

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**BOZ ARMUT EKSTRESİNİN SAĞLIKLI VE KANSERLİ İNSAN DERİ HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN DENEYSEL
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinem TAŞ

**Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalı**

HAZİRAN, 2021

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**BOZ ARMUT EKSTRESİNİN SAĞLIKLI VE KANSERLİ İNSAN DERİ
HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN DENEYSEL
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinem TAŞ
(Y1716.050004)

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Beslenme ve Diyetetik Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İdrani KALKAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Erdem TEZCAN

HAZİRAN, 2021

ONAY SAYFASI

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “BOZ ARMUT EKSTRESİNİN SAĞLIKLIL VE KANSERLİ İNSAN DERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN DENEYSEL KARŞILAŞTIRILMASI” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Kaynakça’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (05/06/2021)

Sinem TAŞ

ÖNSÖZ

Çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, her türlü bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım İstanbul Aydın Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölüm Başkanı Doç. Dr. İdrani KALKAN'a,

Tez konumun belirlenmesinde deneyim ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Erdem TEZCAN'a

Bu süreçte sabrını ve sevgisini esirgemeyen, maddi manevi hayatımın her döneminde olduğu gibi yanımda olan sevgili annem, babam ve ablalarımın sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2021

Sinem TAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONUR SÖZÜ	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
A. <i>Pyrus Elaeagnifolia</i> 'nın (Boz Armut) Yetiştği Yerler	3
1. <i>Pyrus Elaeagnifolia</i> 'nın (Boz Armut) Bileşimi.....	4
2. <i>Pyrus elaeagnifolia</i> 'nın (Boz Armut) Sağlık Üzerine Etkileri	4
B. Hücre Kültürü Nedir?	5
1. HUVEC Hücre Hattı ve A375 Hücre Hattı için Uygun Kültür Koşulları	8
C. Serbest Radikallerin Kansere Üzerine Etkisi.....	9
1. Glutatyon Peroksidaz (GSH) Enzimi.....	9
2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi.....	10
III. YÖNTEM.....	11
A. Araştırmanın Zamanı ve Örneklem	11
B. Örneklerin Hazırlanması.....	11
C. Soxhlet Yöntemiyle Soğuk Ekstre Hazırlanması	11
D. Deneyde Kullanılan Hücre Hatları	12
E. MTT Analizi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 13	
F. İstatistiksel Analiz.....	15

IV. BULGULAR	17
A. <i>Pyrus Elaeagnifolia</i> 'nın Etanol Ekstresinin HaCat ve A375 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	17
V. TARTIŞMA	33
VI. ÖNERİLER	37
VII. KAYNAKÇA	38
ÖZGEÇMİŞ	45

KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
DNA	: Deoksiribonükleikasit
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Glutasyon Disülfit
MnSOD	: Mangan Süperoksit Dismutaz
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
RNA	: Ribonükleikasit
Se-Gpx	: Selenyuma Bağlı Glutasyon Peroksidaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
UV	: Ultraviyole

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. A375 ve HaCaT Hücre Hatları Üzerinde Uygulanan Farklı Dozların % Hücre Canlılık Değerleri	17
Çizelge 2. HaCaT Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan MTT Sonucu Elde Edilen % Hücre Canlılık Grafiği. Deney 3 Tekrar Olarak Yapılmıştır.	20
Çizelge 3. HaCaT Hücre Hattı ve A375 Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan MTT Sonucu Elde Edilen % Hücre Canlılık Grafiği.....	21

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Soxhlet Düzeneği	12
Şekil 2. Sitotoksite Analizleri	14
Şekil 3. MTT Testinde HUVEC ve A375 Hücre Hatlarının Renk Değişimi.....	18
Şekil 4. A375 Hücre Serisi ile HaCat Hücre Serisinin Doz-Etki Grafiklerinin Birlikte Görünümü	27
Şekil 5. HaCat Hücre Serisinin Doz-Yanıt Grafiği (Sağda) ve Buna Göre Hesaplanmış ve Tablo Halinde Çıkarılmış IC ₅₀ Değeri (Solda, Kırmızı Yazılı)	28
Şekil 6. A375 Hücre Serisinin Doz-Etki Grafiği (Sağda) Ve Buna Göre Hesaplanmış ve Tablo Halinde Çıkarılmış IC ₅₀ Değeri (Solda, Kırmızı Yazılı)	28
Şekil 7. SPSS’de Üç Tekrardan Elde Edilen Verilerin Normal Dağılım Testi Sonuçları	29
Şekil 8. SPSS’de Üç Tekrardan Elde Edilen Verilerin Ortalamalarından Elde Edilen İki Hücre Serisine Ait IC ₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması	30

BOZ ARMUT EKSTRESİNİN SAĞLIKLI VE KANSERLİ İNSAN DERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN DENEYSEL KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Boz armut (*Pyrus elaeagnifolia*) iç anadolu bölgesinde yetişen endemik bir armut çeşidi olup kendisine ait özel aroma ve lezzetiyle bilinmekte, ayrıca halk arasında sağlık üzerinde de olumlu etkileri olduğuna inanılmaktadır. Ancak, bu meyvenin biyo-aktif bileşenleri konusunda herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, biyoaktif bileşenlerinin anti-kanserojen özelliklerini araştırmak adına, kurutulmuş boz armutun etanol ekstresinin sağlıklı HaCat ve kanserli A375 deri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin analiz edilmesi, A375 hücre hattında antikarsinojenik etkisinin arttırılması ve kullanım alanları ile ilgili ilerki çalışmalara kaynak oluşturmaktır.

Bu araştırma Şubat-Haziran 2019 döneminde İstanbul Aydın Üniversitesi'nin Moleküler Biyoloji Laboratuvarında kontrollü deneylerle yapılmıştır. Kurutulmuş boz armutun farklı dozajlardaki ekstralarının sağlıklı (HaCat) ve kanserli insan deri hücre hattı (A375) üzerindeki sitotoksik etkisine bakılmıştır.

Kurutulmuş boz armut ekstresi, soxhlet yöntemi kullanılarak soğuk etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen kurutulmuş boz armut ekstresi HaCat ve A375 hücre kültürlerinin analizinde, hücre proliferasyon testlerinde yaygınca kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür) yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kurutulmuş boz armut ekstresinin başlangıç dozu 25 µg/µL olup 1:8 oranında seyreltilen ekstrede HaCat hücre canlılığın yüksek, A375 hücre canlılığının azaldığı görülmüştür.

Ancak, araştırmanın yapıldığı ilkbahar mevsiminde taze meyve elde edilemediğinden kurutulmuş örneklerle çalışılmıştır. Bu çalışmanın taze boz armut üzerinde tekrarlanıp antikanser özelliklerinin incelenmesinde fayda görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Boz armut, *Pyrus elaeagnifolia*, Anti-kanserojen, İnsan deri hücre hatları, HaCat, A375, Sitotoksik etki.

EXPERIMENTAL COMPARISON OF CYTOTOXIC EFFECT OF BOZ PEAR EXTRACT ON HEALTHY AND CANCER HUMAN CELL LINES

ABSTRACT

Boz pear (*Pyrus elaeagnifolia*) is an endemic pear variety that grows in the Central Anatolia region and is known for its special aroma and taste, and it is also believed to have positive effects on health among the people. However, no scientific study has been encountered on the bio-active components of this fruit.

In order to investigate the anti-carcinogenic properties of boz pear's bioactive components, the aim of this study was to analyze the cytotoxic effect of dried boz pear ethanol extract on healthy HaCat and Carcinogenic A375 human skin cell lines, increase anticarcinogenic effect on A375 cell line and to provide a base for future studies on areas of usage.

The controlled experiments within the scope of this study was conducted in the Molecular Biology Laboratory of Istanbul Aydın University between February-June 2019. The cytotoxic effect of different dose of dried grey pear extracts on healthy (HaCat) and cancerous human skin cell line (A375) was investigated.

Dried boz pear extract was obtained by cold ethanol extraction by means of Soxhlet method. The obtained dried gray pear extraction, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium-bromide) test, which is widely used in cell proliferation tests, was used in HaCat and A375 cell cultures. According to the results obtained, the initial dose of boz pear extract was 25 µg / µL and using the dilution factor of 1:8, healthy HaCat cell viability was found to be high whereas carcinogenic A375 cell viability was found to be reduced substantially.

However, fresh fruit could not be obtained during the season, when the research was conducted. Therefore, the study was conducted with dried boz pear samples.

It would be beneficial to repeat the study on fresh boz pear samples in order to examine the anticancer properties

Keywords: Boz pear, *Pyrus elaeagnifolia*, Anti-carcinogenic, Human skin cell lines, HaCat, A375, Cytotoxic effect.

I. GİRİŞ

Türkiye’de iç Anadolu’da yetişen sebze, meyve ve bitkilerin arasında bazıları fitokimyasal özellikleri bakımından zengin olup sağlık üzerine olumlu etkileri vardır. Bunlardan biri de Sivas ve civarında yetişen yabani bir meyve olan boz armuttur.

İç Anadolu’da (Sivas ve civarında) “ahlat” veya “yabani armut” olarak da bilinen boz armutlar sonbahar döneminde yetişmekte olup diğer zamanlarda kurutulmuş olarak bulunmaktadır. Bazı ülkelerde olduğu gibi kuru meyveler Türkiye’de de pestil olarak veya kahve benzeri kavrulmuş toz olarak komposto yapımında kullanılır. Kurutulmuş boz armut bu yörelerdeki halk tarafından genelde şurup ve turşu olarak tüketilmektedir (Cansaran ve ark., 2007; Yerlitürk ve ark., 2008). Ayrıca komposto yapımında ve toz haline getirilip un ile karıştırılarak hamur işlerinde ve daha farklı şekilde de kullanılmaktadır. Gıda endüstrisindeki son hızlı gelişmeler, ülkenin kentsel kesimlerinde yaşayan ve yöresel lezzetlerden uzaklaşan tüketicileri eski lezzetleri, doğal olarak yetişen meyveleri, yoğun aromaları ve hoş tatları aramaya yönlendirmiştir (Ercişli ve Orhan, 2007; Yılmaz ve ark., 2014; Yıldız ve diğerleri, 2004 ; Jurikova ve diğerleri, 2012 ; Ercişli ve diğerleri, 2007; Şengül ve diğerleri, 2018). Doğal ürünler için bu tür eğilimler de var. Alternatif şifalı bitkiler ve yabani türler için talep artmıştır. Bu nedenle, doğal olarak yetişen bu yabani türlerin biyokimyasal bileşimleri ve sağlık etkileri, insanların sağlığı üzerindeki olumlu etkileri bilirse doğru bir şekilde tüketilebilir. Örneğin, olgunlaşmış yabani armutlar, olgunlaşmış meyvelerin yüksek su tutma kapasitesine sahip olması nedeniyle tüketicilerde konstipasyona sebep olur. Bu nedenle, yabani armutlar çoğu zaman yerel halk tarafından ishal ile mücadele etmek için kullanılır (Baytop, 2004).

Günümüzde kullanılan gıda takviyelerindeki antioksidanların, kanserojenik toksik mekanizmaya sahip olduğu bilindiği için, doğal antioksidan kaynakları arayışı başlamıştır. Antioksidan özelliğe sahip olan fenolik bileşikler, meyvelerin kendine özgü renk, aroma ve tat sağlamasında rol oynayan ve meyve kalitesini arttıran bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde hayati fonksiyonların sürdürülmesinde rol almadığı için sekonder metabolit olarak da bilinir.

Bu bileşikler bitkilerde yaralanma, enfeksiyon, UV radyasyon gibi stres koşullarında koruyucu olarak sentezlenir. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi olduğundan diyabet, kanser, kalp hastalıkları ve katarakt gibi hastalıklardan korunmada etkilidir (Justesen ve ark., 1998).

Bu çalışmanın amacı, biyoaktif bileşenlerinin anti-kanserojen özelliklerini araştırmak adına, kurutulmuş boz armutun etanol ekstresinin sağlıklı HaCat ve kanserli A375 deri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin analiz edilmesi, A375 hücre hattında antikarsinojenik etkisinin artırılması ve kullanım alanları ile ilgili ilerki çalışmalara kaynak oluşturmaktır.

II. GENEL BİLGİLER

A. *Pyrus Elaeagnifolia*'nın (Boz Armut) Yetiştirildiği Yerler

Boz armut (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) Anadolu'da yetişen endemik bir armut çeşididir. 'Ahlat' olarak da isimlendirilen bu armut türü kuraklığa ve soğuğa karşı yüksek direnç gösterir (Ercişli, 2007). Meyveler yoğun bir tat ve aromaya sahiptir. Bu nedenle, bir köşedeki açık bardaklara yerleştirildiğinde, tüm evdeki insanlar üzerinde olumlu etkileri olan rahatlatıcı bir koku yayarlar. Kuraklık direncinin yüksek olması nedeniyle, türler kurak bölgelerde yeniden yetiştirmek için peyzaj yönetiminde kullanılabilir (Buttner, 2001).

