptotik proteinlerden Apaf-I (Rb), Sitokrom-c (Rb), SMAC-Diablo (Mouse), Caspaz-3 (Rb) ve inflamatuvar belirteçlerden IL-1 $\beta$  (Rb), IL-6 (Rb), TNF- $\alpha$  (Rb) olarak belirlendi. Referans protein olarak  $\beta$ -Aktin (Rb) seçildi. Bu proteinler için üretilmiş antikorlar kullanıldı ve antikor sulandırma oranları üretici firmalar tarafından belirtilen şekilde 1:1000 olarak ayarlandı.  $\beta$ -Aktin antikoruna ise 1:5000 oranında sulandırılarak kullanıldı. Antikorlar %5 BSA'lı TBS-T içinde hazırlandı.

Yıkanan membranlara primer antikorlar koyularak bir gece boyunca +4°C'de 3D Blot Mixer'de karıştırıldı. Ertesi gün primer antikorlar alındı ve yıkama kabında membranlar 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikorlar koyuldu.

### İkincil (Sekonder) Antikor Hazırlama:

Sekonder antikorlar kullanılan primer antikorlara göre Goat anti-rabbit HRP Conjugated (Bio-Rad) ve Goat anti-mouse HRP Conjugated (Bio-Rad) olarak seçildi ve 1:10,000 olacak şekilde 10ml %5 BSA'lı TBS-T içinde hazırlandı. Burada önemli olan, birincil antikor ve ikincil antikorun aynı hayvana karşı antikor barındırmasıdır. Yani birincil antikor hangi hayvanın antijenine karşı yapıldıysa ikincil antikorda da yine o hayvana ait olmalıdır. Biz de ikincil antikorlarımızı buna dikkat ederek seçtik ve uyguladık.

Oda ısısında 1 saat karıştırılarak inkübe edilen membran daha sonra tekrar 3x5 dk. TBS-T ile yıkandı.

### **5.5.3. İşaretlenen Proteinlerin Görüntülenmesi:**

Görüntüleme için ECL kiti kullanılarak kemüminesans ölçüm yapıldı. Membran üstündeki ikincil antikor dökülerek 3x5 dk olacak şekilde yıkama yapıldı. Ardından distile suyla 2x2 dakika sallanarak yıkanıp görüntüleme işlemine hazırlandı.

Membran görüntüleme cihazının siyah tablası üzerine kurumamasına dikkat ederek yerleştirildi. ECL kiti olarak WesternBright Sirius Femtgram HRP Substrat (Advansta) kullanıldı. 100µl Western Bright Sinius (Advansta) ve 100µl Western Bright Peroxide (Advansta) substratları 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan solüsyon membranların üzerine koyuldu. Membran yüzeyine dokunmamaya dikkat ederek, steril bir pipetle, tüm yüzeye uygulandıktan sonra reaksiyon için 5 dk. beklendi. Daha sonra Azure Biosystems C-300 Görüntüleme Sisteminde membranlardan alınan sinyaller görüntülendi.

Elde edilen görüntüler daha sonra AzureSpot analiz programında analiz edilerek değerlendirildi. Elde edilen veriler referans proteine ait bant değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılarak. İnülin ve cynarin etken maddelerinin hücrelerdeki hedef proteinler üzerine etkileri yorumlandı.

## 5.6. İMMÜNSİTOKİMYA/İMMÜNFLUORESAN (IF) BOYAMA

İmmünsitokimya, antijen-antikor etkileşimlerinden yararlanarak hücrelerdeki proteinlerin işaretlenmesini ve gözlemlenmesini sağlayan yarı-kantitatif bir yöntemdir. İlgilendiğimiz proteine karşı oluşturulmuş bir antikorun, ilgili proteini hücre içinde işaretlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu teknik sayesinde özgül antikorlar kullanılarak hücrelere ait çoğalma, ölüm (apoptoz/otofaji) veya inflamasyon ile ilgili hücresel cevaplar karakterize edilebilmektedir. Temel prensip western işaretlemeyle benzer şekilde hücrelerin fikse edilmesi, hedef proteini tanıyan özgül antikor ile işaretlenmesi daha sonra ikincil antikor ile fluoresan veya ışık mikroskopunda proteinlerin görünür hale getirilmesidir.

İmmünfluoresan (IF) çeşitli fluoresan moleküllerin ikincil antikora bağlanması yoluyla sinyal olarak kullanılan, yüksek duyarlılıkta sonuç veren bir yöntemdir. Biz de çalışmamızda seçilmiş hedef proteinlerimizi IF ile hücre içi lokalizasyonlarını görüntülemek amacıyla kullandık.

Bu işlemde öncelikle hücreler 24 well steril kültür kaplarına yerleştirilen steril yuvarlak lameller (coverslip) üzerinde büyütüldü. Hücreler yapışıp uygun sayıya ulaştıktan sonra etken maddeler ile belirlenen konsantrasyon ve sürede inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücre kültürü besiyeri uzaklaştırılarak PBS (Phosphate Buffer Saline) ile hücreler yıkandı. Daha sonra kültür kabındaki lamellerin üzerine 300 µl soğuk metanol koyularak 10 dk. inkübe edilerek hücrelerin fiksasyonu sağlandı.

### PBS Hazırlanışı:

PBS tabletten bir adet (BIOMATİK) 1 litre suya atılarak hazırlandı.

Fiksasyon işleminden sonra metanol çekilerek lamellerin bulunduğu kuyucuklara PBS eklendi. Yıkama işlemi sonrası PBS çekildi. Hücre membranlarının geçirgenliğinin artırılması amacıyla fiksasyonu takiben hücreler % 0,2 (v/v) Triton X-100 içeren PBS ile oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi. Hücreler daha sonra PBS-T ile 3x5 dk. yıkandı.

### PBS-T Hazırlanışı:

PBS içinde %0,2 (v/v) oranında Tween-20 eklenip kuvvetlice karıştırılır.

Yıkama sonrası lamellerin üzerini kaplayacak şekilde, 150 µl birincil antikor kuyucuklara eklendi.

### Birincil (Primer) Antikorum Hazırlanışı:

Birincil antikor IF için uygun oranda üretici firmanın belirttiği şekilde 1:500 oranında sulandırılarak kullanıldı. %1 BSA içeren PBS içinde birincil antikor sulandırılarak hücrelerin üzerine koyuldu.

Kültür kabı içinde lameller gece boyunca + 4°C 'de inkübe edildikten sonra birincil antikorlar uzaklaştırılarak PBS-T ile yıkandı. PBS-T çekildikten sonra ikincil antikorlar ile muamele edildi.

### İkincil (Sekonder) Antikorum Hazırlanışı:

Çalışmamızda floresan işaretli ikincil antikorlar olarak Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077) ve Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (ab150079) kullanıldı.

Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon sonunda yıkama yapmadan lameller lamlar üzerine damlatılan ve çekirdek boyamasını yapacak DAPI içeren kapatıcı medyum Fluoroshield Mounting Medium With DAPI (20ml) (ab104139) üzerine alınarak mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi.

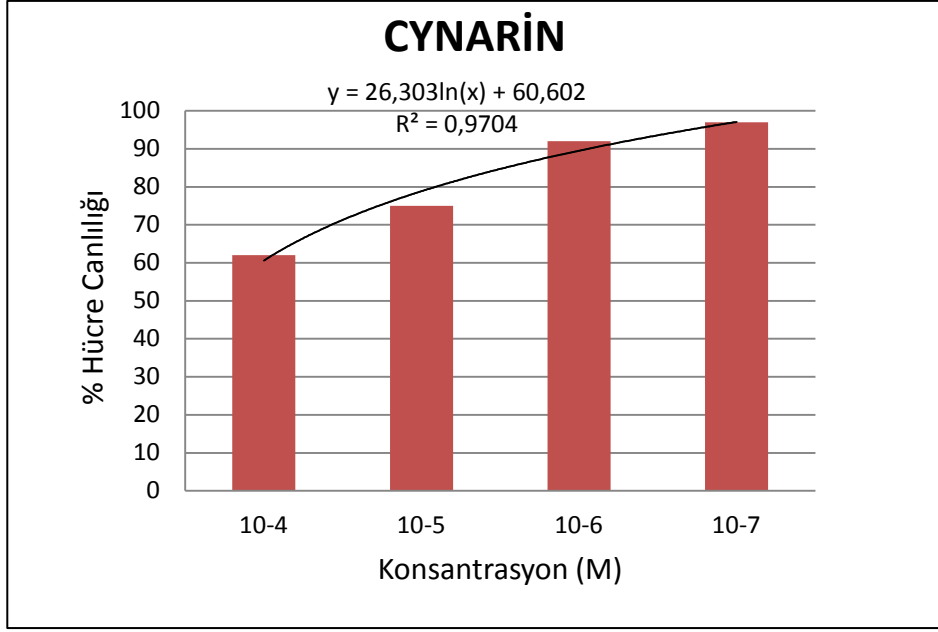
Mikroskop incelemesi Gebze Teknoloji Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü'nde bulunan Floresan Mikroskobunda gerçekleştirildi. Görüntüler iki ayrı filtrede incelenip alındıktan sonra iki görüntünün üst üste bindirilmesi ile incelemeye alındı. Kontrol ve uygulama gruplarına ait veriler birbirleri ile istatistiksel olarak kıyaslandı ve anlamlılık değeri hesaplanarak yorumlandı.

## 6. BULGULAR

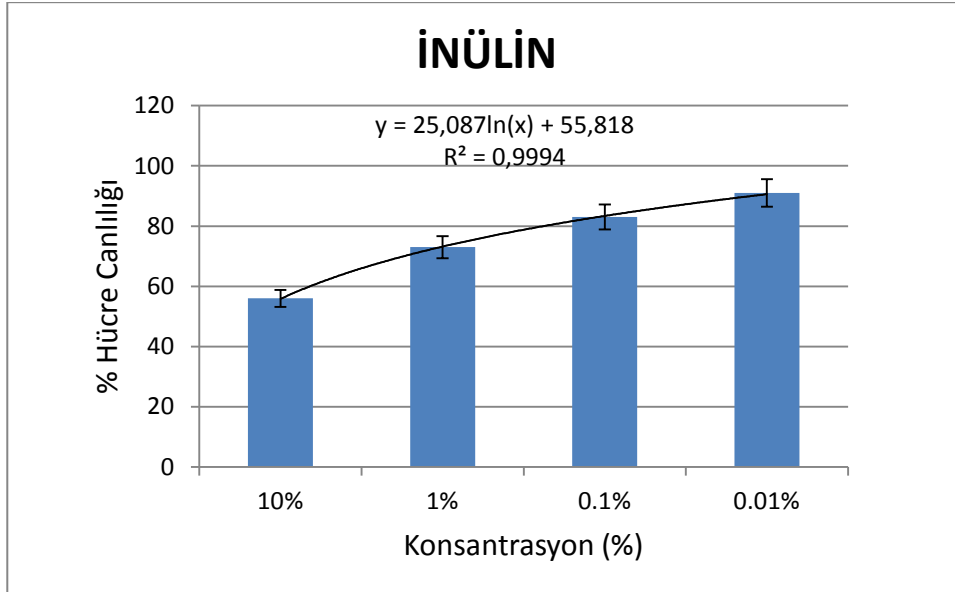
### 6.1. HÜCRE CANLILIĞI/SİTOTOKSİSİTE SONUÇLARI

Çalışmada kullanılan, enginar bitkisinde bulunan Cynarin ve İnülin etken maddelerinin in vitro sitotoksik etkileri MTT hücre canlılık testi ile gösterildi. MTT hücre canlılık testi için hücreler 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi ve her bir etken madde için farklı konsantrasyonları içeren gruplar oluşturuldu. Buna göre Cynarin  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  M konsantrasyonda olacak şekilde stoktan sulandırıldı. Hücre kültür medyumunu içinde sulandırılarak inkübasyon için hazırlandı. İnülin de %10, %1, %0,1 ve %0,01 (v/v) olacak şekilde hücre kültür medyumunu ile sulandırılarak hazırlandı. Her bir konsantrasyon için 3 kuyucuk kullanılarak deneyin güvenilirliği artırıldı. 24 saatlik inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 10 µl MTT ajanı konarak mavi-mor formazan kristalleri oluşumunu takiben DMSO/Etil Alkol çözeltisinde çözülerek 450-640 nm de absorbanları ölçüldü.

Deneylerde kullanılan Hep3B hücresinin ve ilgili etken maddeler ile elde edilen doz-hücre ölümü grafikleri Şekil 6.1 ve 6.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 6.1.** Cynarin'in Hep3B hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde farklı dozlardaki sitotoksik etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile gösterilmesi.

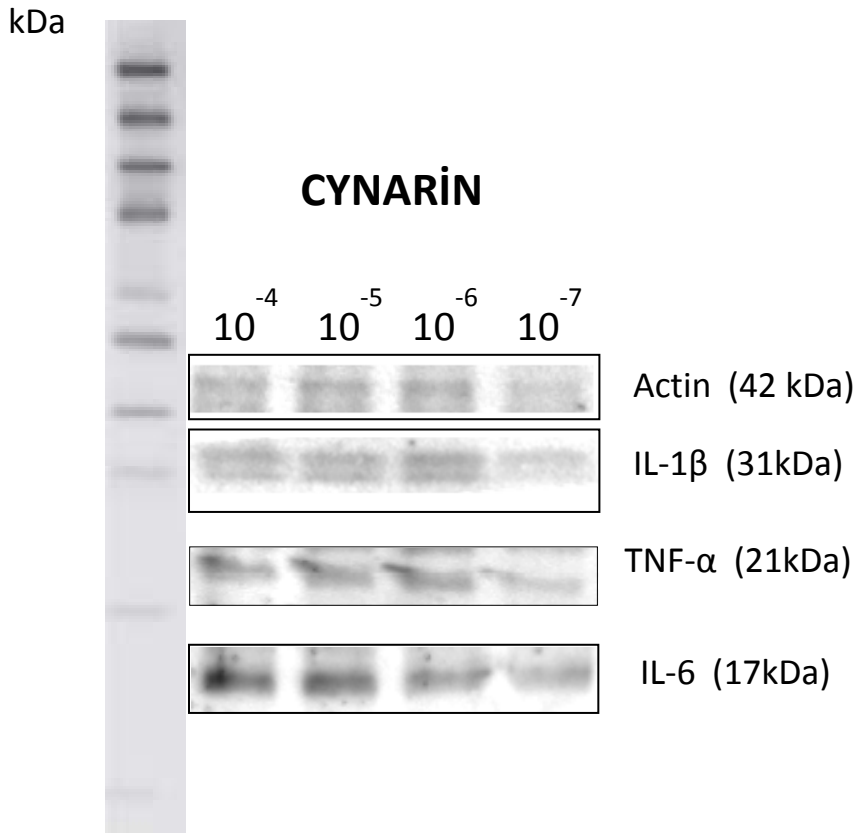


**Şekil 6.2.** İnülin'in Hep3B hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde farklı dozlardaki sitotoksik etkilerinin MTT hücre canlılık testi ile gösterilmesi.

MTT deneyi ile yapılan hücre canlılık testlerine göre her iki etken madde de düşük dozlarda hücre canlılığı üzerine etkisiz olarak bulunmuş ancak kullanılan doz miktarları arttırıldığında Hep3B hücreleri üzerine sitotoksik etki göstererek, hücre canlılığı düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ( $p<0,05$ ).

## 6.2. WESTERN İŞARETLEME SONUÇLARI

Çalışmamızda Cynarin ve İnülin etken maddelerinin hücresel olası etkilerini incelemek amacıyla apoptotik ve inflamatuvar belirteçlerin protein cevaplarına bakmayı amaçladık. Öncelikle inflamatuvar cevaplar üzerine etkilerine bakmak üzere belirlenen dozlarda inülin ve Cynarin ile 24 saatlik inkübasyon sonrası protein düzeyleri western işaretleme ile gösterilmiştir (Şekil 6.3 ve 6.4).

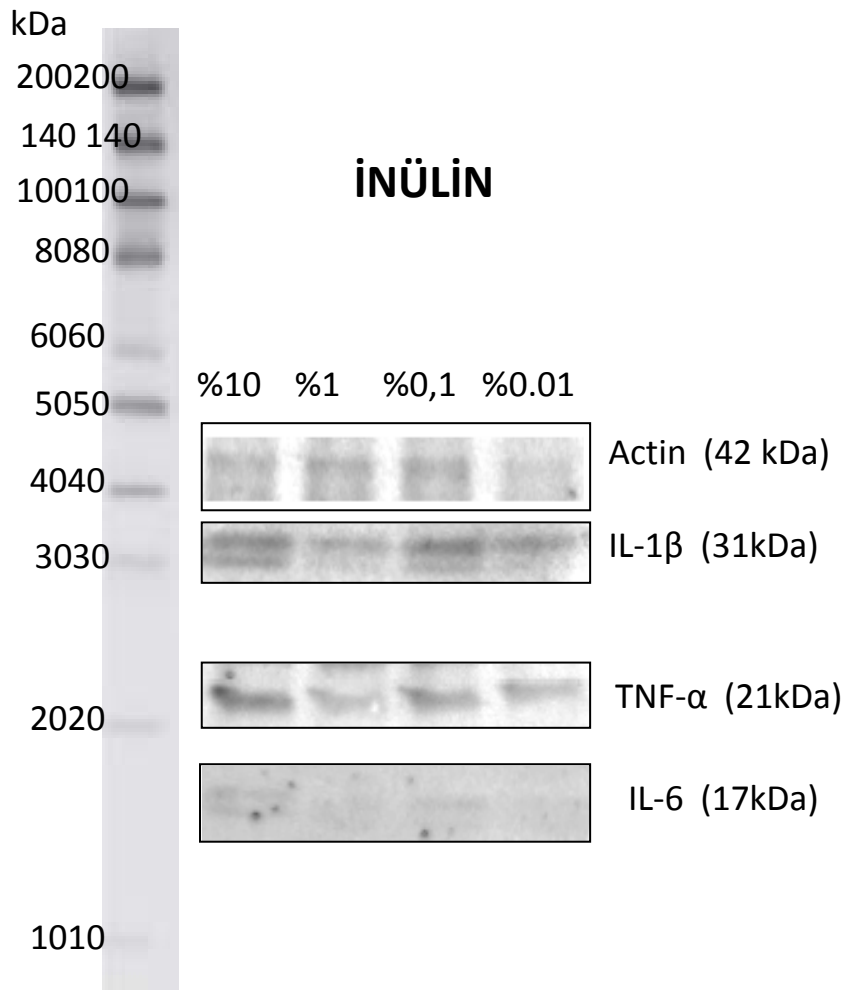


Şekil 6.3. Farklı dozlarda Cynarin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde inflamatuvar



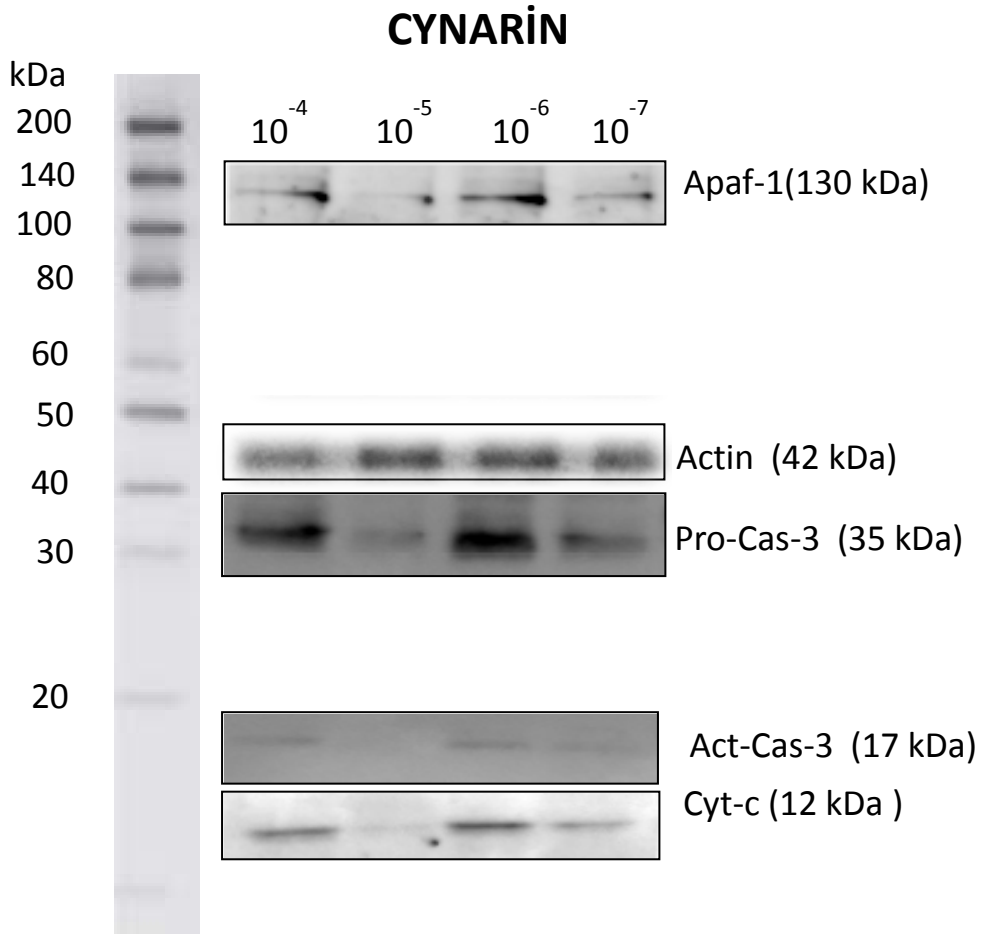
belirteçlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  ya ait western işaretleme görüntüleri. Sonuçlar Azure Spot analiz programında Aktine göre normalize edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda İnülin etkisine de bakılmış ve Hep3B hücreleri farklı dozlarda İnülin ile 24 saat inkübe edilmiştir. İnülin'in hücrelerdeki inflamatuvar etkilerine baktığımızda Cynarin'e benzer şekilde yüksek dozlarda inflamasyonu arttırırken düşük dozlarda etkisi bulunmamıştır (Şekil 6.4). Western işaretleme sonuçları Azurespot analiz programında aktin'e ait bantlara göre normalize edilerek değerlendirilmiştir.