Biyoaktif bileşikleriyle ilgili bilgiler, tüketicilerin onu doğrudan gıda maddesi olarak kullanıp kullanamayacaklarını da bilmelerini sağlayacaktır (Yılmaz ve ark., 2014; Jurikova ve ark., 2012). Bitki ıslahında modern hedeflere, genetik kaynaklar arasındaki özelliklerin değerlendirilmesiyle ulaşılabilir. Moleküler markörler zaten kullanılmaktadır ancak bu yöntemler pahalıdır ve karmaşık laboratuvar tesislerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yabani armutta, yeterli çeşitlilik ve kolay uygulama nedeniyle, sınıflandırma için morfolojik ve biyokimyasal indeksler uygun olabilir. Morfolojik ve biyokimyasal karakterler, germ plazmasını tanımlamak ve sınıflandırmak için kullanılan ilk tercihtir. Ek olarak, morfolojik özellikler bazen korelasyon gösterir veya hastalığa duyarlılık gibi değerlendirilmesi zor olan özelliklerle ilişkilendirilir.

Bell ve ark. (1996) ve Dirr (1998)'in bildirdiklerine göre; Ahlat'ın da içerisinde yer aldığı sınıflandırmada, meyvelerinin hayvanlar ile insanlar için besin kaynağı oluşturması, çağdaş ve alternatif tıp tedavilerinde kullanılması, yaygın kök sistemleri nedeniyle erozyon kontrolü çalışmalarında kullanılması, hastalık ve haşerelere karşı güçlü olmaları, değişik taç formları sebebiyle peyzaj düzenleme çalışmalarında estetik değer katmaları ve değişik iklim ve toprak özelliklerine biyolojik uyum sağlama yeteneklerinin yüksek olması, bu çeşitlerinin önemini bir kat daha artırmaktadır (Gültekin ve ark., 2006).

Pyrus'lar Avrupa'da doğal bir şekilde yetiştirilmektedir. 20 çeşit türü vardır. Bunlardan birkaçı önemli yemiş ağaçlarıdır. Türkiye'nin, Orta Anadolu stepleri dahil, hemen her tarafında yabancı olarak yetişen çeşitleri vardır. Başlıcaları; *Pyrus elaeagnifolia* Pall. (Boz Armut), *Pyrus communis* L. (Yabancı Armut), *Pyrus amygdaliformis* Vill., *Pyrus anatolica* Browicz, *Pyrus syriaca* Boiss., *Pyrus salicifolia* Pall.'dır (Kayacık, 1982).

Anadolu yöresinde geniş bir yelpazede yetiştirilen yabancı meyve türlerinden bir tanesi boz armuttur. Latince adı *Pyrus elaeagnifolia* olan boz armut diğer bölgelerde ahlat, çördük, çöğür, argun, alfat, çövür, dığdığı, dızdığı, haliç, kerte, kohoz, gelinboğan, çakal armudu, şekok, dağ armudu gibi isimlere de sahiptir yılm. Yabancı armudun ağaç boyu 10 metreye kadar uzanmaktadır.

Susuzluğa ve hava kirliliğine dayanıklı bir tür olan *P. elaeagnifolia* (Boz Armut), orman açıklıklarında, kurak yerlerde, bozkırlarda ve özellikle ormandan açılmış tarla içlerinde birçok alıç (*Crataegus*) cinsleriyle birlikte yaygın olarak bulunur. Genellikle ilkbahar aylarında çiçek açıp meyvesi Eylül ayında tam olgunlaşır, kahverengi rengine dönüşür ve o zaman yenir (Kartal, 2013).

1. *Pyrus Elaeagnifolia*'nın (Boz Armut) Bileşimi

P. elaeagnifolia içeriğinde B vitamini, C vitamini, karoten, pektin, organik asitler, şekerler ve tanen bulunmaktadır (Yılmaz vd., 2014; Şengül vd., 2018). Meyvelerin biyokimyasal içeriği buldukları iklim ve toprak şartlarından etkilenmektedir. Bu meyvede fenolik madde, flavanoid madde, askorbik asit, glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri bulunmaktadır.

2. *Pyrus elaeagnifolia*'nın (Boz Armut) Sağlık Üzerine Etkileri

Meyvenin çiçeği ilkbahar aylarında açmakta ve sonbahar aylarında meyvenin hasadı yapılmaktadır. Ağaç kökleri iyi gelişmiş olduğu için erozyon kontrollerinde kullanılan ağaçlardır. Ham olarak elde edilen boz armutlar sert ve genzi yakan, acı bir tada sahiptir. Uygun koşullarda uzun süre saklanabilir. Oda sıcaklığında 2 hafta bekletilen meyveler yumuşamaya başlar. Olgunlaşmış meyveler kumludur. Bölgede *P. elaeagnifolia*'nın pekmezi, kurusu, marmelatı, reçeli, sirkesi ve turşusu da yapılarak kış boyunca tüketilmektedir. Bu meyvenin çayı idrar söktürücü olarak da kullanılmaktadır (Çakılcıoğlu ve ark., 2010). Toplumda ishale, diş eti hastalıklarına,

astıma, rahim iltihabına, böcek sokmalarına, böbrek hastalıklarına, kalp hastalıklarına iyi geldiği ve göz hastalıklarını iyileştirici olduğu bilinmektedir (Güdücü, 2014; Keçeci, 2017). Bu meyve türüyle ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir (Güdücü, 2014; Keçeci, 2017). *P.elaeagnifolia*'nın meyvesinin ve yapraklarının faydası çoktur. *P.elaeagnifolia* yoğurt ile karıştırılıp aç karnına yendiğinde kalp ve damar hastalıklarına iyi geldiği bilinmektedir. *P.elaeagnifolia*'nın meyvesi haşlandığında veya taze olarak yenildiğinde ishale iyi geldiği bilinmektedir. Ancak fazla tüketilirse kabızlık yapabilmektedir.

P.elaeagnifolia'nın meyvesi düzenli kullanıldığında kalbi koruyucu özelliği artmaktadır. Meyvesinin suyu kan sulandırma özelliğine sahip olduğu için kan dolaşımını kolaylaştırarak kanı temizler. Bu nedenle göz damarları ve vücudumuzdaki damarlar üzerinde etkisi vardır.

Kanser hastalarında kanserin ortaya çıkışı, gelişimi ve sonucu, hastadan hastaya göre değişmektedir. Kanser hücreleri kontrolsüz ve zamansız biçimde çoğalıp metastaz yapan bir hastalıktır (Merlo ve ark., 2006). Kanser hücreleri mutasyon geçirerek anormal bir şekilde çoğalır (Nowell, 1976). Son yıllarda yapılan araştırmalar, düzenli meyve ve sebze tüketilmesinin bazı kanser çeşitlerinin ortaya çıkma olasılığını düşürdüğünü göstermiştir.

Günümüzde bitki ekstralarının antikanser aktivitelerinin araştırılması konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Stagos ve ark.,2012). Sarımsakta bulunan diallil sülfid, S-allil sistein ve alisin gibi fitokimyasallar kanser önleyici özelliğe sahip olduğu gibi kanser tedavisi gören hastalara radyoaktif dalgalara ve ilacın olumsuz etkilerine karşı koruyucu özelliğe sahiptirler. Hastalık esnasında destek amaçlı kullanılmaktadır (Yıldıran-Yılmaz, 2008).

B. Hücre Kültürü Nedir?

Hücre kültürü; bir organizmanın canlı olarak bir veya birden fazla hücre topluluğunun dokuda yer aldığı bölgeden farklı yöntemlerle alınıp *in vitro* olarak canlı tutulması ve üreme kabiliyetine sahip olanların çoğaltılmasıdır. Harrison tarafından, hayvan membranlarının canlı vücut dışında incelenebilmesi için hücre kültürü bulunmuştur. Harrison'ın hücreleri vücut dışında kültürleyerek inceleme yapması, vücudun iç ortamdaki dengesini sağlama sebebiyle vücudun tamamında meydana gelecek değişikliklere ve bu değişikliklerin deney üzerinde olumsuz etkiye

sebepler olmasının önüne geçmiştir (Harrison, 1907). Hücre kültürü üzerine yapılan çalışmaların zamanla artmasıyla, hücre içerisinde gerçekleşen aktiviteleri, hücrenin bulunduğu ortamı, hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerini, buna karşılık oluşan reaksiyonları membran boyutunda araştırma ve saptama olanağı olmuştur.

Hücrenin vücut dışında canlılığını sürdürebilmesi için yararlarıyla beraber, olumsuz yönleri de vardır. *In vitro* çalışmalarında hücre hatları üzerindeki uygun şartların en önemlisi osmotik basınç, sıcaklık, pH, O₂ ve CO₂ konsantrasyonu, fizyokimyasal şartların kültür ortamında kontrolünün sağlanabilmesi ve buna bağlı olarak fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesidir. Bu şartların sağlanabilmesi için besiyerlerinde çeşitli maddelere gereksinim duyulmaktadır. Hormon, serum ve aminoasit gibi çeşitli maddelerin, hücre tipinin ihtiyacına göre gerekli miktarlarda kültür ortamına verilmesi oldukça önemlidir (Harrison, 1907). Hücre kültürünün bir diğer önemli avantajı, araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak sağlamasıdır. Dokular çok çeşitli hücre tiplerini içerebilmektedir. Dokudan elde edilen hücrelerden, zaman içerisinde tekrarlanan pasajlama işlemleri ile istenilen asıl homojen hücre elde edilebilmektedir. Hedeflenen hücreye ulaşıldıktan sonra, hücreler başka araştırmalar için ve tekrarlı deneylerde kullanılmak üzere uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmektedir. Hücrelerin kültürlenmesinin oldukça önemli olan bu avantajlarının yanı sıra, ne yazık ki bazı dezavantajları da mevcuttur. Kültür çalışmaları sırasında meydana gelen kontaminasyon, çalışma verimliliğinde azalmaya neden olan en önemli problemdir. Kültür ortamında bakteri ve mantar bulunması, hücrelerin gelişmesini ve çoğalmasını oldukça yavaşlatmaktadır. Bu problemi en aza indirmek için çalışmaların, uygun steril koşullar altında gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bir diğer önemli problem ise, hücrelerin uzun süre pasajlanması durumunda, hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve heterojenite oranları artmaktadır. Bu nedenle, çalışmalar sırasında ilk birkaç kuşak hücrelerinin kullanılması oldukça önemlidir (Harrison, 1907).

Hücrelerin *in vitro* çalışma koşulları altında yaşamlarını devam ettirebilmeleri için normal fizyolojik çevrelerinin sağlanması gerekmektedir. İdeal kültür ortamının sağlanmasında besiyerleri önemlidir. Hücre kültür besiyerleri, hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan ortam koşullarını sağlamak üzere hazırlanmış besleyici solüsyonlardır (Butler ve ark., 1994). Besiyeri içeriğindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlar hücrenin gelişimini

desteklerken, bazı iyonlar da hücrelerin çoğalabilmesi için uygun osmolarite ve pH'ın sağlanmasında önemlidir. Besiyeri seçimi sırasında farklı hücrelerin farklı besin ihtiyaçları olacağı mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple tek bir hücre hattının gelişmesine yönelik bir çalışma yapılacaksa bu özellikleri taşıyan besiyeri seçilmelidir (Yaylalı, 2007).

Harry Eagle tarafından 1955'de hücre kültür ortamı olarak Eagle'ın Temel Besiyeri (Eagle's Minimal Essential Medium, EMEM) geliştirilmiştir. Sığır, insan veya embriyo ekstreleri ile desteklenerek hazırlanan ve ticari olarak kullanılan ilk besiyeridir (Pombinho ve ark., 2004). Bu besiyerinin içeriğinde aminoasitler, tuzlar (CaCl₂, KCl, MgSO₄, NaCl ve monosodyum fosfat), glikoz ve vitaminler (folik asit, nikotinamid, riboflavin, B12) bulunmaktadır. Günümüzde tek bir hücre hattının geliştirilmesine yönelik en çok kullanılan Eagle'ın Temel Besiyeri (1959) ve Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle Besiyeri'dir (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM). Dulbecco's Modified Eagle's Medium, EMEM'in bir çeşididir ve orjinal formundan dört kat daha fazla vitamin ve aminoasit ile iki kat daha fazla glikoz içermektedir. Ayrıca, demir ve fenol kırmızısının da besiyeridir (Pombinho ve ark., 2004). Büyük miktarlarda protein ve nükleik asit sentezinin gerçekleştiği ve enerji ihtiyacının en fazla olduğu dönemde, hücrelerin gelişimine destek amacıyla glikoz yanında glutamin de gerekmektedir. Zira hücreler nükleotid, aminoasit, amino şeker ve vitamin gibi bazı moleküllerin sentezi için azota ihtiyaç duymaktadır. Glutamin ise bu moleküllerin ve diğer azot içeren bileşiklerin sentezinde azot kaynağı olarak rol oynamaktadır. Hızlı bölünen hücrelerde, kültür ortamında glikoz miktarı azalmakta ve enerji ihtiyacı artmaktadır. Bu durumda daha fazla enerji elde etmek için aminoasitler metabolize edilmektedir. Glutamin bu enerjinin elde edilmesinde en çok kullanılan aminoasitlerden birisidir. Hücre kültür ortamının sağlanmasında kullanılan dengeli tuz çözeltisi (Balanced Salt Solution, BSS), fizyolojik pH'ı ve tuz konsantrasyonunu sağlayan bir solüsyondur. Dengeli tuz çözeltisi çoğunlukla sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve klor içermektedir. Bu çözelti dokuları ve hücreleri yıkamak için kullanılmakla birlikte fizyolojik pH'ı ve osmotik basıncı sağlamaktadır. Bazı durumlarda bu çözeltiliye enerji kaynağı olarak glikoz eklenmekte ve pH indikatörü olarak da fenol kırmızısı kullanılmaktadır (Jakoby ve ark., 1979). Dengeli tuz çözeltisini, mikrobiyolog John H. Hanks 1940 yılında formüle ederek, bikarbonat iyonlarınca zengin Hanks'in dengeli tuz

çözeltisini (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS) kullanmıştır. Bu solüsyon aynı zamanda hücrelerin gelişimi için bir tamponlama sistemi olarak hücre kültürü ortamını ve uygun fizyolojik pH'ı (7.0-7.4) sağlamaktadır (Gilbert ve ark., 2006). Kültür çalışmalarında fizyolojik pH stabilitesini sağlamak üzere HEPES kullanımı oldukça yaygındır. Özellikle protein çözeltilerin dondurulmasında kullanılır. Birçok tamponda gözlenen donma sonucundaki asitlik artışı, HEPES tamponu varlığında ihmal edilebilir düzeye düşmektedir. Enzim ve koenzimleri denatürasyon ve inaktivasyondan korumaktadır. Bununla birlikte, belirli hücre hatlarının gelişimini teşvik ettiği bildirilmektedir (Oktar ve ark., 2010). Kültür ortamında meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemek amacıyla antibiyotikler kullanılmaktadır. Bakterilerin gram +/- özelliklerine bağlı olarak farklı etki mekanizmalarına sahip antibiyotikler tercih edilebilmektedir. Dokudan ,ayırıştırma ya spontan migrasyon ya mekanik yöntemler ya da enzimatik yöntemlerle olabilir. Hücre kültürünün sağladığı avantajlar arasında, incelenecek hücre ve/veya maddelerin etkilenebilecekleri tüm etkenlerden bağımsız olarak incelenebilmesi, ekonomik ve kolay olması, çevre şartlarının kontrol edilebilmesi sayılabilir. Kullanıldığı alanlardan bazıları arasında aşı, monoklonal antikor, enzim ve hormon üretimi, DNA ve RNA replikasyon araştırması, protein sentezi ve enerji metabolizması araştırmaları, ilaç etkileri, sinyal iletim mekanizmaları, hücre haberleşmesi, embriyonik ve kök hücre araştırmaları, sitogenetik analiz ve genetik manipülasyonlar vardır (Can ve ark., 1997).

1. HUVEC Hücre Hattı ve A375 Hücre Hattı için Uygun Kültür Koşulları

Endotel hücreleri organizmaların birden fazla yerinde bulunarak kan damarlarından alınabilir. Örneğin; beyin mikrovasküler damarlarından alınan endotel hücresi, insan göbek kordonu endotel hücresi (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC), aort endotel hücresi, glomerüler endotel hücreleri ve dermal mikrovasküler endotel hücreleri, miyometriyum mikrovasküler endotel hücrelerine dönüştürülebilir (Gargett, 2016).

HUVEC, in vivo endotel tabakasına oldukça uyumlu bir hücredir. Endotel hücrelerin özelliklerine sahip olmasıyla birlikte, doğum sonrası vücuttan atılan bir dokudan alınabildiği için kolay bulunur ve ucuzdur. HUVEC hücresinin büyük ve geniş bir yüzeye sahip olması sayesinde dallanma yapmayan, üzerinde çalışılması kolay olan bir hücredir (Yusufhan Yazır ve ark.,2012).

C. Serbest Radikallerin Kansere Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin, karsinogenez hücreler için yapılan çalışmalarda etkilerini gösterebilmeleri için vücutta bulunan enzimleri kullanarak metabolize edilmeleri vurgulanmaktadır.

1. Glutasyon Peroksidaz (GSH) Enzimi

Glutasyon Peroksidaz'ın çalışmasında en önemli nokta selenyum olmasıdır; selenyum olmadığında bu enzimin aktivitesi düşüktür (Peng ve ark., 2014; Pisoschi ve ark., 2015).

Serumdaki selenyum konsantrasyonuna bağlı olarak GSH, bağışıklık hücrelerinde oksidatif stres ile redoks tepkimelerini kontrol ederek optimal işleyişte önemli rol oynar (Arjmandi ve ark., 2016).

GSH'ın, hücrelerde stoplazmada bulunarak H₂O₂'den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreyi koruyucu özelliği vardır. Bu sayede H₂O₂'den OH grubunun oluşmasını engeller. GSH'nin dört proteinden oluşan alt birimi bulunmaktadır. Her alt birimde selenyum vardır (Sen ve ark., 2011).

Elektron kaynağı, glutasyonu kullanarak H₂O₂'yi ve organik hidroperoksitleri metabolizleyen enzimdir. GSH enzimi iki ana tipte incelenmiştir. Bu tiplerden biri aktif bölgesinde selenyumca zengin olan selenyuma bağlı GSH (Se-GpX)'dir.

Se-Gpx, H₂O₂ ve organik hiperoksitlere etki göstermektedir. Selenyuma bağımlı olmayan glutasyon peroksidaz (GSH) ise organik hiperoksitleri metabolizler (Cnubben ve ark., 2001).

Bu reaksiyonlar 1 numaralı denklemden gibi GSH hidrojen açığını karşıladığı için H₂O₂ ve hidroperoksitler indirgenir ve GSH okside olur. Okside olan glutasyon aslında glutasyon disülfittir (GSSG). Glutasyon redüktaz (GR) enzimi varlığında okside olan glutasyon redükte glutasyon formuna geri indirgenir. Bu reaksiyon esnasında GR, elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır (Reiter ve ark., 1995).



2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi

Antioksidanların ilk görevi süperoksit radikallerini hidrojen perokside çevirmesidir. Süperoksit dismutaz (SOD, E.C.1.15.1.1.) ilk olarak 1969'da McCord ve Fridovich tarafından bulunup, vücutta görevli olan en önemli antioksidan enzimi özelliğini taşımaktadır (Barra ve ark.,1984).

SOD enzimi hem antioksidan (süperoksit anyonunu uzaklaştıran), hem de pro-oksidan (hidrojen peroksite enzimatik oluşumunu gerçekleştiren) işlevine sahiptir (Oberley, 2002).

SOD , süperoksidin hidrojen peroksit'e dismutasyonunu katalizleyen metaloenzimdir (McCord ve Fridovich, 1969). Süperoksit anyonu nitrik oksitle reaksiyona girer ve normal durumlarda indirekt olup vasküler basıncı dengelemekte büyük rol oynar; inflamasyon durumunda metabolit olarak toksik nitrojen oluşmasında görev alır. SOD hücre içi ve hücre dışı O_2 , H_2O_2 ve nitrojen metabolitlerini düzenler (Fattman ve ark., 2003). Oksijen ihtiyacı fazla olan dokularda SOD aktivitesi fazla, buna bağlı olarak hücre dışı sıvılarda SOD aktivitesi düşüktür (Uysal, 2006).

Ökaryotik hücrelerde üç çeşit SOD enzimi vardır; hücre sitozolünde olan bakır ve çinko içeren homodimer, bakır-çinko süperoksit dismutaz (CuZnSOD, SOD1), mitokondride var olan mangan içeren homotetramer mangan süperoksit dismutaz (MnSOD, SOD2); hücre dışında bulunan, bakır ve çinko içeren homotetramer ekstrasellüler süperoksit dismutaz (ECSOD, SOD3) (Zelko ve ark., 2002).

MnSOD, oluşan oksidatif strese karşı direnç göstererek hücrenin yaşamasında önemli rol oynar (Epperly ve ark., 2002). MnSOD seviyesinde olan değişiklikler birçok hastalıkla ilişkilidir. Parkinson hastalığı (Kushleika ve ark., 1996), Alzheimer hastalığı (Marcus ve ark., 2006), yaşlanma gibi (Wallace, 2001) hastalıklarda koruyucu özelliği vardır.

MnSOD'ın hücrelerde yüksek seviyede olması prostat kanseri, meme kanseri ve insan glioma hücrelerinde (Zhong ve ark., 1999) tümör oluşumuna engel olmaktadır. Yani MnSOD'ın tümör oluşumunda baskılayıcı olduğu düşünülmektedir (Li ve ark., 1995; Oberley ve ark., 2005).

III. YÖNTEM

A. Araştırmanın Zamanı ve Örneklem

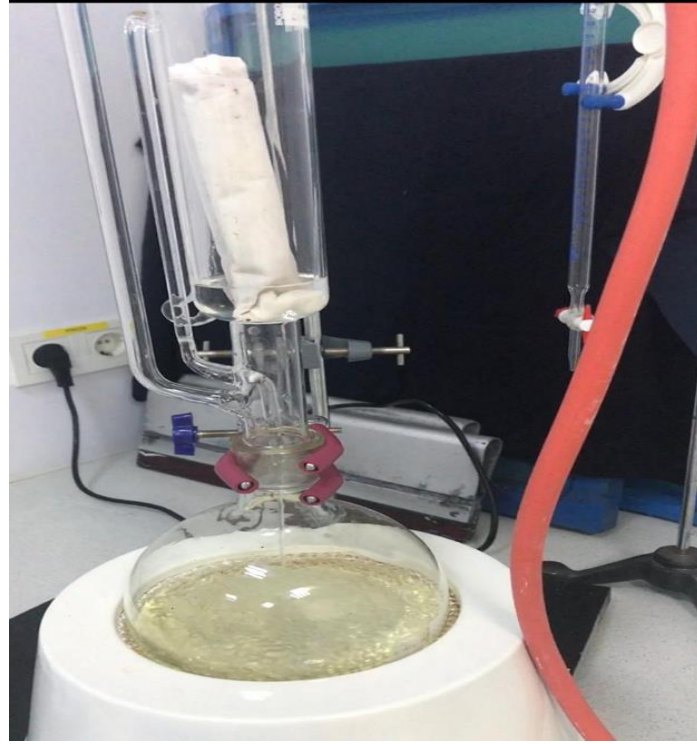
Bu araştırma, Şubat-Haziran 2019 döneminde İstanbul Aydın Üniversitesi'nin Moleküler Biyoloji Laboratuvarında kontrollü deneylerle yapıldı. Kurutulmuş boz armuttan elde edilen farklı dozajlardaki ekstrelerin sağlıklı (HaCat) ve kanserli insan deri hücre hattı (A375) üzerinde sitotoksik etkisine bakıldı.

B. Örneklerin Hazırlanması

Kurutulmuş boz armut Sivas'ta bulunan bir semt pazarından 3 ayrı satıcıdan 1'er kilo alınarak karıştırıldı. Alınan kurutulmuş boz armutlarının 500 gramı, laboratuvar ortamında meyvenin nem oranını düşürmek için Nuve markalı etüvde 45° derecede 2 gün kurutulmaya bırakıldı. Etüvden alınan boz armutlar kahve öğütme makinasında (Arçelik K 3104 Kahve ve Baharat Öğütücü) öğütüldü. Elde edilen 17 gramlık kurutulmuş boz armut tozlarından ekstre hazırlandı.