**Şekil 6.4.** Farklı dozlarda İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde inflamatuvar belirteçlerden IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  ya ait western işaretleme görüntüleri. Sonuçlar Azure Spot analiz programında Aktine göre normalize edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

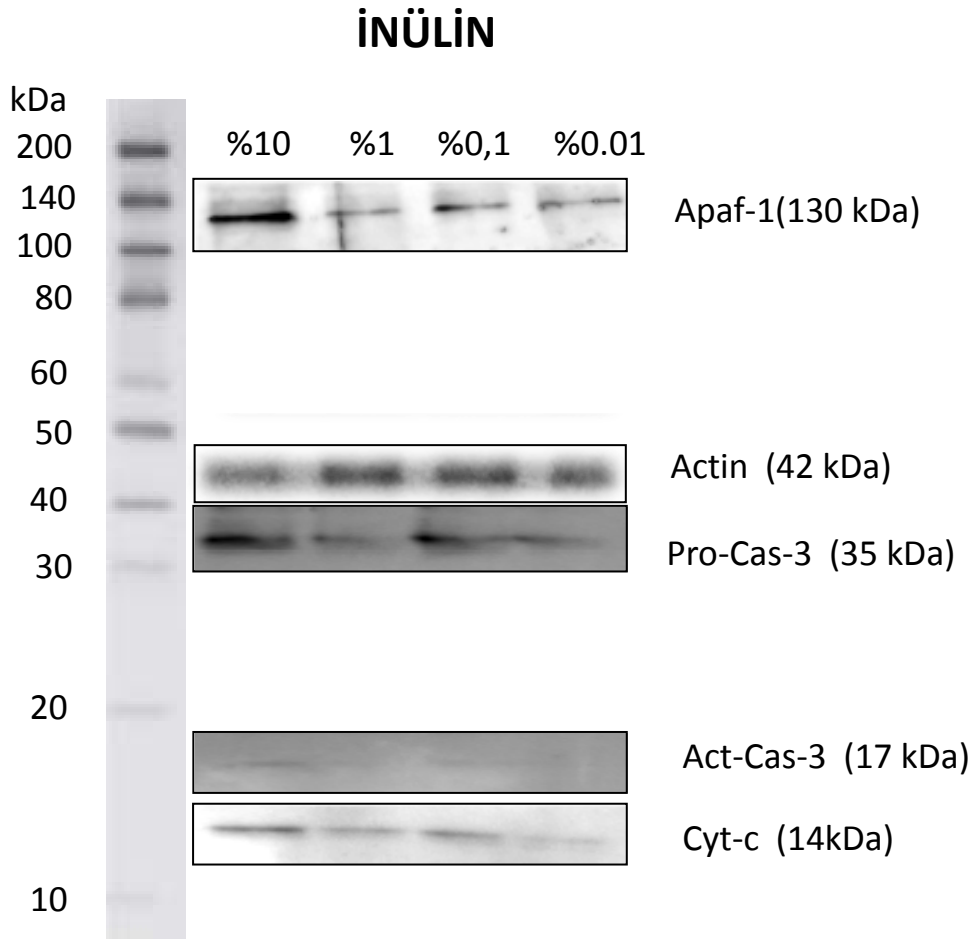
Çalışmamızda Western işaretleme ile aynı zamanda hücredeki apoptotik belirteçlerin düzeylerine de bakılmıştır. Kullanılan etken maddelerin Hep3B hücrelerindeki apoptotik ölüme etkili olup olmadıklarının araştırılması hipotezimizin bir diğer ayağıydı. Bu amaçla yapılan protein elektroforezi ve western işaretleme sonrası Cynarin ve İnülin'in yüksek dozlarında apoptozisi uyarıcı bir etkiden söz ederken düşük dozlarda apoptozis üzerine herhangi bir etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 6.5.** Farklı dozlarda Cynarin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Apaf-1, Caspaz-3 ve Sitokrom-c'ye ait western işaretleme görüntüleri. Sonuçlar Azure Spot analiz programında Aktine göre normalize edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

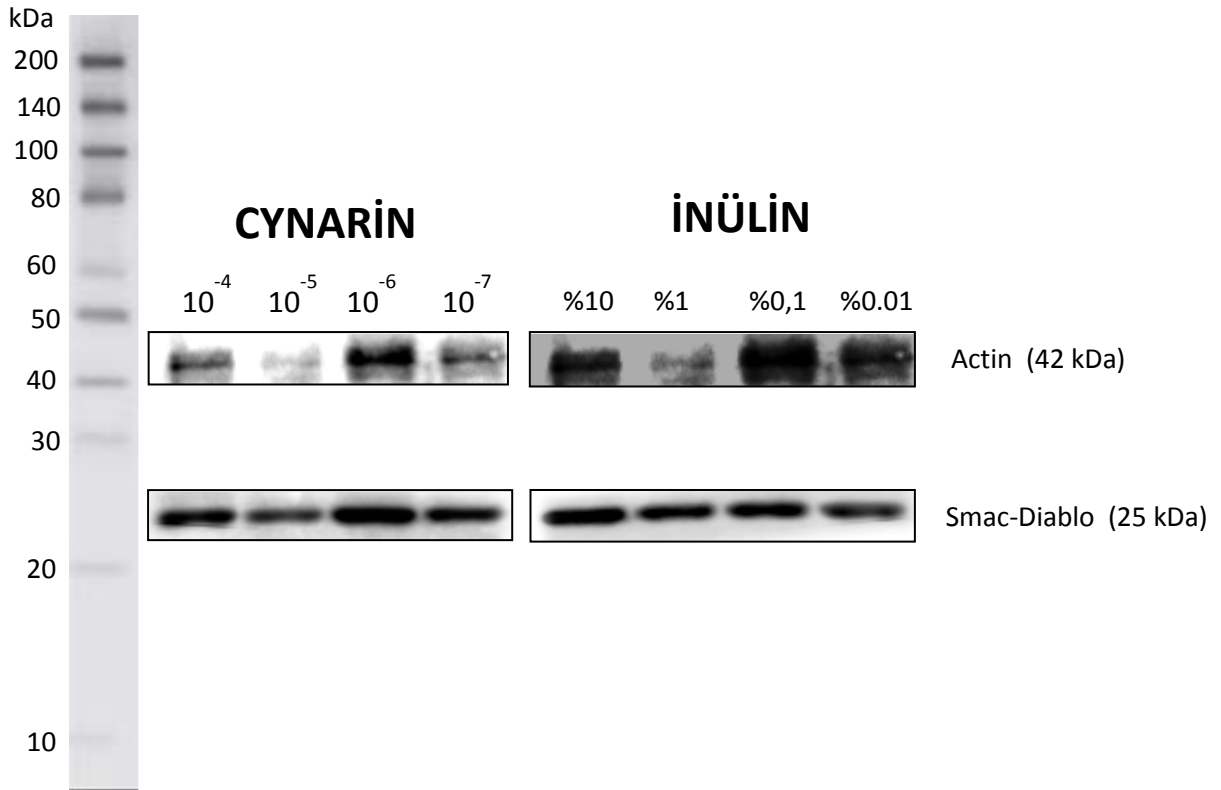
Çalışmamızda apoptotik belirteçlerden Apaf-1, Sitokrom-c ve Caspaz-3 protein düzeylerine western işaretleme ile baktığımızda Cynarin'in düşük dozlarda apoptotik bir etkisi saptanmamıştır. Elde edilen sonuçlar aynı deneyde çalışılan aktin proteinine ait bantlarla normalize edilerek istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Cynarin'in  $10^{-7}$  M'lık konsantrasyonda uygulanan dozu ile  $10^{-4}$  M'lık konsantrasyonu arasında apoptotik belirteçler açısından anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 6.5).

Benzer şekilde İnülin'de de doza bağımlı anti-apoptotik etkiden söz edilebilir. Düşük dozlarda HepB3 hücrelerinde apoptoz belirteçlerinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (Şekil 6.6).



**Şekil 6.6.** Farklı dozlarda İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Apaf-1, Caspaz-3 ve Sitokrom-c'ye ait western işaretleme görüntüleri. Sonuçlar Azure Spot analiz programında Aktine göre normalize edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pl) apoptozis sürecinde önemli etkileri olan bir diğer moleküldür. Bu protein mitokondriyal porlarından salgılanır; IAP'yi (Inhibitors of Apoptosis Proteins) inhibe ederek apoptozisi hızlandırır. Biz de çalışmamızda İnülin ve Cynarin'in bu protein düzeyleri üzerine etkili olup olmadığına bakmayı amaçladık. Western işaretleme sonuçlarına göre Smac-Diablo Protein düzeylerinde özellikle yüksek konsantrasyonda İnülin uygulaması sonrası artış tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Cynarin'in ise aktine göre normalizasyonu sonrasında dozlar arasında anlamlı bir farka neden olmadığı gösterilmiştir ( $p > 0,05$ ) (Şekil 6.7).