C. Soxhlet Yöntemiyle Soğuk Ekstre Hazırlanması

Soxhlet yöntemi bilinen en eski yöntemlerdendir. Günümüzde sık kullanılmaya devam eden sistemdir. Soxhlet sistemi bir adet solvent şişesi, orta bölmede sıvı akışı için bir sifon, soğutulmuş bir yoğuşturucu/kondansatör ve bir ısıtma sisteminden oluşmaktadır. Bu yöntemde ince öğütülmüş **numune**, Soxhlet sistemindeki güçlü bir filtre kağıdına yerleştirilir. Solvent altındaki solvent şişesi içerisine yerleştirilir. Kaynama sıcaklığı üzerinde ısıtılan solventten gelen buhar, yoğunlaşma olan kondansatöre göre ilerler, yoğunlaşır ve örneğin üzerine damlar. Üzerinde çalışılan numunenin önce ıslatır, sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşınca, solvent numune bölmesini boşaltarak solvent şişesine doğru damlama gerçekleşir .



Şekil 1. Soxhlet Düzeneği

Bu yöntemle etanol ekstresi hazırlanmıştır. Sistemin balon kısmına 500 mL etanol konulmuştur. Soxhlet'in kartuş kısmına 20 g kurutulmuş boz armut konulmuştur. Bu işlem en az 3 saat olmak üzere Soxhlet aparatında renklenme bitene kadar sürdürülmüştür. İşlem bitince elde edilen etanol ekstresi, damıtma yapılarak konsantre hale getirilmiştir. Böylece çözeltinin hacmi 50 mL'ye düşürülerek bir kaba konmuştur.

D. Deneyde Kullanılan Hücre Hatları

Deneyde malign hücre hattı olan A375 (insan, kötü huylu melanom) ve sağlıklı hücre hattı olan HaCaT (insan, cilt epiteli) olmak üzere 2 farklı hücre hattı Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonundan (ATCC, Mannassas, VA) elde edildi.

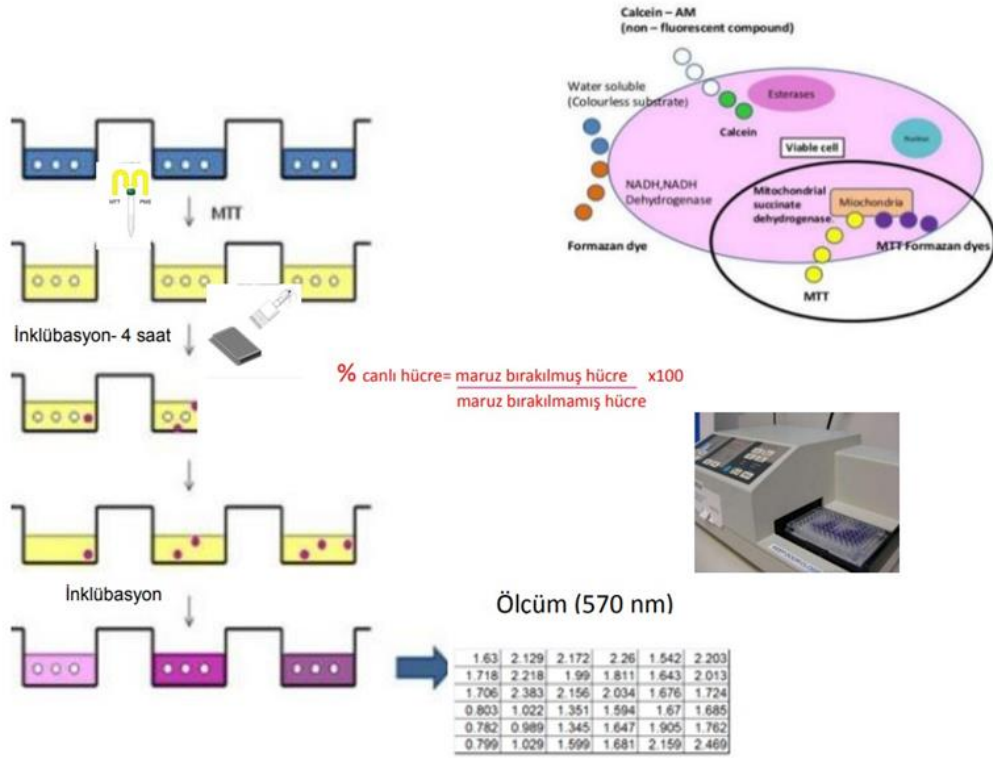
Hücre hatları boz armut ekstresinde kullanılıncaya kadar 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inübasyon yapıldı.

E. MTT Analizi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

Hücre canlılık oranlarını belirlemeye yönelik kalorimetrik bir yöntemdir. Hücrelerde sitotoksik aktivite testi, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazları tarafından tetrazolium tuzlarının 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide bir mavi formazana indirgenmesidir. Oluşan mavi formazan miktarına bağlı absorbans değerleri mikropilaya okuyucu spektrofotometrede ölçüldü. Hücre canlılığı, % hücre canlılığı olarak hesaplandı.

MTT protokolü

1. Hücreleri ve test bileşiklerini 96 kuyucuklu kaba her birinde 100 µl/kuyu olacak şekilde ekerek hazırlanır.
2. Hedeflenen ilaca maruziyet süresince (24 /48 veya 72 sa) inkübasyona bırakılır.
3. Her bir kuyuya, final konsantrasyon 0.45mg/ml ye ulaşacak şekilde 10 µl MTT solüsyonu eklenir.
4. 4 saat boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilir.
5. Formazan kristallerini çözündürmesi amacıyla herkuyuya 100 µl “çözme solüsyonu” eklenir. Bu “çözme solüsyonu”; %40 dimetilformamid (DMF) nin %2 glacial asetik asit içinde çözülerek %16 sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenmiş bir karışımdır.
6. Tam çözünme olduğundan emin olmak için, hafifçe karıştırma-çalkalama işlemi yapılır.
7. Çukurların absorbans değerleri ,570 nm spektrofotometrik ışık altında okunur .



Şekil 2. Sitotoksite Analizleri

Kaynak: Rasime Kalkan, Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu 3 -4 Haziran 2016 Lefkoşa, KKTC, Bkz:neu.edu.tr-Sitotoksite-Analizleri-DESAM.pdf

Avantajları

- Hücre transferi yapılması gerekmez, bütün test ve işlemler bir mikropilaka üzerinde yapılır.
- MTT bileşiği, tüm hücreler tarafından metabolize edilebildiğinden, test tüm hücre tiplerinde uygulanabilmektedir.
- Maliyeti düşüktür.

Dezavantajları

- ELISA plaka okuyucusu kısıtlılığı nedeniyle geniş alanlı logaritmik hücre proliferasyonuna rağmen lineer bir görsellik elde edilememektedir.
- MTT-Formazan reaksiyon son ürünleri (çözünmez) halde olduğu için, reaksiyon son ürününü yeniden çözecek bir çözücüye ihtiyaç duyulmaktadır (resolubilizasyon problemi).
- Bir deney düzleminde birden fazla zaman aralığı eldesi mümkün olmamaktadır (Örneğin tek seferde sadece 48 saatlik bakılması).

Düşük metabolik aktivitesi olan hücre tiplerinde (lenfositler gibi) daha yüksek miktarda hücre kullanılması gerekmektedir.

Analitik değerlendirmeler ve grafiklendirme önce Microsoft Office Excel Office 365 üzerine işlenmiştir.

Burada, MTT analizinin son aşamasında yapılan spektrofotometrik değerler, her bir boz armut ekstresi uygulanmış kuyu için absorbans değerleri kaydedildi. Optik dansiteye (OD) göre ışık absorbans değerleri farklılık göstermesi beklenen bu değerler tabloya işlenerek, formülize edilmiş haliyle % hücre canlılık hesaplandı.

Bunların uygulama sonrası nicel değerler üzerinden tek tek her bir boz armut ekstresi uygulanmış kuyucuğunun absorbans değerleri sonucu elde edilen veriler, formülde yerine konarak blank kuyu absorbansı (hücre ve ekstre uygulanmamış boş değer) ile ilişkisi ve paydada kontrol kuyusunun blank absorbans değeri arasındaki fark oranlandı.

$$\% \text{ Hücre Canlılık} = \frac{(\text{test örneği ekstre uygulanmış}) \text{ absorbansı} - \text{blank absorbansı}}{\text{kontrol kuyu absorbansı} - \text{blank kuyusu absorbansı}} \times 100 \quad (1)$$

Daha sonra yüzde olarak bunların canlılık-sitotoksosite yüzde oranlarının absorbans değerlerinin birbirini tamamlayacağı formül esas alındı:

Bu değerler, deneysel nicel bulgularımız yerine konarak hesaplandığında, beklendiği gibi A375 ve HaCat hücre hattının her biri için farklı oranlarda ve farklı logaritmik eğimlere sahip sonuçların çıktığı görüldü. Standart sapmalar, her bir çukurcuk için 3 tekrarlı doz denemesi ile birbirinden farklı çıkabilen sonuçların ifadesi olacak şekilde hem tablo hem de grafik değerlerine işlenmek üzere kaydedildi. Bu sonuçlar birer tablo haline getirilerek, doz seyreltileri yapıp derişimlerin azaltılması karşılığında canlılık oranlarındaki değişimlerin değerlendirmesine geçildi.

F. İstatistiksel Analiz

Deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Normal Dağılım analizi (Test of normality) istatistiksel analiz programı olan İstatistiksel analizler için “SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version” programı kullanılmıştır. Değerler ve hesaplamalar bu program aracılığı ile yapılmıştır. Normal dağılım analizleri için sırasıyla ; Analyze-Descriptive statistics-Explore süreci takip edildi.

İstatiksel anlamlılık $p\text{-value} \leq 0.05$ kriteri baz alınarak tanımlanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak rapor edilmiştir.

Analitik değerlendirmeler ve grafiklendirme önce Microsoft Office Excel Office 365 üzerine işlenmiştir.

IV. BULGULAR

A. *Pyrus Elaeagnifolia*'nın Etanol Ekstresinin HaCat ve A375 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Çizelge 1'de görüldüğü üzere, Boz Armut (*P. elaeagnifolia*) ekstresi 25 µg/µL (mikrogram/mikrolitre) başlangıç dozu alındıktan sonra; distile su ile seri dilüsyonlar yapılarak 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 oranlarında seyreltilmiş dozlar elde edilmiştir. Bu aşamada her dozun, blank ve kontrol kuyusu boş bırakıldıktan sonra ekimi yapılan HaCat hücrelerine, 3 ayrı seferde uygulanmasından sonra, karşılığındaki canlılık oranları;

$$\% \text{Hücre Canlılık Oranı} = \frac{\text{test örneği (ilaç uygulanmış) absorbanstı} - \text{blank absorbanstı}}{\text{kontrol çukurcuk absorbanstı} - \text{blank absorbanstı}} \times 10 \quad (2)$$

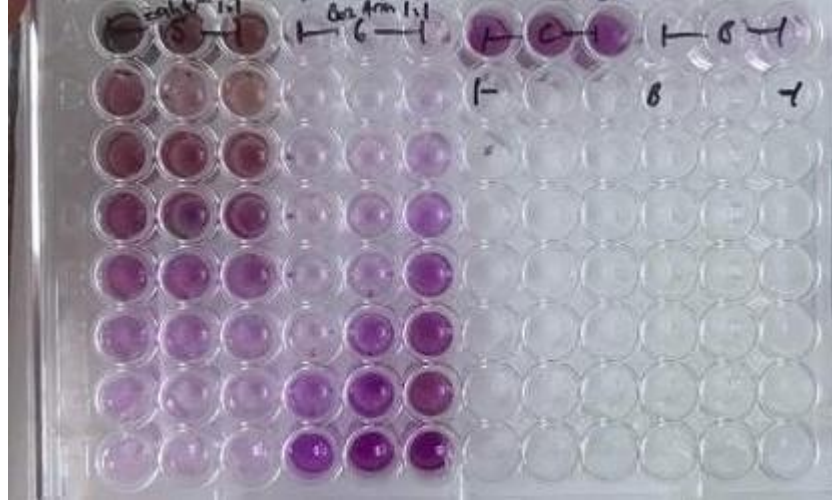
formülüne göre hesaplanarak tablodaki yerine yerleştirilmiştir.

Çizelge 1. A375 ve HaCaT Hücre Hatları Üzerinde Uygulanan Farklı Dozların % Hücre Canlılık Değerleri

% Hücre Canlılık	Konsantrasyon (µG/µL)	1:1 (µg/µL)	1:2 (µg/µL)	1:4 (µg/µL)	1:8 (µg/µL)	1:16 (µg/µL)
	A375		-3,418 (±1,08)	-2,17 (±2,12)	0,6 (±2,09)	-1,7 (±0,7)
HaCaT		-1,22 (±0,83)	-1,709 (±2,06)	3 (±5,72)	11,4 (±10,77)	18,3 (±29,38)

Çizelge 1'de gösterildiği gibi, HaCat hücre hattına uygulanan Boz Armut (*P. elaeagnifolia*) ekstresi 1:1 seyreltisinden başladığında; bu doz başlangıç dozu olan 25 µg /µL'yi ifade etmektedir. Bu dozda 48 saatlik inkübasyon sonunda bakıldığında, hesaplamaların sonucu beklendiği gibi çıkmıştır. Kullanılan en yüksek doz olan 25 µg /µL'de canlılık yüzdesi -%1,22084 olarak tespit edilmiştir. Bunun anlamı, uygulanan dozda yaşayan hücre kalmamış olup, ortamdaki hücrelerden daha fazlasına etki edebilecek bir sitotoksik etki gösterdiği'dir. Diğer taraftan, canlılık yüzdesinde negatif tamsayı olarak bulunan yüzde orandan kaynaklanan bu durum, yani sitotoksitenin yüzde yüzün üzerinde bulunması, Boz Armut (*P. elaeagnifolia*) ekstresinin doğal renginden dolayı ortamda canlı hücreler kalmadıktan sonra fazladan ve çok miktarda kalan dozun renkte ve dolayısıyla optik dansitede azalmaya

yol açarak spektrofotometreyi yanılttığı şeklinde yorumlanabilir. Nitekim yüksek dozlarda blank kuyucuğuna göre renkteki açılma gözle görülür nitelikte gerçekleşmiştir.



Şekil 3. MTT Testinde HUVEC ve A375 Hücre Hatlarının Renk Değişimi

Toksisite hesaplamasında ayrıca değinileceği gibi, yukarıda bahsedilmiş olan Hücre inhibisyon (Sitotoksisite) oranı

$$\text{Hücre inhibisyon (Sitotoksisite) oranı (\%)} = 100 - \text{Hücre canlılık oranı (\%)} \quad (3)$$

formülüyle hesaplandığında, $100 - (-1,22084) = 101,22084$ (~101,2%) gibi bir toksisite oranı elde edilecektir. Bu da en yüksek doz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'de tamamen sitotoksik etkiyi sağlandığı ve hatta aşabileceği anlamına gelmekte, böylece istenmeyen bir durum olan yüzde yüzün altında canlılık oranı vermek suretiyle, hücrelerin tamamını öldürmek için gereken dozdan eksik doz seçmiş olma ihtimalinden bizi uzaklaştırmaktadır. İleride sitotoksisite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksisite standart sapmaları da hesaba katılacaktır. Oluşturulan doz-yanıt grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanacaktır.

HaCat hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:2 dozuna bakıldığında, yarı yarıya seyreltme yapılarak $25/2=12,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozu elde edilmiştir. Bu doz 3 tekrar halinde, HaCat hücre hattı ile 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, canlılık değeri $-1,70917 \pm 2,06$ olarak bulunmuştur. Buradan yine verilen dozun hücrelere canlılık imkanı vermediği, hesaplanan sitotoksisite değerinin de yine yüzde yüzün üzerinde bir sonuç vererek %101,7 gibi bir değerde olduğu görülmüştür. Bu durum,

hiçbir canlı hücre bırakmayan 1:2 oranındaki dozun oldukça kuvvetli toksisiteye sahip olduğunun göstergesidir.

HaCat hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:4 dozunda canlılık, hücrelerin 48 saat sonra besi yerinde çoğalma imkanı göstermeye başlaması açısından önemli bir eşiği işaret etmektedir. Bu doza maruz bırakıldığında, sitotoksosite %97'lere gerilemiştir. Böylece bu dozun yorumu olarak; hücrelerin proliferasyonunu engelleyen doz miktarlarının altına inilmiş ve oluşturacağımız doz-yanıt grafiği eğrisinde, maksimal sitotoksik etkiden geriye gelinerek yaklaşık yüzde 97 oranındaki sitotoksik doz (veya inhibitör konsantrasyon) ile bir sitotoksik etkiye karşılık gelecek doz uygulanmış demek olacaktır.

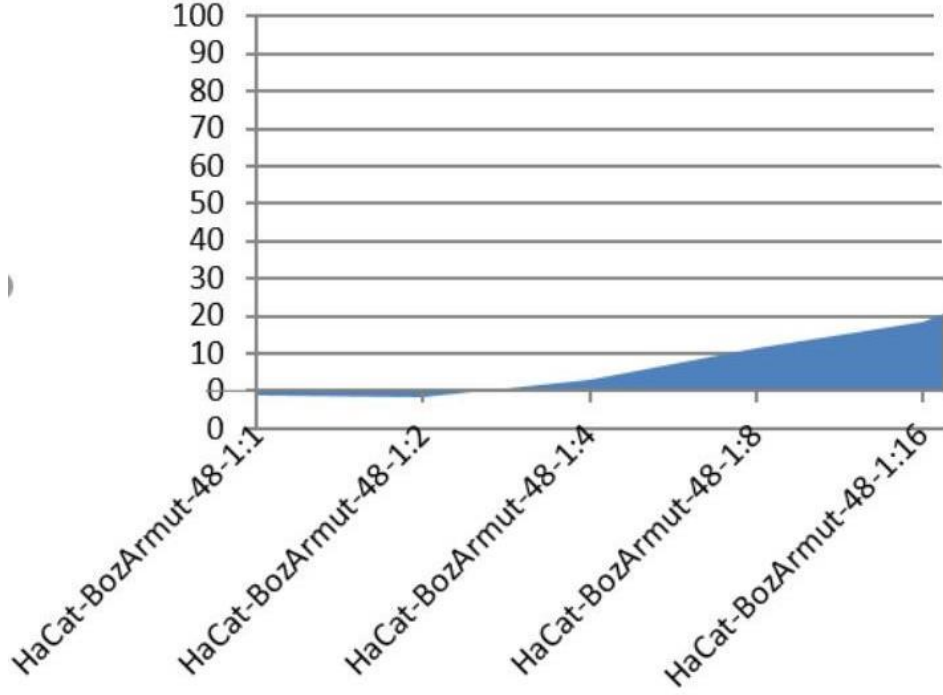
HaCat hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:8 dozunda ($1.5625\mu\text{g}/\mu\text{L}$), canlılık değeri $\%11,4\pm 10,77$ bulunmuş ve bu dozda yaşayan hücrelerin oranını vermiştir. Görüldüğü gibi toksisite gittikçe azalmakta iken standart sapmalar da yükselme eğilimindedir.

HaCat hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:16 oranında sulandırılmış derişimdeki dozunda, $\%18,3\pm 29,38$ gibi bir canlılık oranı tespit edilmiştir. Standart sapmanın yüksek oluşu nedeniyle üç tekrar ortalamasının, bir önceki (yarı yarıya sulandırılmadan önceki 1:2 oranında) dozundan daha fazla canlılık vermesi, sonucun doğru yönde ilerlediğini göstermektedir.

Gittikçe artan oranlarda canlılık gösterilmiş, dolayısıyla sitotoksik etki de azalmıştır. İleride sitotoksosite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksosite standart sapmaları da hesaba katılacaktır. Oluşturulan doz-yanıt grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanacaktır. Böylece **ekstrenin** etki gücü ve istatistiksel olarak anlamlı bir toksisite oluşturup oluşturmadığı tespit edilecektir.

Çizelge 2. HaCaT Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan MTT Sonucu Elde Edilen % Hücre Canlılık Grafiği. Deney 3 Tekrar Olarak Yapılmıştır.

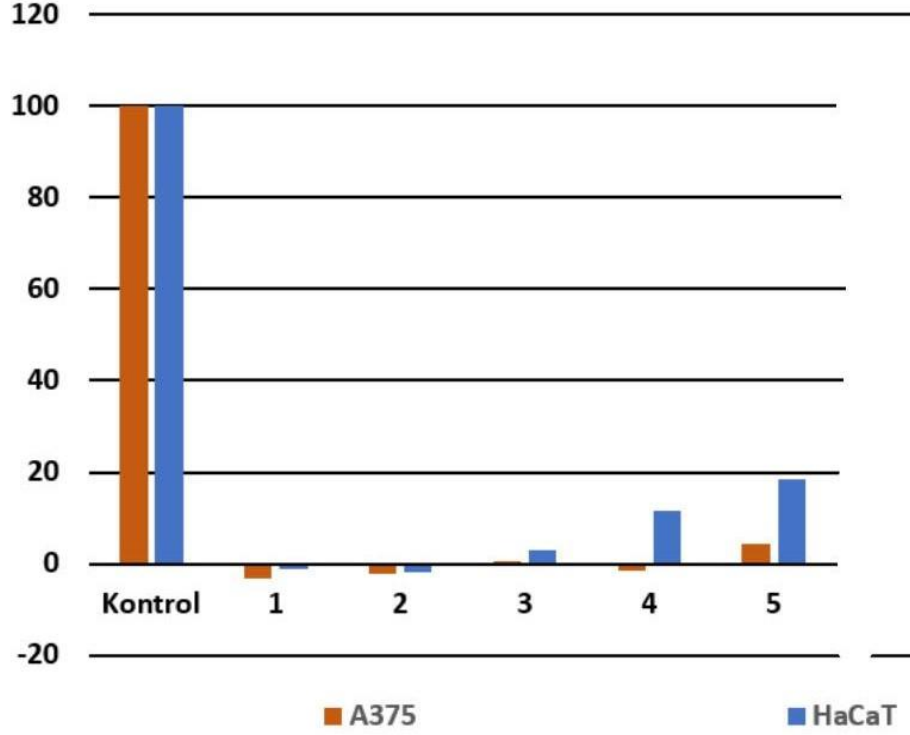
HÜCRE CANLILIĞI %



A375 kanserli hücrelerdeki ekstre dozuna karşılık canlılık oranlarına bakılacak olursa;

Çizelge 2’de x eksenini seyreltilen dozları, y eksenini hücre canlılık oranını temsil etmektedir. Boz Armut ekstresi 25 µg/µL başlangıç dozu alındıktan sonra; distile su ile seri dilüsyonlar yapılarak 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 oranlarında seyreltilmiş dozlar elde edilmiştir. Bu aşamada her dozun, blank ve kontrol kuyuları boş bırakıldıktan sonra ekimi yapılan A375 hücrelerine, 3 tekrarlı olarak uygulamasından sonra, % hücre canlılığı 1 numaralı formüle göre hesaplanarak tablodaki yerine yerleştirilmiştir.

Çizelge 3. HaCaT Hücre Hattı ve A375 Hücre Hattı Üzerinde Uygulanan MTT Sonucu Elde Edilen % Hücre Canlılık Grafiği



Çizelge 3'te y eksenini hücre canlılık oranını gösterirken, x eksenini her iki hücrenin seyreltilmiş dozunu göstermektedir. 1'den 5'e kadar olan numaralandırmasında; 1 numara 1:1 seyreltilmiş dozu, 2 numara 1:2 seyreltilmiş dozu, 3 numara 1:4 seyreltilmiş dozu, 4 numara 1:8 seyreltilmiş dozu ve 5 numarada 1:16 seyreltilmiş dozu ifade etmektedir.

A375 hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:1 seyreltilmiş dozdan başladığında; bu doz başlangıç dozu olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'yi ifade etmektedir. Bu dozda 48 saatlik inkübasyon sonunda bakıldığında, hesaplamaların sonucu beklendiği gibi çıkmıştır. Kullanılan en yüksek doz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'de canlı hücre ortalama değeri $-3,41834 \pm 1,08$ olarak tespit edilmiştir. Bunun anlamı, uygulanan dozda yaşayan hücre kalmamış olup, ortamdaki hücrelerden daha fazlasına etki edebilecek bir sitotoksosite (öldürücülük) gösterdiği'dir. Toksikite hesaplamasında ayrıca değinileceği gibi, yukarıda bahsedilmiş olan Hücre inhibisyon (Sitotoksosite) oranı 3 numaralı formülle hesaplandığında, $100 - (-3,41834) = 103,41834$ ($\sim 103,4\%$) gibi bir toksisite oranı elde edilecektir. Bu da en yüksek doz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'de tamamen sitotoksik öldürücü etkiyi sağladığı, böylece istenmeyen bir durum olan yüzde yüzün altında canlılık oranı vermek suretiyle, hücrelerin tamamını öldürmek için gereken dozdan eksik doz

seçmiş olma ihtimali azalmıştır. Nitekim yüksek dozlarda blank kuyucuğuna göre renkteki açılma gözle görülür nitelikte gerçekleşmiştir. İleride sitotoksisite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksisite standart sapmaları da hesaba katılmıştır. Oluşturulan doz-etki grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanmıştır.