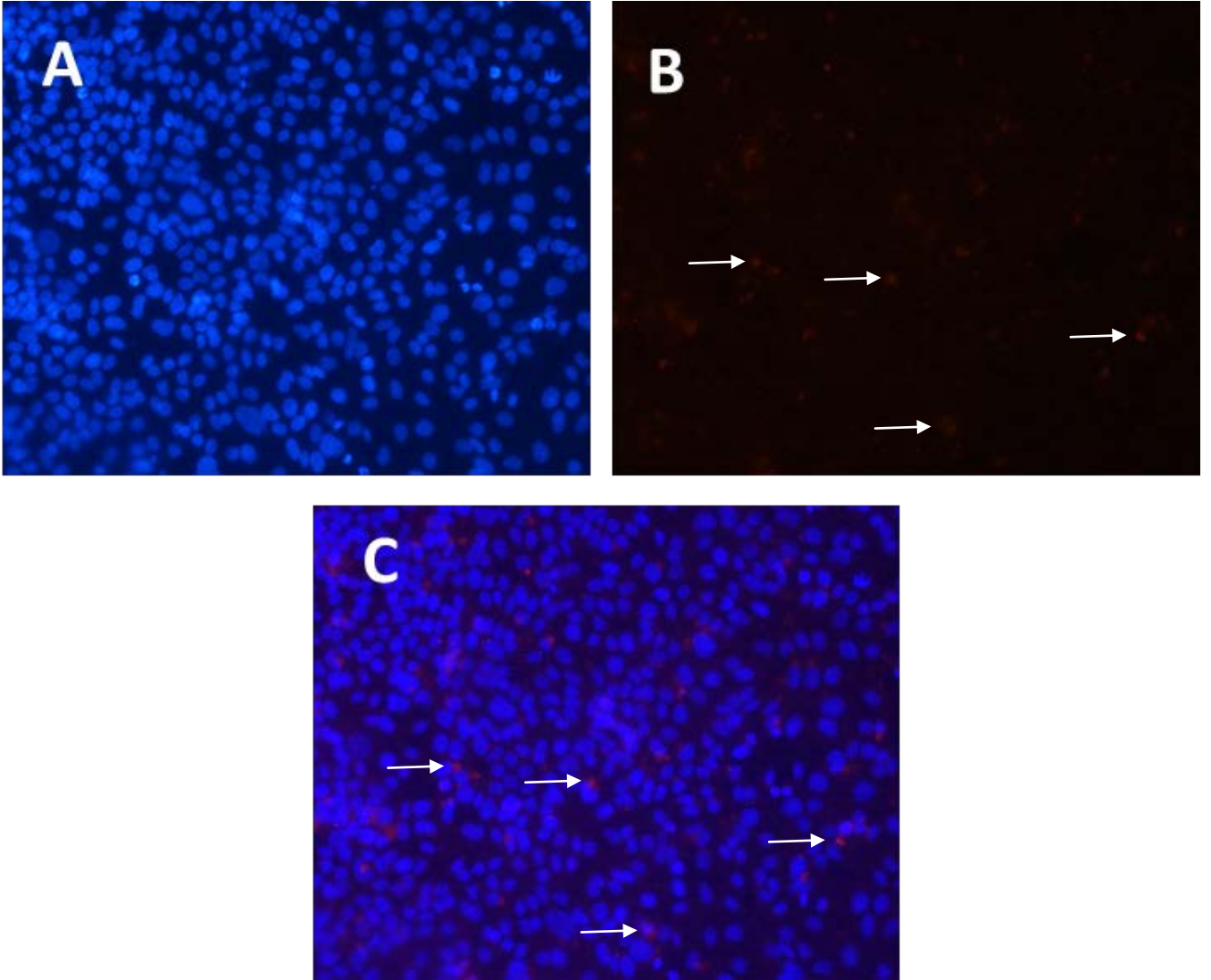


**Şekil 6.7.** Farklı dozlarda Cynarin ve İnülin ile inkübe edilmiş Hep3B hücrelerinde apoptotik belirteçlerden Smac/Diablo'ya ait western işaretleme görüntüleri. Sonuçlar Azure Spot analiz programında Aktine göre normalize edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

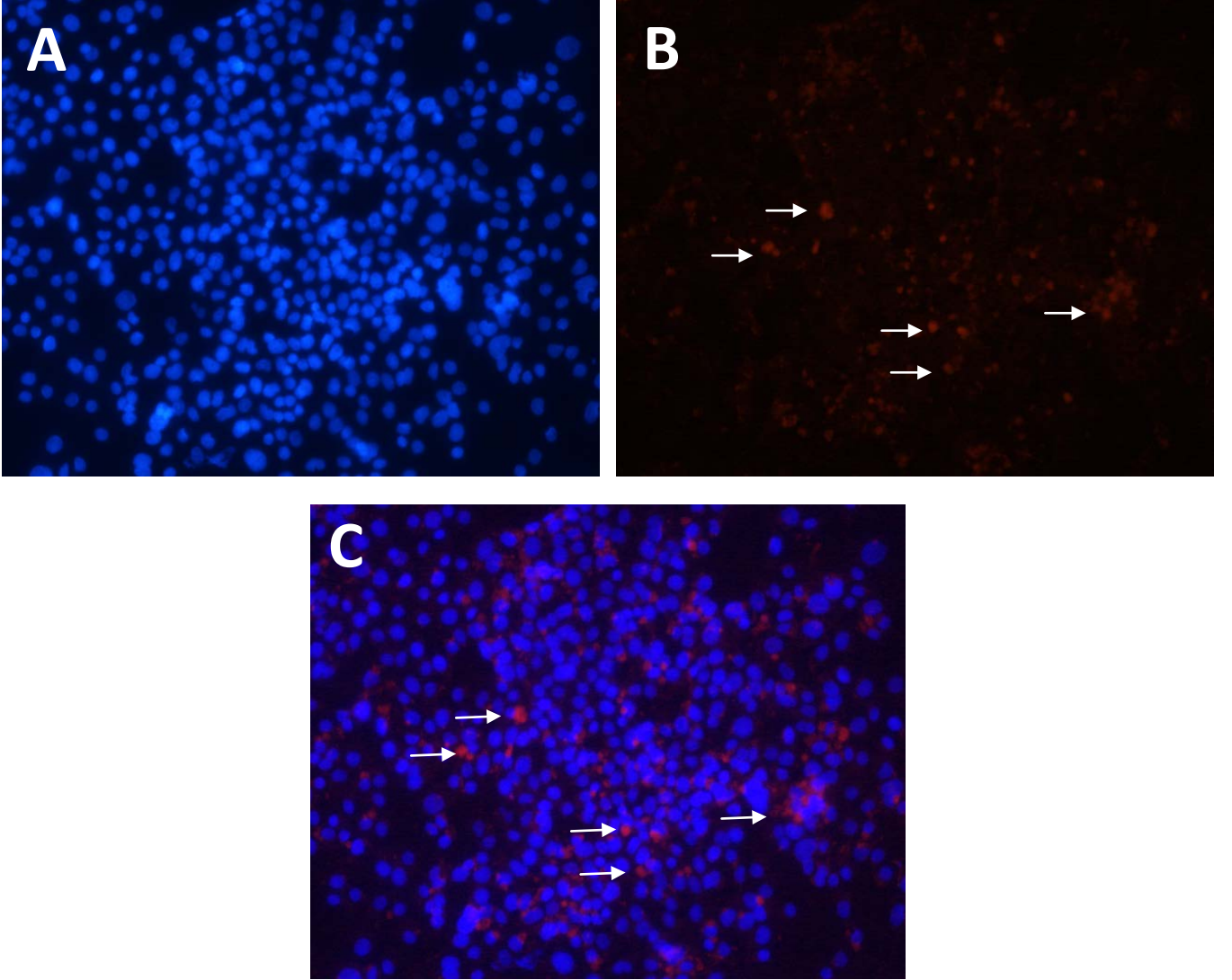
### **6.3. İMMÜNFLUORESAN (IF) İŞARETLEME SONUÇLARI**

Çalışmamızda ayrıca hedef proteinlerin hücre içi lokalizasyonunun gösterilmesi amacıyla immün işaretleme de yapılmıştır. Yuvarlak lamellere ekilerek büyütülen ve etken maddeler ile inkübe edilen Hep3B hücrelerinde yapılan immün işaretleme görüntüleri şekil 6.8, şekil 6.9 ve şekil 6.10'da gösterildiği gibidir.

Hücrelerde apoptozis ve inflamatuvar belirteçlerin western işaretlemelerine paralel olarak apoptotik belirteçlerden Apaf-1'i gösterebilmek amacıyla immün fluoresan boyama yöntemi ile hücreler boyanmıştır. Hücreler anti Apaf-1 ve anti sitokrom-c birincil antikorları ile boyandıktan sonra fluoresan işaretli ikincil antikorlar ile görünür hale getirilmiş ve DAPI içeren kapatma medyumunu ile kapatılarak çekirdek boyaması da yapılmıştır. Daha sonra lamalar fluoresan mikroskop ve dijital kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır. Çekirdek boyaması olan DAPI hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale gelmesi için kullanılmıştır.

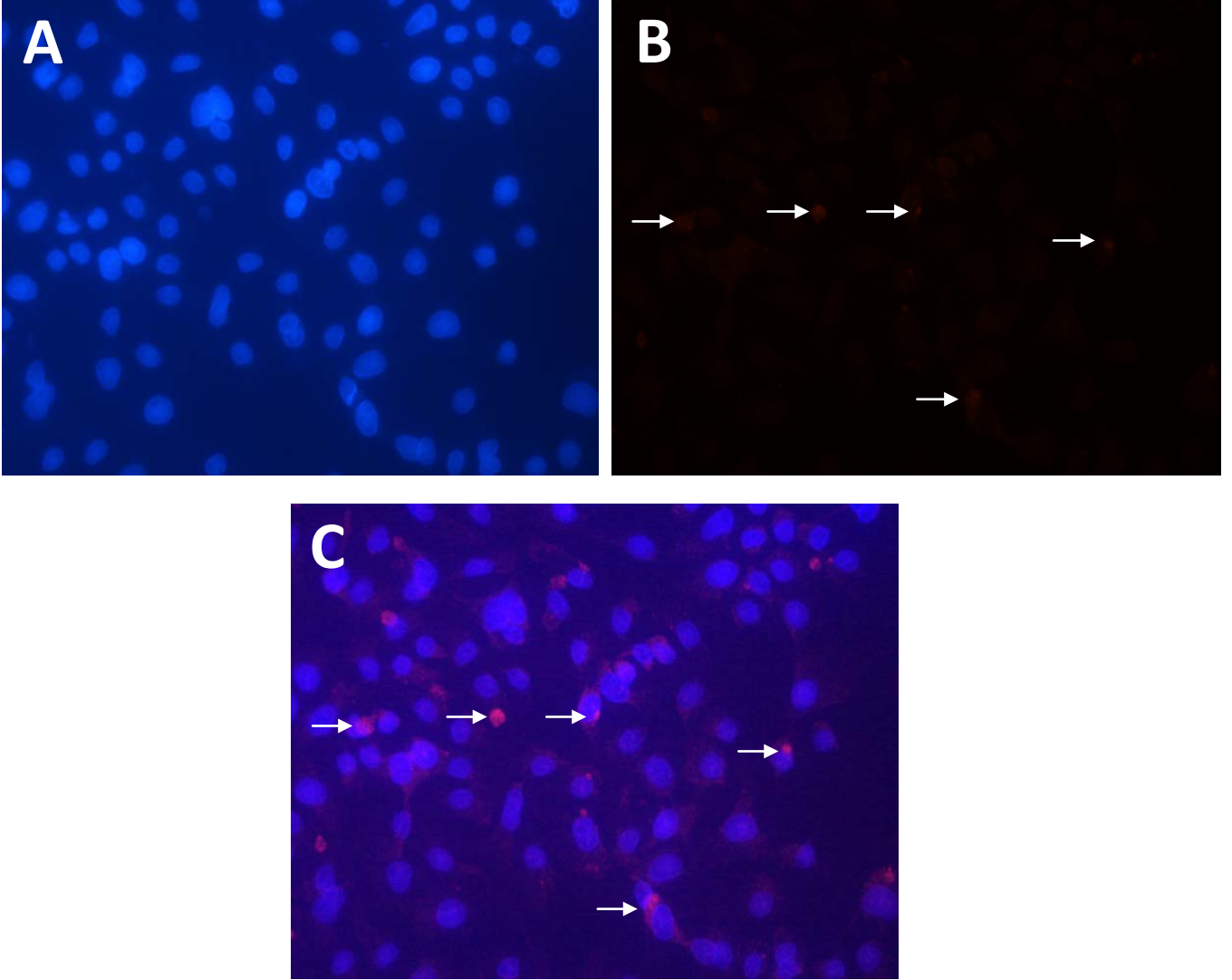


**Şekil 6.8.**  $10^{-7}$  M Cynarin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin gösterilmesi (20X büyütme). A; DAPI ile çekirdek boyaması, B; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647) ile boyanan Apaf-1, C; A ve B'nin dijital olarak merge edilmiş (üst üste bindirilmiş) görüntüsü.



**Şekil 6.9:**  $10^{-4}$  M Cynarin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin gösterilmesi (20X büyütme). A; DAPI ile çekirdek boyaması, B; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647) ile boyanan Apaf-1, C; A ve B'nin dijital olarak merge edilmiş (üst üste bindirilmiş) görüntüsü.





**Şekil 6.10:** %10'luk İnülin ile 24 saat inkübasyon sonrası IF işaretleme ile sitoplazma içinde Apaf-1 proteinlerinin gösterilmesi (40X büyütme). A; DAPI ile çekirdek boyaması, B; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647) ile boyanan Apaf-1, C; A ve B'nin dijital olarak merge edilmiş (üst üste bindirilmiş) görüntüsü



Şekil 6.8, Şekil 6.9 ve Şekil 6.10'da DAPI ve Apaf-1 boyaması yapılan hücrelere ait 3 alan belirlenmiş ve Apaf-1 pozitif boyanan hücrelerin %' si alınarak ortalama±standart sapma değerleri hesaplanarak grafik haline getirilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken ( $p>0.05$ ) Cynarin için  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  M' dan itibaren diğer konsantrasyonlarla kıyaslandığında kontrole aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). İstatistiksel açıdan kontrole aralarında anlamlı bir fark olması hücre apoptozisinde  $10^{-6}$  M' dan itibaren azalma gösterdiğine işaret etmektedir.

## 7. TARTIŞMA

Tıp alanında uzun yıllardır yapılan çalışmalar ile doğal beslenme olarak tarif edebileceğimiz sebze, meyve, taneli hububat ve baklagillerden zengin diyetle beslenmenin, kalp hastalıkları, hipertansiyon, kanser ve diyabet gibi pek çok hastalığa ait riskleri azaltabileceği ileri sürülmektedir (84,85). Üstelik son yıllarda yapılmış çalışmalar ile inflamatuvar, viral / parazitik hastalıklar ve psikotik bozukluklarda da yararlı etkilerinin olabileceğine ilişkin veriler sunulmaktadır (1,2).

Genel olarak bakıldığında fitokimyasalların, antioksidan enzim sistemini indükleyerek kanser hücrelerinin gelişimini önlemede potansiyel etkileri bulunmaktadır. Oksidan köklerinin yakalanmasının yanı sıra detoksifiye edici enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozise ilişkin gen ekspresyonlarını, hormon metabolizması ve antibakteriyal ve antiviral etkileri düzenleyerek de etkili olurlar (3,4). Besleyici etkilerinin yanı sıra vücuda alındığında sağlık üzerine olumlu etki gösteren besinler oldukları için genelde bu tür besinlere “fonksiyonel besin” adı da verilmektedir. Çalışmamızda etkilerine baktığımız İnülin ve Cynarin de fonksiyonel besin bileşenleri olarak tanımlanmaktadır.

Hindiba bitkisinden doğal olarak elde edilen İnülin önemli bir fonksiyonel besin bileşeni olarak literatürde önemli bir araştırma konusudur (86). İnülinin yapısına bakıldığında polidispers karbonhidrat olarak bilinmektedir ve inülin içeren bitkiler genellikle Liliaceae, Amaryllidaceae, Gramineae ve Compositae familyasında yer almaktadır. İnülin ve benzer yapıdaki oligofruktozlar, bazı sistemik ve fizyolojik özellikleri ile kalın bağırsak işlevini etkilerler. Kalın bağırsakta bulunan bifidobakterilerin gelişmesini uyardıkları için de birer prebiyotiklerdir. İnülin, günümüzde fruktooligosakkaritler ile birlikte gıdalara prebiyotik olarak ilave edilmekte ve araştırmaların tümünde birlikte incelenmektedir. Başta kalsiyum olmak üzere birçok mineralin emilimini etkileyerek, kemik mineral yoğunluğunu artırır ve osteoporoz riskini azaltırlar. Bağışıklık sistemi uyarırlar, karaciğerde yağ yapımını azaltırlar, hiperinsülinemiye önleyerek kardiyovasküler hastalık riskini düşürürler. Bağırsak hareketlerini arttırarak kabızlığı, bifidobakterilerin gram negatif ve pozitif bakterilerin çoğalmasını önleyici özellikleri nedeniyle de ishal

oluşumunu önlerler. Kötü huylu tümörlerin gelişmesini engelleyerek veya azaltarak, kalın bağırsak kanseri riskini düşürürler (10,87,88, 89).

İnülinin enerji değeri içerdiği karbon zincirine, fermente olan miktara, dışkıyla atılan miktara ve oluşan kısa zincirli yağ asitlerine bağlı olarak değişir. Roberfroid (10), bir gram inülin ve oligofruktozun ortalama 1.5-1.7kkal enerji verdiğini, bu miktarın ise heksozların verdiği enerjinin yaklaşık %38'ine eşit olduğunu açıklamıştır (90). Bu özellikleri nedeniyle İnülin obezite tedavisinde de rahatlıkla kullanılabilir (91). İnülin'in mineral emilimi (92,93,94,95,96,97,98) gastrointestinal sistem lipit metabolizması (99,100,101,102,103,104) ve immün sistem (105,106,107) üzerine etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Ayrıca inülinin kanser oluşum gelişim basamaklarında da etkili olabileceği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (108,109,110). Özellikle inülinin bifidobakteri sentezini arttırarak, kalın bağırsak kanseri riskini azalttığı ileri sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada ratlarda 1.2 dimetilhidrazin ile kalın bağırsakta kötü huylu tümör oluşturulmuş, daha sonra bir gruba sadece yağsız süt; bir gruba yağsız süt ve bifidobakteri; bir gruba yağsız süt ve oligofruktoz; bir gruba ise yağsız süt, bifidobakteri ve oligofruktoz kombinasyonu verilerek tümörlerin gelişimi incelenmiştir. Bifidobakteri ve oligofruktoz verilen grupta kötü huylu tümörler diğer gruplara göre, anlamlı şekilde azalmıştır. Bifidobakteri bir probiyotik, oligofruktoz ise prebiyotiktir, ikisinin beraber kullanılması sinbiyotik etki ile kalın bağırsak kanseri riskini azaltmaktadır (111). Yapılan çalışmalar özellikle İnülin ve oligofruktozların kanser oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalardır. Limburg ve ark. prebiyotik diyet liflerinin özellikle kolorektal kanserde koruyucu etkilerini gözlemlediklerini rapor etmişlerdir (112). Çok merkezli, randomize yapılmış bu çalışmada kolorektal kanser oluşumu açısından diyet lifleri olarak prebiyotiklerin, özellikle İnülin'in koruyucu/öneyici bir etkisini bulamamışlardır (112).

Nagahara ve ark. ise PMA ile uyarılmış THP-1 makrofaj hücrelerinde inülinin, fosfoinozitol 3-kinaz ve MAP kinaz yolları üzerinden fagositozu uyararak stimüle ettiklerini bildirmişlerdir (113).

Clarck ve ark. 2012 yılında yapmış oldukları sistematik derlemede, insan kolorektal kanseri için bio-belirteç olabilecek prebiyotiklerin etkilerini irdemişlerdir. Bir laktuloz,

altı dirençli nişasta çalışması analiz eden araştırmacılar iki adet de oligofruktoz/inülin çalışmasını incelemişlerdir. Dirençli nişastanın adenom veya kolorektal kanser gelişimi üzerinde etkisinin olmadığını, buna karşılık laktulozun adenom tekrarını azalttığına dikkat çekmişlerdir. Ancak mitotik özellikler, gen ekspresyonu ve DNA metilasyonu üzerine nişasta tüketiminin etkilerinin olabileceği, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine ise etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Oligofruktoz/inülin etkisinin ise nişastadan daha farklı olarak olumlu etkiler gösterdiğini söylemişlerdir (114).

Wu ve ark.'nın İnülin ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarında genotoksik etkili azoxymethanın kolonik cevabında inülinin etkisine bakmışlardır. İnülinin fekal probiyotik konsantrasyonunu arttırdığını söyleyerek, çalışmalarına ait sonuçların çözünebilir liflerin selülozdan çok daha etkili bir şekilde azoxymethan ile uyarılmış genotoksisiteye karşı iyileştirici özelliğinin olduğunu kanıtladığını bildirmişlerdir. Mekanizma üzerine yaptıkları analizlerde özellikle antioksidan enzim genlerinin ifade düzeyinin arttığı ve Bcl-2'nin baskılanması sonucu epitelial apoptozisin arttığını göstermişlerdir (115).

Pool-Zobel ve Sauer de İnülin benzeri fruktanların kolorektal kanser riski üzerine elde ettikleri deneysel çalışmalarının sonuçlarını sundukları makalelerinde önemli deneysel kanıtlar sunarak İnülin'in insan kolon hücrelerinde kolon kanseri risk parametrelerini modüle ettiğini, ancak daha geniş çalışmalar yapılarak risk faktörlerine maruziyetin azalması gibi çevresel faktörlerin etkisini ortadan kaldırarak doğru bir değerlendirilmenin yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (116).

Bu çalışmada ise İnülin'in farklı dozlarda kanser hücrelerine karşı etkileri bakılmış ve  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  M'lık yüksek konsantrasyonlarda Hep3B kanser soyu hücrelerinde apoptozisi ve inflamasyonu tetiklediği gösterilmiştir.

Bir diğer önemli fitokimyasal grubu ise flavonoidlerdir. Flavonoidlerle ilgili ilk çalışma 1936 yılında Rusznyak ve Szent-Gyorgyi tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri sorgulanmıştır (117). Polifenoller/flavonoidler ilk olarak bitki fizyolojisindeki rolleri ve bitkilerin renk ve lezzet özellikleri üzerindeki etkileri nedeniyle ele alınmakta iken, son yıllarda özellikle sağlık üzerindeki etkilerinin ön plana çıkmasıyla önemli bir araştırma konusu haline gelmişlerdir. Özellikle serbest radikal tutucu ve antioksidan fonksiyonları nedeniyle flavonoidler pek çok araştırmacının dikkatini

çekmektedirler (118,119,120). Flavonoid alımının koroner kalp hastalıkları ile kanser gibi hastalıkların engellenmesinde rol oynadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (121,122, 123,124,125).

Rossi ve ark. yaptığı çalışmada flavanoid bileşiklerini içeren diyetle beslenmenin, kansere yakalanma riskini düşürdüğü saptanmıştır (126). Aynı zamanda bu bileşiklerin apoptozisi indüklemesi ve hücre siklusunun durdurulmasını sağladığı gözlemlenmiştir (6).

Bu çalışmada kullanılan ve bir polifenol olan Cynarin'in, Hep3B hücrelerinin proliferasyonunu 24 saatlik inkübasyon sonunda doza bağlı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Cynarin'in toksik etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, HeLa hücrelerinde 400 µM'a kadar toksik etkisi bulunmazken; MT-2 hücrelerinde 250 µM Cynarin'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (34). Diğer bir doz çalışmasında ise, Cynarin'in 1000 µM 'a kadar Jurkat-T hücrelerinde toksik etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (127). Bizim çalışmamızda ise 100 µM ( $10^{-4}$ ) ve 10 µM'lık ( $10^{-5}$ ) konsantrasyonlarda Hep3B hücre proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir.