A375 hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:2 dozuna bakıldığında, 1/2 seyreltme yapılarak $25/2=12,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozu elde edilmiştir. Bu doz 3 tekrar halinde A375 hücre hattı ile 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, canlılık oranı $2,17037 \pm 2,12$ olarak bulunmuştur. Buradan yine verilen dozda hücrelerde canlılık olmadığı, hesaplanan sitotoksisite değerinin de yine yüzde yüzün üzerinde bir sonuç vererek %102,1 gibi bir değerde olduğu görülmüştür. Bu durum, hiçbir canlı hücre bırakmayan 1:2 oranındaki dozun oldukça kuvvetli toksisiteye sahip olduğunun göstergesidir.

A375 hücre hattına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:4 dozunda canlı hücre oranı $0,6 \pm 2,09$ olarak gerçekleşmiştir. $3,125 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozunda meydana gelen bu canlılık, hücrelerin 48 saat sonra besi yerinde çoğalma imkanı göstermeye başlaması açısından anlamlı görünse de, bir sonraki yarı yarıya sulandırılmış yeni doz (1:8, $1,5625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ile karşılaştırıldığında ilerleyici bir etki göstermeyeceği görülmüştür. Sadece söylenebilecek olan, bu doza maruz bırakıldığında, sitotoksisitenin %99,4'lere gerilediğidir.

A375 hücre hatlarına uygulanan Boz Armut ekstresi 1:8 dozunda ($1,5625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), canlılık oranı $-1,7 \pm 0,7$ bulunmuş ve bu dozda canlı kalabilen hücrelerin oranını vermiştir. Görüldüğü gibi toksisite tekrar $100 - (-1,7) = 101,7$ düzeylerine yükselmiştir. Sitotoksik düzeyin, doz azalmasına rağmen artması beklenen durumun tersine gelişmiş bir durumdur bu. Fakat, etken maddeyle hücrenin birlikte inkübasyon süresi değişmemesine ve doz azaltımına (dilüsyon) canlı hücre azaltıcı etki göstermesi, doz-etki grafiğinde anlamlı bir sapmaya neden olmamıştır.

A375 hücre hattına uygulanan Boz Armut (*P.Elaeagnifolia*) ekstresi 1:16 oranında seyreltilmiş derişimdeki dozunda $4,3 \pm 7,09$ gibi bir canlılık oranı tespit edilmiştir. $1,5625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozunda meydana gelen bu canlılık oranı, hücrelerin 48 saat sonra besi yerinde çoğalma imkanı göstermeye başlaması açısından önemli bir eşiği işaret etmektedir. Bu doza maruz bırakıldığında, sitotoksisite %96'lara

gerilemiştir. Böylece bu dozun yorumu olarak; hücrelerin proliferasyonunu engelleyen doz miktarlarının altına inilmiş ve oluşturulan doz-etki grafiği eğrisinde, yaklaşık %96 oranındaki sitotoksik dozda (veya inhibitör konsantrasyonunda) bir sitotoksik etkiye karşılık gelecek doz uygulanmıştır.

Gittikçe artan oranlarda canlılık oranı gösterilmiş, dolayısıyla sitotoksik etki de azalmıştır. İleride sitotoksikite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksikite standart sapmaları da hesaba katılacaktır. Oluşturulan doz-etki grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanacaktır. Böylece ekstrenin etki gücü ve istatistiksel olarak anlamlı bir toksisite oluşturup oluşturmadığı tespit edilecektir.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut ekstresi 1:1 dilüsyon oranlı dozundan başlarsak; bu doz başlangıç dozumuz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'yi ifade etmektedir. Bu dozda 48 saat inkübasyon sonucunda bakıldığında, hesaplamalar sonucu beklendiği gibi çıkmıştır. Kullanılan en yüksek doz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'de canlı hücre ortalama değeri $-3,41834 \pm 1,08$ olarak tespit edilmiştir. Bunun anlamı, uygulanan dozda yaşayan hücre kalmamış olup, ortamdaki hücrelerden daha fazlasına etki edebilecek bir sitotoksikite (öldürücülük) gösterdiği'dir. Toksikite hesaplamasında ayrıca değinileceği gibi, yukarıda bahsedilmiş olan Hücre inhibisyon (Sitotoksikite) oranı 3 numaralı formülle hesaplandığında, $100 - (-3,41834) = 103,41834$ ($\sim 103,4\%$) gibi bir toksisite oranı elde edilecektir. Bu da en yüksek dozumuz olan $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'de tamamen sitotoksik öldürücü etkiyi sağladığı, böylece istenmeyen bir durum olan yüzde yüzün altında yaşayabilirliği, hücrelerin tamamını öldürmek için gereken dozdan eksik doz seçmiş olma ihtimalinden bizi uzaklaştırmaktadır. Diğer bir değerlendirmeyle, Boz Armut ekstresinin doğal renginden dolayı ortamdaki canlı hücreler kalmadıktan sonra fazladan ve çok miktarda kalan dozun renkte ve dolayısıyla optik dansitede azalmaya yol açarak spektrofotometreyi yanılttığı şeklinde de yorumlanabilir. Nitekim yüksek dozlarda blank kuyucuğuna göre renkteki açılma gözle görülür nitelikte gerçekleşmiştir. İleride sitotoksikite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksikite standart sapmaları da hesaba katılmıştır. Oluşturulan doz-etki grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanmıştır.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut ekstresi 1:2 dozuna bakıldığında, yarı yarıya sulandırma yapılarak $25/2= 12,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozu elde edilmiştir. Bu doz 3 tekrar halinde A375 hücre serisi ile 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, *viyabilite* değeri $-2,17037 \pm 2,12$ olarak bulunmuştur. Buradan yine verilen dozun hücrelere *viyabilite* imkanı vermediği, hesaplanan sitotoksisite değerinin de yine yüzde yüzün üzerinde bir sonuç vererek %102,1 gibi bir değerde olduğu görülmüştür. Bu durum, hiçbir canlı hücre bırakmayan 1:2 oranındaki dozun oldukça kuvvetli toksisiteye sahip olduğunun göstergesidir.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut (*P.Elaeagnifolia*) ekstresi 1:4 dozunda canlı hücre oranı $\%0,6 \pm 2,09$ olarak gerçekleşmiştir. $6,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozunda meydana gelen bu yaşayan hücrelerin 48 saat sonra besi yerinde çoğalma imkanı göstermeye başlaması açısından anlamlı görünse de, bir sonraki yarı yarıya seyreltilmiş yeni doz (1:8, $3,125 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) ile karşılaştırıldığında ilerleyici bir etki göstermeyeceği görülmüştür. Sadece söylenebilecek olan, bu doza maruz bırakıldığında, sitotoksisitenin %99,4'lere gerilediğidir.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut (*P.Elaeagnifolia*) ekstresi 1:8 dozunda ($1,5625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), yaşayabilirlik değeri $-1,7 \pm 0,7$ bulunmuş ve bu dozda canlı kalabilen hücrelerin oranını vermiştir. Görüldüğü gibi toksisite tekrar $100 - (-1.7) = 101,7$ düzeylerine yükselmiştir. Sitotoksik düzeyin, doz azalmasına rağmen artması beklenen durumun tersine gelişmiş bir durumdur. Fakat, etken maddeyle hücrenin birlikte inkübasyon süresi değişmemesine ve doz azaltımına (dilüsyon) canlı hücre azaltıcı etki göstermesi, doz-etki grafiğinde anlamlı bir sapmaya neden olmamıştır.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut (*P.Elaeagnifolia*) ekstresi 1:16 oranında sulandırılmış derişimdeki dozunda, $\%4,3 \pm 7,09$ gibi bir *viyabilite* oranı tespit edilmiştir. $1,5625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ dozunda meydana gelen bu yaşayabilirlik, hücrelerin 48 saat sonra besi yerinde çoğalma imkanı göstermeye başlaması açısından önemli bir eşiği işaret etmektedir. Bu doza maruz bırakıldığında, sitotoksisite %96'lara gerilemiştir. Böylece bu dozun yorumu olarak; hücrelerin proliferasyonunu engelleyen doz miktarlarının altına inilmiş ve oluşturulan doz-etki grafiği eğrisinde, yaklaşık %96 oranındaki sitotoksik dozda (veya inhibitör konsantrasyonunda) bir sitotoksik etkiye karşılık gelecek doz uygulanmıştır.

Gittikçe artan oranlarda canlılık oranı **gösterilmiş, dolayısıyla** sitotoksik etki de azalmıştır. İleride sitotoksisite tablosunda da gösterileceği üzere 3 tekrarın sitotoksisite standart sapmaları da hesaba katılacaktır. Oluşturulan doz-etki grafiği üzerinden hücrelerin yüzde ellisine etki eden sitotoksik dozlar hesaplanacaktır. Böylece ekstrenin etki gücü ve istatistiksel olarak anlamlı bir toksisite oluşturup oluşturmadığı tespit edilecektir.

Sitotoksik değerlendirmelerin, her doz değerine karşılık gelen *viyabiliteler* üzerinden hesaplandığı Çizelge 4.3'te de görüldüğü gibi, doz derişimi azaltıldıkça sitotoksik etki azalmaktadır. Bu verilerdeki azalmanın anlamlı olması da istatistikî verilere bağlıdır. Sitotoksisite bulgularını anlamlandırmak için kullanılacak veriler; uygulanan ekstre başlangıç dozu ve bunun sıralı dilüsyon oranları ile elde edilmiş dozların yanında, sitotoksite ölçütü olarak bakılacak bir diğer veri de aslında bir veri-grafik çıktısı olarak elde edilen ve daha ileri bir bölümde açıklanacak olan IC₅₀ değeridir. Bu IC₅₀ değeri kullanılarak iki hücre serisinin tedavide kullanımı hakkında yorum yapılabilecektir.

Bazı sitotoksisite değerlerinin yüzde yüzün üzerinde **çıkması, daha** önce de bahsedildiği gibi, hücre canlılığı yüzde değerinin negatif tamsayı olarak eksili değer vermesinden kaynaklanmaktadır. Bu sebepten sitotoksisite yorumu yapılırken, spektrofotometrenin okuduğu optik dansite değerinin blank çukurcuğundan da daha alt seviyede bir absorbans göstermesini ifade eder. Yani bu durumda boz armut ekstresi uygulaması sonrası belli bir dozdan sonra ortamda hücre kalmamış ve renk değişimi daha da açık bir renge bürünmüş diye yorumlanabilir. Deneyde en yüksek dozlara uygulanan çukurcuklarda renk değişiminin kontrole göre daha açık bir renk verdiği gözle görülmüştür. Özellikle her iki hücre tipinde de en yüksek iki dozda (25 µg/µL ve 12,5 µg/µL), MTT solüsyonunun rengini koyu mor renge çeviren ve böylece canlı hücrenin enzimatik etkinliğinin varlığını ifade eden canlılık oranları aşılımış, ortama yüzde yüzünü öldüren dozdan fazlası verildiği için de ortamda fazladan ve çok miktarda bulunan Boz Armut ekstresinin doğal renginden kaynaklı bir renk açılması olarak, optik geçirgenliğinde azalma yaşanmıştır.