Günümüz dünyasında yaşam koşullarının hızla değişmesi ve bireylerin hazır besin tüketimlerinin buna bağlı olarak enerji alımlarının artması, ancak tam tersi bir şekilde günlük fiziksel aktivitelerinin azalması, gelişen hastalıklarla beraber sağlık harcamalarının artması toplumlara kronik hastalıklarla mücadele etme zorunluluğu getirmiştir. Tüketicilerin sağlık ve beslenme ilişkisini öğrenmeye başlamaları ile birlikte, gıda endüstrisinde de sağlıklı beslenme ürünleri geliştirebilmek için yeni teknolojiler geliştirilmektedir. İnülin ve oligofruktoz da, bugün besin endüstrisinde sukrozdan sentezlendiği gibi hindiba köklerinden de ekstrakt elde edilebilmektedir.

Biyoyararlanımı hakkında çok az bilgi olmasına rağmen, son çalışmalar göstermektedir ki çözünebilir flavonoidlerin emilimi ile miselleşme artabilmektedir (128,129).

Günümüzde flavonoidlerin biyoyararlanımı ve mekanizması hakkında yapılan çalışma sayısı çok azdır. Dolayısıyla flavonoidlerin insanlardaki metabolik dönüşümlerinin göz ardı edilmesinden ötürü sağlık üzerine olan etkileri de açıkça ortaya konamamıştır.

Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada da flavonoidlerin, in vitro ve in vivo olarak biyoaktiviteleri arasında önemli farklılıkların olduğu yönünde sonuçlara varılmıştır (130,131,132).

Dolayısıyla flavonoidlerin emilimi, biyoyararlılığı ve metabolizmasının net olması yapılacak çalışmalara yön vermesi açısından çok önemlidir. Biyoyararlılık çalışmalarında emilimin etkinliği ve alınan besinlerin metabolik kullanımı da dikkate alınması gereken diğer önemli kriterler olarak karşımıza çıkmaktadır (133).

Tüm bu bulgulara rağmen flavonoidlerin günlük tüketim miktarları da henüz net değildir. Bunun sebepleri arasında bitki genetiği, çevresel koşullar, çimlenme, olgunluk derecesi, işleme ve depolama, cins-varyete gibi bitkideki flavonoid oluşumunu yüksek derecede etkileyen pek çok faktörün etkili olmasıdır (134).

Flavonoidler çok güçlü antitümör ajanlardır aynı zamanda antioksidan ve antiproliferatif fonksiyonlarından ötürü de apoptozisi indükleme, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü düzenleyebilme özelliklerine sahiptirler (135,136,137). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile yüksek oranda flavonoid içeren meyve ve sebze tüketimi ile düşük kanser riski arasında korelasyon olduğu ortaya konmuştur. Flavonoidlerce zengin diyetle beslenen ve sigara içen-içmeyen postmenopozal kadınlarda gıda sıklığı anketi yapılarak yürütülen bir çalışmada akciğer kanserine yakalanma riskinin flavonoid bazlı besinlerin tüketimi ile azaldığı gösterilmiştir (138). Proantosiyanidinler ve diğer flavonoidlerin pankreas kanseri ile ilişkisini inceleyen başka bir çalışmada ise her gün proantosiyanidince zengin meyve tüketimi yapan bireylerde, proantosiyanidinin pankreas kanserine yakalanma riskini % 25 oranında düşürdüğü gösterilmiştir (138).

Birçok epidemiyolojik çalışma, antioksidan olan flavonoidlerin kardiyovasküler hastalık ve kanser gelişim riskini düşürdüğünü savunmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında in vitro ortamda kanser hücresi üzerinde flavonoidlerin çeşitli antikanser etkileri gösterildiği anlaşılmıştır. Choi ve ark yaptıkları çalışmada polifenollerin, kültür ortamındaki insan meme kanser hücresinde hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozisi uyarmış ve hücre döngüsü de inhibisyona uğramıştır (135). Fakat benzer pek çok çalışmanın olumlu sonuçlarına rağmen potansiyel olarak antikanser özellikler

taşımakta olan flavonoidlerin bazı temel mekanizmaları ve hücreel cevaplar üzerine etkileri halen tam olarak anlaşılamamıştır.

Yine meme kanseri hücre soyunda yapılan bir çalışmada izoflavon ailesinden genisteinin, meme kanseri hücrelerine olan etkisine bakılmış, IGF-1R (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü 1) ifadesi üzerine olası engelleyici etkisi ve bu etkide belirli sinyal yollarının rolleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Genisteinin meme kanseri hücrelerinde IGF-1R ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür (139).

Bizim çalışmamızda da cynarinin yüksek dozlarının Hep3B kanser soyunda apoptozu indükleyerek hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir.

Flavonoidler, genel olarak bakıldığında hücre proliferasyon inhibitörleri olarak anılmaktadırlar. Pek çok çalışma flavonoid bileşiklerinin kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisini göstermiştir.

Yine yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmalar, antikanser ajanlar olan flavonoid bileşiklerini içeren diyetle beslenmenin, kansere yakalanma riskini düşürdüğü yönünde sonuçların olduğunu vurgulamaktadır. Flavonoidlerin kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkileri çeşitli mekanizmalarla anlatılmıştır. Bu bileşikler özellikle hücre siklusunun durdurulması ve apoptozisi indüklemesi yönüyle dikkat çekmektedir (137,138).

Wu ve ark. hepatik stellat hücrelerinde 25, 50, 75 ve 100  $\mu$ M dozlarında verilen kuersetinin etkisini analiz ettikleri çalışmalarında Kuersetinin hücre proliferasyonunu doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiğini, inhibisyonun en fazla 48. saatte ve 100  $\mu$ M kuersetin ile gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca apoptozis belirteçlerinin analizi ve hücre siklusunun durdurulması yoluyla da proliferasyon inhibisyonuna etken olarak kuersetin gösterilmiştir (140).

Wang ve ark. insan mide karsinoma hücresi BGC-823 hücrelerinde kuersetinin etkisini araştırmışlardır. Buna göre kuersetinin apoptotik yolaktaki, proapoptotik kaspaz-3 ve Bax proteinlerini artırıp, antiapoptotik Bcl-2 proteinini azalttığını, bununla beraber hücre siklusundaki S fazını durdurduğunu gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla kuersetin BGC-823 hücreleri proliferasyonunu azalttığını bildirmişlerdir (141).

Bizim alışmamızda da cynarinin önemli apoptotik belirteçlerin protein ifadeleri üzerinde olası etkilerine bakılmış ve apoptotik belirteçlerde doza bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde değişimler olduğu, yüksek dozlarda apotozisin hızlandığı buna karşılık hücre proliferasyonunun azaldığı tespit edilmiştir.



## 8. SONUÇ

Bu çalışmada oligofruktoz ailesinden İnülin ve önemli flavonoidlerden biri olan Cynarin'in, insan hepatoselüler kanseri hücresi olan Hep3B hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak inhibe ettiği, Western protein işaretleme ve immün floresan boyama yöntemleri ile ortaya koyulmuştur. Aynı zamanda inflamatuvar belirteçlerin protein ifadeleri de irdelenmiş ve etken maddelerin inflamatuvar cevapları analiz edilmiştir.

Literatürde yapılmış in vitro çalışmalara benzer sonuçlar aldığımız bu çalışmamız yüksek dozlarda alınan polifenol/flavonoid ve oligofruktozun antiproliferatif ve antitümörejenik etkilerinin ortaya konulmasında literatüre destek sağlamaktadır. Belirlenen bu özellikleri nedeniyle kanser hastalarında diğer tedavilerin yanında destek tedavi olarak kullanılabilceği görüşü devam etmektedir.

Ancak literatürde yapılmış kısıtlı sayıdaki çalışmada kanser hücrelerine uygulanan antioksidan özellikteki flavonoid ve oligofruktoz yapıdaki bileşiklerin hücresel proliferasyonun inhibisyonu ile hücresel ATP düzeylerinde de değişikliklere neden olabildiği bildirilmiştir ancak aralarındaki ilişki net olarak bilinmemektedir. Aynı zamanda inflamatuvar süreçte hücresel cevabın oluşmasında özellikle proliferasyonu artmış, farklı özellikler kazanmış olması muhtemel kanser hücrelerinden ve bu hücrelere karşı inflamatuvar cevabın gelişiminde bu etken maddelerin etki mekanizmaları tam olarak net değildir. Bu alanda birçok çalışmaya ihtiyaç vardır.

## 9. TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, verdiği tüm destek ve emeklerinden dolayı çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Şule Beyhan Özdaş'a,

Çalışma konusunun belirlenebilmesi için yol gösteren Sayın Yard. Doç. Dr. Rüksan Çehreli'ye,

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Volkan Baltacı, Doç. Dr. Veysel Sabri Hançer ve Yard. Doç. Dr. Günnur Demircan'a,

Tez laboratuvar çalışmalarım boyunca ekipman desteği sağlayan Azure Biosystem ekibi'ne,

İmmünfluoresan görüntüleme deki değerli katkılarından dolayı Sayın Yard. Doç. Dr. Yosun Mater'e,

Ve son olarak bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili annem, babam ve abime,

Sonsuz Teşekkürler...

## 10. KAYNAKLAR

1. Sarah B. Fruits of the Earth. *Resurgence*. 2001, 205:14-15.
2. Wargovich MJ. Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. *Cancer Lett*. 1997, 114(1-2):11-17.
3. Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V and Cardinoli A. Globe Artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *J Foods*. 2009, 1:131-144.
4. Gönenç A, Hacışevki A, Aslan S, Torun M and Şimşek B. Increased oxidative DNA damage and impaired antioxidant defense system in patients with gastrointestinal cancer. *Eur J Inter Medic*. 2012, 23:350-354.
5. Atmaca E ve Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2009, 20(2):79-83.
6. Aktuğ H. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*. 2014, 53(1):60-64.
7. Kierszenlaoum AL and Tres LL. Histology and Cell Biology. Philadelphia, Maslay Elsevier., 2012.
8. Yabancı N. İnulin ve Oligofruktozların İnsan Sağlığı ve Beslenmesi Üzerine Etkileri. *Akademi Gıda*. 2010, 8(1):49-54.
9. Lopez-Malina D, Navarro-Martinez MD, Melgorejo FR, Chazarro S and Radriguez-Lopez JP. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara Scolymus L.*). *Phytochem*. 2005, 66:1476-1484.
10. Roberfroid MB. Concept in Functional Foods: The Case of Inulin and Oligofructose. *J Nutri*. 1999, 129:1398-1401.
11. Golvano F, Fauci LL, Vitaglione P, Faglione V, Vanella L and Felgines C. Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cynaridin and related glycosides. *Ann Ist Super Sanita*. 2007, 43(4):382-393.
12. Christaki E, Bonas E and Floray-Paneri P. Nutritional And Functional Properties of Cynara Crops (Globe Artichoke and Cardoon) and Their Potential Applications : A Review. *Int J App Scien Techno*. 2012, 2(2):64-68.
13. Baysal A. Beslenme. Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 2009.
14. Muhsinoğlu Ö. Beslenme ve Kanser. Ankara, GATA Basımevi, 2007.
15. Baysal A. Diyet El Kitabı. Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 2007.