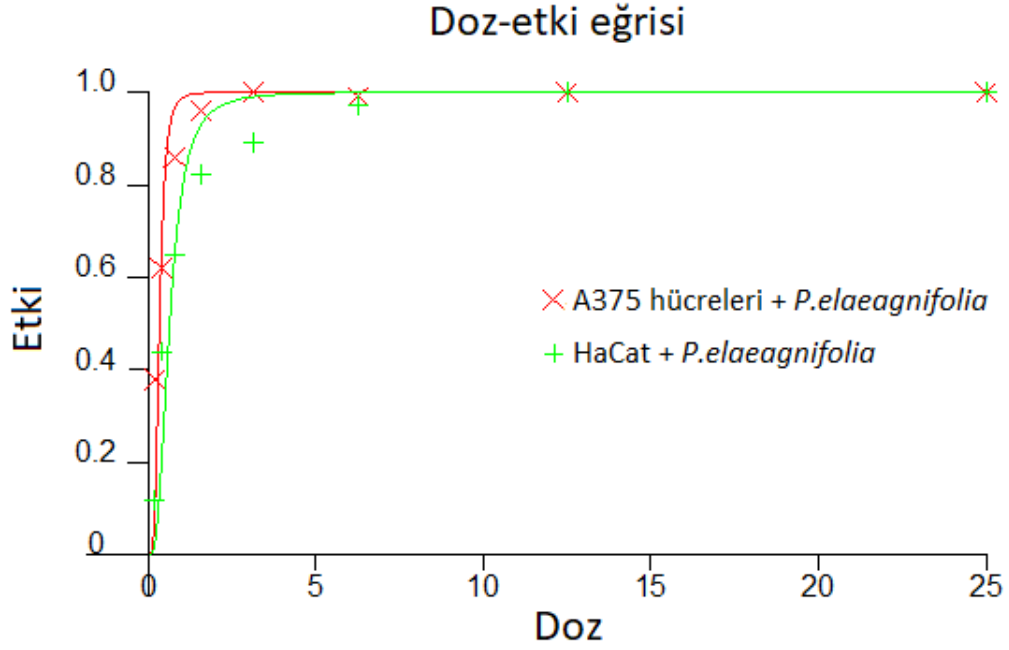
Değerler grafik oluşturmak üzere toplanmıştır. Grafik oluşturmadaki amaç; boz armut ekstresinin değişen dozlarında hücrelerin viyabilitesine olan etkisinin, daha direkt ve ekstreden beklentiye odaklı ifadeyle sitotoksik etkisinin net belirlenmesidir. Bu grafik üzerinden, alınan ortalama, ekstre dozunun öldürücü gücünü belirlemek

üzere, ekstrenin hücre popülasyonunun yarısını öldürdüğü değer esas alınmaktadır. Bu ekstrenin etki gücü belirlenirken, deneyde nicel veri olarak sadece ekstreyi her defasında iki kat seyreltme müdahalesi bulunduğu için ekstre dozunun tam ve kesin olarak yüzde elli (%50) sitotoksiste oluşturduğu doz değerini denk getirmek mümkün değildir. Tam da bu sebeple, bahsedilen değer belirlenmesi için belirli bir ifadesi olan IC_{50} değerinin hesaplanabilmesi amacıyla grafikten yararlanılmıştır. Deneyin sonuçları işlenerek grafikteki değer nasıl elde edildiği ve ne işe yaradığı, etken maddesi olan Boz armut ekstresinin etanolde çözünmüş olan konsantrasyonun sağlıklı A375 ve kanserli A375 hücreleri üzerinde etkilerinin karşılaştırmalı olarak nasıl değerlendirildiğini göstermeden önce, IC_{50} değerinin ne anlama geldiği ve neden kullanıldığını açıklamak gerekmektedir.

IC_{50} , basit tanımıyla uygulandığı amaca yönelik olarak bir ekstrenin ya da etken maddenin inhibitör konsantrasyonlardan oluşturduğu maksimum inhibisyonun tam yarısını (%50) oluşturan konsantrasyondur. Yarı-maksimal inhibitor konsantrasyon tanımı da kullanılmaktadır (Sebaugh, 2011).

FDA (U.S. Food and Drug Administration: Birleşik Devletler Besin ve İlaç Bürosu) 2018 yılında yayınladığı *FDA's Drug Review Process and the Package Label* isimli kitabındaki tanıma göre IC_{50} , spesifik substrat konsantrasyonlarında enzimatik reaksiyonlarda yüzde 50 inhibisyon meydana getiren inhibitör konsantrasyonudur.

IC_{50} tespiti, hesaplama yöntemine kullanılan formüle ve esas alınan doz-etki aralığına göre yöntemden yönteme ve hesaplama hesaplamaya değişkenlik gösterebilen bir değer olarak ortaya çıkmaktadır (Volpe, D. ve ark.). Grafik üzerinden hesaplama yapıldığı gibi, Hill üssel sabitini içeren yaygın bir formülle bulunması da mümkündür (Prinz H.). Fakat oldukça karışık ve hesaplama güçlüğü olması, işlem hatalarına da sebebiyet vermesi açısından, IC_{50} dozu CalcuSyn (Biosoft®) isimli bilgisayar programı aracılığıyla hesaplanmıştır. CalcuSyn (Biosoft®) üzerinde etken madde ve hücre etkileşimleri, doz etki grafikleri ve her hücre tipinde konsantrasyona göre IC_{50} değerleri tespit edilmiştir.



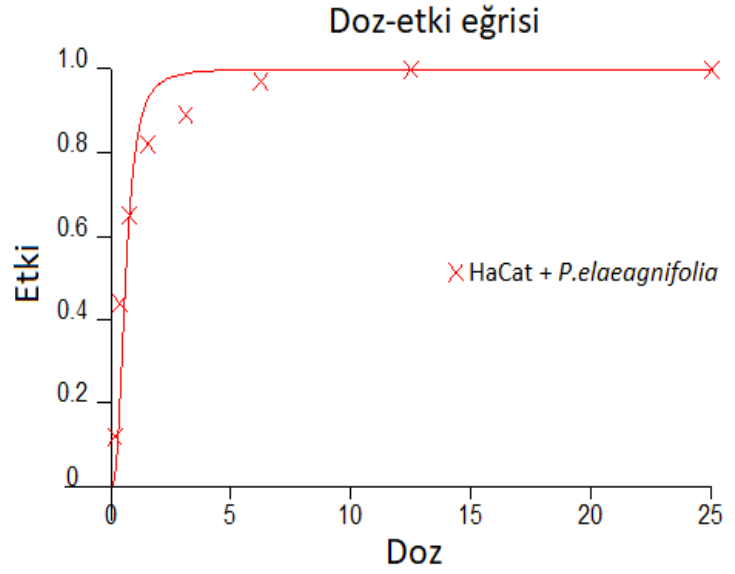
Şekil 4. A375 Hücre Serisi ile HaCat Hücre Serisinin Doz-Etki Grafiklerinin Birlikte Görünümü

Şekil 4'de, CalcuSyn (Biosoft®) programı üzerinden dozlar 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ başlangıç dozundan itibaren her doz derişimine karşılık gelen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) sitotoksosite yüzdeleri, üç tekrarlı doz denemelerinin sonucunda elde edilen üç sitotoksosite yüzdesinin aritmetik ortalaması halinde veri alanına işlenmiş, ardından hem doz-etki yazılı raporu halinde hem de grafik halinde sonuçlar alınmıştır. Şekil 4'deki grafik ise ikili halinde karşılaştırmalı değerlendirmeye bir örnektir.

Ekstrenin uygulandığı hücre hatları tek tek değerlendirilecek olursa; Şekil 5'te görüleceği üzere, verilen her bir doz değerine karşılık hücre popülasyonunda etkilenen (sitotoksositeye uğrayan, ölen) oranı ifade etmektedir. Grafik logaritmik bir seyir göstermekte ve bu logaritmik eğriden elde edilen sonuçlar matematiksel olarak önce bir tablo halinde şeklin sol tarafında da görüleceği üzere, hücrelerin 0,020 (%2)'sini öldürdüğü doz değerinden başlayarak, 0,990 (%99)'unu öldürdüğü doz değerine kadar doz değerler serisi oluşturmaktadır. Buradan tam olarak kırmızı renkli yazılmış kısma denk gelen 0,500 (%50) ifadesi, doz-etki eğrisinde hücrelerin tam yüzde ellisinde sitotoksik etki gösteren etkin konsantrasyon değerinin ifadesi olacaktır.

Doz - etki tablosu

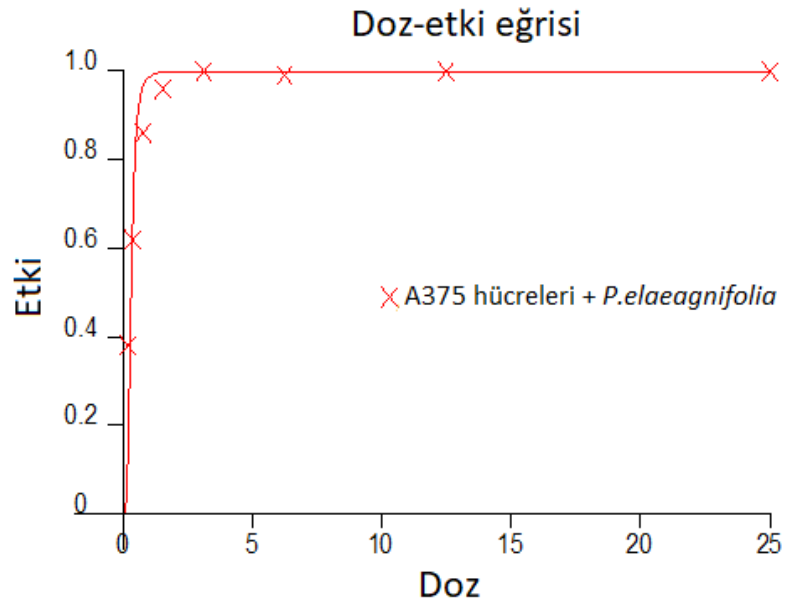
Fa	Dose	Lo
0.020	0.15281	
0.050	0.21459	
0.100	0.28049	
0.150	0.33108	
0.200	0.37510	
0.250	0.41584	
0.300	0.45503	
0.350	0.49382	
0.400	0.53311	
0.450	0.57371	
0.500	0.61649	
0.550	0.66246	
0.600	0.71292	
0.650	0.76963	
0.700	0.83524	
0.750	0.91396	
0.800	1.01323	
0.850	1.14795	
0.900	1.35498	
0.950	1.77108	



Şekil 5. HaCat Hücre Serisinin Doz-Yanıt Grafiği (Sağda) ve Buna Göre Hesaplanmış ve Tablo Halinde Çıkarılmış IC₅₀ Değeri (Solda, Kırmızı Yazılı)

Doz - etki tablosu

Fa	Dose	Lo
0.020	0.10936	
0.050	0.14124	
0.100	0.17280	
0.150	0.19579	
0.200	0.21509	
0.250	0.23246	
0.300	0.24878	
0.350	0.26460	
0.400	0.28030	
0.450	0.29623	
0.500	0.31272	
0.550	0.33013	
0.600	0.34890	
0.650	0.36961	
0.700	0.39310	
0.750	0.42069	
0.800	0.45467	
0.850	0.49950	
0.900	0.56594	
0.950	0.69243	
0.990	1.08120	



Şekil 6. A375 Hücre Serisinin Doz-Etki Grafiği (Sağda) Ve Buna Göre Hesaplanmış ve Tablo Halinde Çıkarılmış IC₅₀ Değeri (Solda, Kırmızı Yazılı)

Kanserli hücre olarak esas etkisi incelenen hücre serisi A375 için de aynı işlemlerden bahsetmek mümkündür. Bu hücre serisi için oluşturulan doz yanıt grafiklerinde (Şekil 6), logaritmik eğriden elde edilen sonuçlara göre A375 hücresi

için Boz Armut ekstresinin IC₅₀ değeri: 0,31272 µg/µL dir. Yine kısaca ifade edilecek olursa: IC₅₀ (A375): 0,31272 µg/µL olarak ilerki metinde kullanılacaktır.

Sağlıklı hücre olarak esas etkisi incelenen hücre serisi HaCat için oluşturulan doz yanıt grafiklerinde (Şekil 7), logaritmik eğriden elden edilen sonuçlara göre HaCat hücresi için Boz armut ekstresinin IC₅₀ değeri: 0,61649 µg/µL'dir.

			Statistic	Std. Error
A375MTT1	Mean		11,2940	6,65107
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-2,8057	
		Upper Bound	25,3936	
	5% Trimmed Mean		7,1544	
	Median		,5700	
	Variance		752,025	
	Std. Deviation		27,42308	
	Minimum		-3,01	
	Maximum		100,11	
	Range		103,12	
	Interquartile Range		12,74	
	Skewness		2,681	,550
	Kurtosis		7,175	1,063
	A375MTT2	Mean		24,3160
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	5,1333	
		Upper Bound	43,4987	
5% Trimmed Mean			21,5922	
Median			1,7092	
Variance			1391,993	
Std. Deviation			37,30942	
Minimum			-3,34	
Maximum			101,00	
Range			104,34	
Interquartile Range			60,88	
Skewness			1,111	,550
Kurtosis			-,365	1,063
A375MTT3		Mean		38,4104
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	16,8462	
		Upper Bound	59,9746	
	5% Trimmed Mean		36,6012	
	Median		23,4400	
	Variance		1759,065	
	Std. Deviation		41,94120	
	Minimum		-4,64	
	Maximum		114,03	
	Range		118,67	
	Interquartile Range		75,37	
	Skewness		,532	,550
	Kurtosis		-1,252	1,063

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
A375MTT1	,379	17	,000	,570	17	,000
A375MTT2	,316	17	,000	,745	17	,000
A375MTT3	,208	17	,050	,868	17	,021

a Lilliefors Significance Correction

Şekil 7. SPSS'de Üç Tekrardan Elde Edilen Verilerin Normal Dağılım Testi Sonuçları

Descriptives

CellType			Statistic	Std. Error
Doz	HaCat	Mean	1,6081	,81702
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	-,0962	
		Upper Bound	3,3124	
		5% Trimmed Mean	,8608	
		Median	,4527	
		Variance	14,018	
		Std. Deviation	3,74405	
		Minimum	,02	
	Maximum	17,24		
	Range	17,22		
	Interquartile Range	1,05		
	Skewness	4,020	,501	
	Kurtosis	17,085	,972	
	A375	Mean	,6965	,40789
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	-,1544	
		Upper Bound	1,5473	
		5% Trimmed Mean	,3127	
Median		,1384		
Variance		3,494		
Std. Deviation		1,86921		
Minimum		,00		
Maximum	8,61			
Range	8,61			
Interquartile Range	,38			
Skewness	4,187	,501		
Kurtosis	18,246	,972		

Tests of Normality

CellType		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Doz	HaCat	,338	21	,000	,429	21	,000
	A375	,365	21	,000	,385	21	,000

a Lilliefors Significance Correction

Şekil 8. SPSS’de Üç Tekrardan Elde Edilen Verilerin Ortalamalarından Elde Edilen İki Hücre Serisine Ait IC₅₀ Değerlerinin Karşılaştırılması

"Normal dağılım analizi"(p<<0.05) -Değişken sayısı 30’dan az olduğu için Shapiro-Wilk testi esas alınmalıdır.