16. Onat H ve Demir Ç. Sağlıkta ve Kanserde Doğru Beslenme. Ankara, Soy Yayınları, 2007.
17. Aksoydan E. Yaşlılık ve Beslenme. Ankara, Burgaz Matbaası, 2005.
18. Coşkun T. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2005, 48:69-84.
19. Hasler CM. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges- A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J Nutri*. 2002, 132:3772-3781.
20. Fuhrman B, Buch S, Voya J, Belinky PA, Coleman R and Hayekt AM. Licorice extract and its major polyphenol globridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation : in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E. Deficients mice. *Am J Clin Nutri*. 1997, 66(2):267-275.
21. Almajano MP, Delgado ME and Gordon MH. Changes in the antioxidant properties of protein solution in the presence of epigallocatechin gallate. *Food Chem*. 2007, 101:126-130.
22. Froga CG, Galleano M, Verstraeten SV and Oteiza PI. Basic Biochemical mechanism behind the health benefits of polyphenol. *Molec AspecMedic*. 2010, 31:435-445.
23. Baxter NJ, Lilley JH, Haslam E and Williamson MP. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivory Proline – Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochem*. 1997, 36:5566-5577.
24. Choi BM and Kim BR. Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidyli nasitol 3-kinose/Akt. And ERK pathways and its protective effects against oxidative injury. *Eur JPharma*. 2008, 580:12-18.
25. El Senoysy AS, Farag MA, AL-Mahdy DA and Wessjohann LA. Developmentol changes in leaf phenolics composition from three artichoke cus (*Cynara Scolymus*) as determined via UHPLC-MS and chemometrics. *Phytochem*. 2014, 18:67-76.
26. Lattanzio V, Cicco N and Linsalata V. Antioxidant activities of artichoke phenolics. *Acta Hortic*. 2005, 681:421-427.
27. T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı (<http://www.turkomp.gov.tr/food/241>).

28. Pandino G, Lambordo S and Mauromicale G. Mineral profile in globe artichoke as affected by genotype, head part and environment. *J Sci Food Agri.* 2011, 91(2):302-308.
29. Kraft K. Artichoke leaf extract – Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomed.* 1997, 4(4):369-378.
30. Lupotelli G, Marchesi S, Lombardini R, Roscini AR, Trinca F, Gemelli F, Vaudo G and Mannarino E. Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sciences.* 2004, 76:775-782.
31. Petrowicz O, Gelohardt R, Danner M, Schwandt M and Kraft K. Effects of artichoke leaf extract (ALE) on lipoprotein metabolism in vitro and in vivo. *Atherosclerosis.* 1997, 129.
32. Miccadei S, Venere D, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, Fraioli R, Mobarhan S and Maiani G. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara Scolymus L.*) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutri Cancer.* 2008, 60:276-283.
33. Garcia FFP, Adzet T and Canigual S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Res.* 2000, 33:661-665.
34. Slanina J, Taborska E, Bachorakova E, Slaninova I, Humpa O, Robinson WE and Schram KH. New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetra Lett.* 2001, 42:3383-3385.
35. Negro D, Montesano V, Grieco S, Crupi P, Sarli G, De Lisi G and Sonrate G. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J Food Sci.* 2012, 77(2):244-252.
36. Atasever B, Dar KA, Kuruca SE, Turan N, Seyhanlı V and Meriçli A. Effects of flavonoids obtained from *Cynara syriaca* on leukemic cells. *J Facul Pharm Ankara University.* 2003, 32(3):143-150.
37. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara Scolymus L.*) against hydroperoxide-induced oxidative stress in culture rat hepatocytes. *Toxic AppPharma.* 1997, 144:279-286.
38. Franck A. Inulin Food Polysaccharides and Their Applications. Stephen A.M, London, Taylor and Francis Group, 2006.

39. Lattimer JM and Haub MD. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients*. 2010, 2(12):1266-1289.
40. Amaral L, Morgan D, Stephen AM and Whiting S. Effect of Propionate on Lipid-Metabolism in Healthy – Human Subjects. *Faseb J*. 1992, 6:1655.
41. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson P, Klinder A, O’Riordon M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Loon JV, Watzl B and Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutri*. 2007, 85:488-496.
42. Cani PD, Joly E, Horsmans Y and Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur J Clin Nutri*. 2006, 60:567-572.
43. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1995.
44. Halliwell B and Gutteridge JMC. Lipid peroxidation radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*. 1984, 23:1396-1397.
45. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem*. 1984, 219:1-14.
46. Halliwell B, Cross CE and Gutteridge JMC. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. *J Labor Clin Medic*. 1992, 119(6):598-620.
47. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Medic*. 1991, 91(3c):145-225.
48. Babior BM. Phagocytes and oxidative stres. *Am J Medic*. 2000, 109(1):33-44.
49. Bains JS and Show CA. Neurodegenerative disardes in humans: the role of glutothione in oxidative stres mediated neuronal death. *Brain Res Rev*. 1997, 25:335-358.
50. Brunk UT, Jones CB and Sohal RS. A novel hypothesis of lipofus cinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stres and autophagocytosis. *Mutat Res*. 1992, 275(3-6):395-403.
51. Serafini M and Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: in the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Rep*. 2004, 9(3):145-152.

52. Hinshow DB, Sklar LA, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Sprogg RG and Cochrane CG. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol.* 1986, 123(3):454-464.
53. Golstein S, Czapski G, Cohen E and Meyerstein D. Free radicals induced peptide damage in the presence of transition metal ions: A plausible pathway for biological deleterious processes. *Free Radical Biol Med.* 1994, 17(1):11-18.
54. Altan N, Dingel A and Koca C. Diabetes Mellitus ve Oxidative Stress. *Turk J Biochem.* 2006, 31(2) :51-56.
55. Schaeferhenrich A, Beyer-Schlmeyer G, Festag G, Kuecher A, Haag N, Weise A, Liehr I, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J and Pool-Zobel BL. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutant Res.* 2003, 526:19-32.
56. White BC, Grossman LI and Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology.* 1993, 43:1656-1665.
57. Akkan G, Şense V ve Özyazgan S. Süksinik asit manöester tedavisinin STZ diyabetik ratlarının vasküler yanıtlarına etkisi. XIV. Ulusal Farmakoloji Kanseri. Antalya, 1997,89.
58. Rice- Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In Rice-Evans CA, Burdan RH. Free radical damage and its control. England, Elsevier Science Press, 1994, 131-153.
59. Thurnham D. Antioxidants and prooxidants in malnourished populations. *Proceedings Nutri Society.* 1990, 49:247-259.
60. Friedberg EC, McDaniel LD and Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Current Opin Genetics Dev.* 2004, 14(1):5-10.
61. Kilgore RS and Lucchesi BR. Reperfusion Injury After Myocardial Infarction: The Role of Free Radicals and the Inflammatory Response. *Clin Biochem.* 1993, 26:359-370.
62. Liu RH. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemical. *Am J Clin Nutri.* 2003, 78(3):517-520.

63. Deng R and Fridovich I. Formation of endonuclease III sensitive sites as a consequence of oxygen radical attack on DNA. *Free Radical Biol Med.* 1989, 6:120-126.
64. Penning LC, Lagerberg JWM, Van Dierendonck JH, Cornelisse CJ, DUBBLE J Mand Van Steveninck J. The role of DNA damage and inhibition of murine L 929 fibroblast , caused by photodynamically induced oxidative stres. *Cancer Res.* 1994, 54:5561-5567.
65. Ratham DV, Ankola DD, Bhandwaj V, Sahana DK and Kumar MN. Role of antioxidants in prophyloxsis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release.* 2006, 13(3):189-207.
66. Halliwell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharma.* 1995, 49(10):1341-1348.
67. Baskin SI and Salem H. Oxidants, antioxidants and free radicals. Washington DC, Taylor and Francis, 1997, 1-16.
68. Mak T. The E. Donnall Thomas Lecture – apoptosis : ‘this death that makes life live’ *Biological Blood Marrow Transplant.* 2003, 9:483-488.
69. Pınarbaşı E, Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M ve Tanyolaç B. Apoptozis Moleküler Biyoloji. Ankara, Nobel Yayınevi, 2007.
70. Güleş Ö ve Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler . *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008, 2:73-78.
71. Orrenius S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. *J Inter Medic.* 1995, 237:529-536.
72. Squier MK, Miller AC, Malkinson AM and Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol.* 1994, 159(2):229-237.
73. Altunkaynak B ve Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2008, 6(2):93-104.
74. Trump BF, Berezesky IK, Chang SH and Phelps PC. The pathways of cell death: ancosis, apoptosis and necrosis. *Toxico Patho.* 1997, 25(1):82-88.
75. Williams GM. Mechanism of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxico.* 2001, 166(1-2):3-10.



76. Yokuş B, Akdağ MZ, Dasdağ S, Çakır DU and Kızıl M. Extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) promotes oxidative DNA base modification in rats. *J Radiation Bio.* 2008, 8(10):789-795.
77. Kruch GD and Jew KD. Basic Science of Cancer. Philadelphia, Current Medicine Inc, 2000.
78. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease . *McGraw-Hill.* 2001, 613-674.
79. Altman R and Sang MJ. The Cancer Dictionary. New York, Facts on File , 1992.
80. Türk Halk Sağlığı Kurumu. Kanser Daire Başkanlığı.  
(<http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/47-karaciger-kanseri.html>).
81. The Essentials of Life Science Research (ATCC)  
(<http://www.atcc.org/products/all/HB-8064.aspx>).
82. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. Protein Methods. USA, Wiley-Liss Press, 1970, 414.
83. Laemmli-SDS-PAGE Bio Protocol  
([www.Bio-protocol.org/e80](http://www.Bio-protocol.org/e80)).
84. Wargo Vich MJ. Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. *Cancer Letter.*1997, 114(1 -2): 11-17.
85. Craig WJ. Phytochemicals: Guardians of our health . *Journal of American Diet Association.* 1997, 97 (10/2):S 199-204.
86. Roberfroid, M.B., Introducing inulin-type fructans. *J Nutri.* 2005. 93 (Suppl 1): 13-25.
87. Hekmat S, Morgan K, Soltani M, Gough R. Sensory Evaluation of Locally-grown Fruit Purees and Inulin Fibre on Probiotic Yogurt in Mwanza, Tanzania and the Microbial Analysis of Probiotic Yogurt Fortified with *Moringa oleifera*. *J Health Popul Nutri.* 2015. 33(1):60-7.
88. Munoz-Abraham AS, Judeeba S, Alkukhun A, Alfadda T, Patron-Lozano R, Rodriguez-Davalos MI, Geibel JP. A new method to measure intestinal secretion using fluorescein isothiocyanate-inulin in small bowel of rats. *J Surgical Res.* 2015 Apr 20

89. Cantero WB, Takahachi NA, Mauro MO, Pesarini JR, Rabacow AP, Antonioli AC, Oliveira RJ. Genomic lesions and colorectal carcinogenesis: the effects of protein-calorie restriction and inulin supplementation on deficiency statuses. *Genec Molec Res.* 2015, Mar 27;14(1):2422-35.
90. Roberfroid M.B. Caloric value of inulin and oligofructose. *J Nutri.* 1999, 129: 1436-1437.
91. Cherbut, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. *J Nutri.* 2002, 87(Supp 2): S159-162.
92. Greger JL. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *J Nutri.* 1999, 129: 1434-1435.
93. Morohashi T, Sano T, Ohta A and Yamada S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. *J Nutri.* 1998, 128(10): 1815-1818.
94. Ohta A, Motohashi Y, Sakai K, Hirayama M, Adachi T and Sakuma K. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9k in the large intestine of gastrectomized rats. *Scan J Gastro.* 1998, 33(10): 1062-1068.
95. Ohta A, Ohtsuki M, Uehara M, Hosono A, Hirayama M, Adachi T and Hara H. Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J Nutri.* 1998, 128(3):485-490.
96. Ohta A, Sakai K, Takasaki M, Uehara M, Tokunaga T and Adachi T. Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructooligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. *Intern J Vit Nutri Res.* 1999, 69(5):348-355.
97. Jenkins JAD, Kendall CWC and Vuksan V. Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutri.* 1999, 129:1431S-1433S.
98. Gibson GR. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutri.* 1999, 129:1438-1441.
99. Molis C, Flourie B, Ouarne F, Gailing MF, Lartigue S, Guibert A, Bornet F and Galmiche JP. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *Am J Clin Nutri.* 1996, 64(3):324-328.

100. Campbell JM, Fahey GC and Wolf JB. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutri.*1997, 127(1):130-136.
101. Delzenne NM and Kok NN. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J Nutri.*1999, 129 (7Suppl): 1467-1470.
102. Brighenti F, Casiraghi MC, Canzi E and Ferrari A. Effect of consumption of a ready-to-eat breakfast cereal containing inulin on the intestinal milieu and blood lipids in healthy male volunteers. *Eur J Clin Nutri.*1999. 53(9): 726-733.
103. Trautwein EA, Rieckhoff D and Erbersdobler HF. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. *J Nutri.* 1998, 128(11): 1937-1943.
104. American Diabetes Association. Role of fat replacers in diabetes medical nutrition therapy. *Diabetes Care.*1996, 19(11): 1302-1303.
105. Madej JP, Stefaniak T, Bednarczyk M. Effect of in ovo-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. *Poult Sci.* 2015 Jun1; 94(6):1209-1219.
106. Bermudez-Brito M, Sahasrabudhe NM, Rösch C, Schols HA, Faas MM and Vos P. The impact of dietary fibers on dendritic cell responses in vitro is dependent on the differential effects of the fibers on intestinal epithelial cells. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Apr;59(4):698-710.
107. Mahalakshmi N, Aparnaa R, Kaliraj P. Evaluation of immune response elicited by inulin as an adjuvant with filarial antigens in mice model. *Scand J Immunol.* 2014 Oct;80(4):261-270.
108. Cantero WB, Takahachi NA, Mauro MO, Pesarini JR, Rabacow AP, Antonioli AC, Oliveira RJ. Genomic lesions and colorectal carcinogenesis: the effects of protein-calorie restriction and inulin supplementation on deficiency statuses. *Genet Mol Res.* 2015 Mar 27;14(1):2422-2435.
109. Štofilová J, Szabadosová V, Hrčková G, Salaj R, Bertková I, Hijová E, Strojný L, Bomba A. Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to N,N-dimethylhydrazine. *Int Immunopharmacol.* 2015 Feb;24(2):361-8.

110. Pasqualetti V, Altomare A, Guarino MP, Locato V, Cocca S, Cimini S, Palma R, Alloni R, De Gara L, Cicala M. Antioxidant activity of inulin and its role in the prevention of human colonic muscle cell impairment induced by lipopolysaccharide mucosal exposure. *PLoS One*. 2014, 16;9(5).
111. Gallaher, DD, Stallings WH, Blessing LL, Busta FF and Brady LJ. Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. *J Nutr*. 1996, 126(5):1362-1371.
112. Limburg PJ, Mahoney MR, Ziegler KL, Sontag SJ, Schoen RE, Benya R, Lawson MJ, Weinberg DS, Stoffel E, Chiorean M, Heigh R, Levine J, Della'Zanna G, Rodriguez L, Richmond E, Gostout C, Mandrekar SJ and Smyrk TC. Cancer Prevention Network. Randomized phase II trial of sulindac, atorvastatin, and prebiotic dietary fiber for colorectal cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res*. 2011, 4(2):259-269.
113. Nagahara Y, Nagamori T, Tamegai H, Hitokuwada M, Yoshimi Y, Ikekita M and Shinomiya T. Inulin stimulates phagocytosis of PMA-treated THP-1 macrophages by involvement of PI3-kinases and MAP kinases. *Biofactors*. 2011 Nov-Dec;37(6):447-454.
114. Clark MJ, Robien K and Slavin JL. Effect of prebiotics on biomarkers of colorectal cancer in humans: a systematic review. *Nutr Rev*. 2012 Aug;70(8):436-443.
115. Wu WT, Yang LC and Chen HL. Effects of konjac glucomannan, inulin and cellulose on acute colonic responses to genotoxic azoxymethane. *Food Chem*. 2014 Jul 15;155:304-10.
116. Pool-Zobel BL and Sauer J. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. *J Nutr*. 2007 Nov;137(11Suppl):2580-2584.
117. Ruzsnyak SP, Szent-Gyorgyi A. 1936. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature*. 1936, 138: 2.
118. Ross JA and Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu Rev Nutrition*. 2002, 22:19–34.
119. Montoro P, Braca A, Pizza C and Tommasi N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem*, 2005, 92 (2), 349-355.

120. Mustafa RA, Hamid AA, Mohamed S and Bakar FA. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *J Food Sci.* 2010, 75 (1), 28-35.
121. Chen ZY, Chan PT, Ho KY, Fung KP, Wang J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids.* 1996, 79:157-163.
122. Shi H, Noguchi N and Niki E. Introducing Natural Antioxidants. In: Antioxidants in Food, Practical Applications, Pokorny J (chief ed.), Yanishlieva N, Gordon M, Boca Raton, CRC Press LLC, 2001, 147-164.
123. Rasmussen SE. Flavonoids and Cardiovascular Disease. In: Functional Foods, Cardiovascular Disease and Diabetes, Arnoldi A (chief ed.), Boca Raton, CRC Press, 2004, 82-100.
124. Virgili F, Scaccini C, Packer L, Rimbach G. Nutritional Phenolics and Cardiovascular Disease. In: Phytochemical Functional Foods, Johnson I (chief ed.), Williamson G, Boca Raton, Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2003, 20-47.
125. Serafini M, Villano D, Spera G and Pellegrini N. Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr Cancer.* 2006, 56 (2), 232-240. 6-10.
126. Rossi M, Lugo A, Lagiou P, Zucchetto A, Polesel J, Serraino D, Negri E, Trichopoulos D, La Vecchia C. Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. *Ann Oncol.* 2012 Jun;23(6):1488-93).
127. Dong GC, Chuang PH, Chang KC, Jan PS, Hwang PI, Wu HB, Yi M, Zhou HX and Chen HM. Blocking effect of an immuno-suppressive agent, cynarin, on CD28 of T-cell receptor. *Pharm Res.* 2009, 26(2), 375-381.
128. Díaz-Rubio ME, Pérez-Jiménez J and Saura-Calixto F. Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *Int J Food Sci Nutr.* 2009;60 Suppl 2:23-34.
129. Pérez-Jiménez J, Díaz-Rubio ME and Saura-Calixto F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr. Res Rev.* 2013 Dec;26(2):118-129.

130. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cooper EL and Cossarizza A. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 2011:5913-5956.
131. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cossarizza A. Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin. *Cancers (Basel).* 2010 Jun 14;2(2):1288-311.
132. Lugli E, Ferraresi R, Roat E, Troiano L, Pinti M, Nasi M, Nemes E, Bertoncelli L, Gibellini L, Salomoni P, Cooper EL and Cossarizza A. Quercetin inhibits lymphocyte activation and proliferation without inducing apoptosis in peripheral mononuclear cells. *Leuk Res.* 2009 Jan;33(1):140-50.
133. Gregory M, Divya B, Mary RA, Viji MM, Kalaichelvan VK and Palanivel V. Anti-ulcer activity of *Ficus religiosa* leaf ethanolic extract. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013 Jul;3(7):554-6.
134. Ross JA and Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:19-34.
135. Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M and Noda M. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin. *Microb Pathog.* 2007 May-Jun;42(5-6):215-224.
136. Lee SY, Shin YW and Hahm KB. Phytoceuticals: mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. *J Dig Dis.* 2008 Aug;9(3):129-139.
137. Jihed B, Bhourri W, Ben Sghaier M, Bouhlel I, Kriffi M, Skandrani I, Dijoux FM, Ghedira K and Chekir-Ghedira L. Flavonoids products from *Nitraria retusa* leaves promote lymphoblastoid cells apoptosis. *Nutr Cancer.* 2012;64(7):1095-1102.
138. Cutler GJ, Nettleton JA, Ross JA, Harnack LJ, Jacobs DR Jr, Scrafford CG, Barraj LM, Mink PJ and Robien K. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer.* 2008 Aug 1;123(3):664-671.
139. Chen J, Duan Y, Zhang X, Ye Y, Ge B and Chen J. Genistein induces apoptosis by the inactivation of the IGF-1R/p-Akt signaling pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Funct.* 2015 Mar 11;6(3):995-1000.

140. Wu LC, Lu IW, Chung CF, Wu HY and Liu YT. Antiproliferative mechanisms of quercetin in rat activated hepatic stellate cells. *Food Funct.* 2011 Apr;2(3-4):204-12).
141. Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen CJ, Feng ZZ and Yu DH. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol In Vitro.* 2012 Mar;26(2):221-228.

**EKLER**

**EK 1**



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

**SAYI : 50400462/161  
KONU: Tez çalışması hk.**

**TARİH :09/06/2015**

**T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
MULTİDİSİPLİNER ARAŞTIRMA LABORATUVARI SORUMLUSU'NA,**

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gizem YAMAN'ın "Enginar Bitkisinde Bulunan Cynarin ve İnülin Polifenollerinin Hep3B Hepatoma Hücre Soyunda Apoptotik ve İnflamatuvar Cevaplar Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirebilmesi için müsaadelerinizi saygılarımla rica ederim.

**Prof. Dr. Vildan KARPUZ  
Müdür**



EK 2

**T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'ne,**

09.06.2015

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gizem YAMAN'ın "Enginar Bitkisinde Bulunan Cynarin ve İnülin Polifenollerinin Hep3B Hepatoma Hücre Soyunda Apoptotik ve İnflamatuvar Cevaplar Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasını yürütmek üzere İ.B.Ü. Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan mevcut imkanları kullanması uygundur.

**Doç. Dr. Demet AKIN**

**İstanbul Bilim Üniversitesi**

**Multidisipliner Araştırma Laboratuvar Sorumlusu**