İstatistiksel olarak çalışmanın anlamlılık düzeyleri ölçülmüştür. Buna göre, deneysel ve istatistikî çalışmalardan hiçbirine başlamadan önce bir sıfır/yokluk (null) hipotezi ve bir alternatif hipotez kurulmuştur. Yani çalışma sonucu aksini ispatlayamadığımız durum için H_0 (sıfır/yokluk), iddia ettiğimiz gibi sonucu ispatıyla ortaya koyduğumuz takdirde ise H_1 hipotezi geçerlilik kazanmış olacaktır. Çalışmanın amacı olarak da nitelendirebileceğimiz hipotezler şu şekildedir:

- H_0 : Boz Armut ekstresi, *sağlıklı* (HaCat) ve kanserli (A375) hücre tipleri üzerinde aralarında herhangi bir farklılık olmaksızın, hiç “sitotoksik” etki göstermemektedir.
- H_1 : Boz Armut ekstresi, *sağlıklı* (HaCat) ve kanserli (A375) hücre tipleri üzerinde her birinde farklı dozlarda olmak üzere aynı “sitotoksik” etkiye sahiptir.

Bu istatistiksel çalışmada genel olarak Boz Armut ekstresinin, sağlıklı (HaCat) ve kanserli (A375) hücre tipleri üzerinde sitotoksik etkisi olan bir tedavi etkeni olup olmadığı sorusuna cevap aranmıştır. Buna ek olarak, ekstrenin hücreler üzerinde etkinliği araştırılırken genel hipotezimize erişme yolunda; kontrol kuyucuğunda ekstre olmaksızın sadece doğal besi yerinde bulunan hücre kültür popülasyonunun %100’ünün yaşamına devam ettiği (canlı kalabildiği) belirlendikten sonra, değişen dozlarda boz armut ekstresi uygulaması yapılan MTT kuyucuklarında farklı oranlarda yaşamına devam eden canlı fraksiyonun verilen doza karşılık kontrole göre nasıl değişkenlik gösterdiği de bir alt hipotez olarak değerlendirilmiştir. Kontrol kuyucuğunda yaşamına devam eden popülasyon yüzdesi (%100) ve belirlenmiş doz aralıklarında herhangi bir dozda ekstre uygulanan test kuyucuğunda yaşamına devam eden popülasyon yüzdesi (%x) olarak düşünülerek bu ikisi arasında istatistikî bir anlam olup olmadığı araştırılmıştır. Bunu en doğru biçimde sağlayabilmek için üç tekrarlı MTT ekiminde saptanan standart sapma oranlarının fazla (Normal Dağılım ve Shapiro-Wilk analizinde standart sapmalar hem A375 hem de HaCat serilerinin her bir MTT uygulaması esas alınarak hesaplandığında her birinde $p < 0,05$, normal dağılım yok ve standart sapmalar yüksek) olduğu hesaplanmıştır (Şekil 8). Standart sapmaların bu şekilde yüksek oluşu da göz önünde bulundurularak ortalamalarının IC_{50} değerleri, başlangıç fraksiyon oranından etkinin tamamının oluştuğu doza kadar CalcuSyn (Biosoft®) programında hesaplanıp çizelge haline getirilmiş ($IC_{20}, IC_{10}, IC_{20}, IC_{50}, IC_{90}$) değerlerinin matematiksel anlamlı

aralıklardan oluşan doz-etki eğrisinden elde edilmiş değerlerin kullanılması kararlaştırılmıştır).

V. TARTIŞMA

Bu çalışma, Kurutulmuş Boz Armut ektresinin sağlıklı ve kanserli insan deri hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin deneysel karşılaştırması amacıyla yapılan ilk çalışmadır. Yapılan literatür incelemelerinde kurutulmuş boz armut ekstresinin sağlıklı ve kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi üzerine çalışma yapılmamıştır.

Daha önce Boz armutun antioksidan, antimikrobiyal ve mutajenik özelliklerini inceleyen bir çalışma olmuştur. Çalışmadaki örneklerin antioksidan kapasiteleri üç farklı yöntemle göre belirlenmiştir. Bunlar: DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali), FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) ve ABST (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) yöntemidir.

Çalışmada örneklerin FRAP değeri 515,6 µmol/g ekstrakt, ABTS radikali süpürme aktivitesi %48,2, DPPH radikali süpürme aktivitesinin IC₅₀ değeri 33,2µg/ml olarak bulunmuştur (Güdücü, 2014). Boz armut meyvesinin beş farklı konsantrasyonda 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL'de hazırlanan aseton ve metanol karışımında DPPH radikalini yok etme aktivitesinin konsantrasyona göre değiştiği görülmüştür. 1000 µg/mL'deki asetonla hazırlanan konsantrasyonda en yüksek aktivite (%89,23) olduğu, en düşük aktivitenin de metanolla hazırlanan 100 µg/mL konsantrasyondaki (%13,89) ekstraktlarda olduğu görülmüştür. Şengül ve ark. (2018) *P. elaeagnifolia*'dan yapılan marmelatta DPPH radikalini süpürme aktivitesini bu çalışmadan daha düşük bir değer (%3,56) bulmuşlardır. Bu durum, marmelat hazırlanırken meyvenin ısı işlem esnasında antioksidan etkisinin azalması ile açıklanabilir.

P. elaeagnifolia meyvesinde bulunan ve antioksidan kapasitesine sahip olan bileşenlerden birisi de GSH'n(Glutatyon) bir tripeptit olması, hücreyi oksidatif stres ve diğer çevresel streslerin hasarından koruduğu bilinmektedir (Smirnova ve Oktyabrsky, 2005).

Çalışma sonucunda *P.Elaeagnifolia*'nın fenolik maddeler ve askorbik asit gibi sağlık açısından önem taşıyan fitokimyasallar içerdiği bulunmuştur. İçerisinde bulunan fitokimyasallar, meyveye antioksidan ve antimikrobiyal özelliği vermektedir. Çalışmada yapılan meyve ekstraktının orta seviyede antioksidan kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte insanda bulunan patojen bakterilere yönelik antimikrobiyal aktivite göstermektedir.

Yukardaki çalışmada, meyve ekstraktları hiçbir mutajenik etki göstermediği için alternatif gıda kaynağı olarak rahat bir şekilde tercih edilebileceği öne sürülmüştür. *P.elaagnifolia* meyvesi yüksek kolesterol ve diyabet tedavisine olumlu anlamda dönüşler yapmaktadır. Tedavide alternatif olarak kullanımlarda gastrointestinal sistem, üriner sistem, kanser, immün ve hematopoetik hastalıklarına karşı olduğu görülmüştür (Emine Burcu ve ark., 2017).

Bu çalışmaya benzer yapılan başka bir çalışmada optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucunda *P.Elaeagnifolia* yaprağından elde edilen ekstraktların MCF-7 (meme kanseri) ve A549 (akciğer kanseri) hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir.

Çalışmada 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 25 µg/mL, 75 µg/mL, 150 µg/mL meyve ekstrakt konsantrasyonlarına bakılmıştır. Konsantrasyon arttıkça MCF-7 ve A549 hücre ölüm oranı da artmaktadır. MCF-7 hücresinde 5 µg/mL konsantrasyonundayken hücre ölüm oranı %6,3, A549'da bu oran %11,5 görülmüştür. En yüksek konsantrasyona bakıldığında inhibisyon oranı da artmış olup MCF-7 hücresinde %67,9, A549 hücresinde ise %72,2 olarak tespit edilmiştir. Meme kanserinde sitotoksikite 75-150 µg/mL arasında fazla bir değişim görülmemiştir. A549 hücresinde 15 µg/mL gibi düşük konsantrasyonda %62 oranında inhibisyon gözlenmiş ve konsantrasyon arttıkça fazla bir artış gözlemlenmemiştir (Keçeci, 2018).

Bu çalışma ile Kurutulmuş Boz Armut ekstresinin A375 hücresindeki sitotoksik etkisine bakıldığında A549 hücresi üzerinde yapılan çalışmada konsantrasyon arttıkça hücre ölüm artarken, A375 hücresinde konsantrasyon seyreltikçe hücre ölümü arttığı söylenebilir.

P.Elaeagnifolia ile aynı familyadan olan elmadaki kateşi, klorojenik asit ve florizinin başka bir çalışmada kadınlarda akciğer kanseri riskini %21'e kadar azalttığı gözlemlenmiştir. Elmada bulunan besin lifinin kolon kanserini önleyici

özelliği vardır. İçerisinde bulunan C vitamininin gırtlak kanseri, mide ve akciğer kanserine karşı koruduğu Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü tarafından açıklanmıştır (Sarı, 1998).

Günümüzde kullanılan gıda takviyelerindeki antioksidanlar, kanserojenik toksik mekanizmaya sahip olduğu bilindiği için, doğal antioksidan kaynakları arayışı başlamıştır. Antioksidan özelliğine sahip olan fenolik bileşikler; meyvelerin kendine özgü renk, aroma ve tat sağlamasında rol oynayan ve meyve kalitesini arttıran bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde hayati fonksiyonların sürdürülmesinde rol almadığı için sekonder metabolit olarak da bilinir. Bu bileşikler bitkilerde yaralanma, enfeksiyon, UV radyasyon gibi stres koşullarında tepki olarak sentezlenir. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasitesi olduğundan diyabet, kanser, kalp hastalıkları ve katarakt gibi hastalıklardan korunmada etkilidir (Justesen ve ark.,1998).

Bu çalışma sonucunda H₁ hipotezi sonucuna ulaşıldı. Yani Boz Armut ekstresi, sağlıklı (HaCat) ve kanserli (A375) hücre hatları üzerinde her birinde farklı dozlarda olmak üzere aynı “sitotoksik” etkiye sahiptir.

IC₅₀ hesaplamasına göre A375 hücrelerinin yarısını öldüren doz 0.31272 µg/µL , HaCat hücrelerinin yarısını öldüren doz 0.61649 µg/µL hesaplanmıştır.

IC₅₀ hesaplamasına göre ; A375 hücrelerini öldürmek için 2 µg/µL dozu etkin doz olarak kullanılabilir.

HaCat hücre serisine uygulanan Boz Armut ekstresi 1:2, 1:4 ve 1:16 1oranlarda doz azaldıkça gittikçe artan oranlarda canlılık oranı gösterilmiş, dolayısıyla sitotoksik etki de azalmıştır. Yani oran arttıkça diğer bir deyişle dozaj azaldıkça hücre canlılık oranı da artmıştır.

A375 hücre serisine uygulanan Boz Armut ekstresi 1:8 dozunda (3,125 µg/µL), canlılık değer -1,7 ± 0,7 olarak bulunmuş ve bu dozda canlı kalabilen hücrelerin oranını vermiştir. Görüldüğu gibi toksisite tekrar 100-(-1.7)=101,7 düzeylerine yükselmiştir. Sitotoksik düzeyin, doz azalmasına rağmen artması beklenen durumun tersine gelişmiş bir durumdur. Fakat, etken maddeyle hücrenin birlikte inkübasyon süresi değişmemesine ve doz azalmasına (dilüsyon) canlı hücre azaltıcı etki göstermesi, doz-etki grafiğinde anlamlı bir sapmaya neden olmamıştır. Seyreltme artınca standart sapma artmaktadır, sitotoksik etkisi de artmıştır.

Çalışmamızda kurutulmuş Boz Armut ekstresinin seyreltilmiş konsantrasyonlarında A375 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi saptanmıştır. Kurutulmuş boz armuttan elde edilen ekstrelerin kullanım alanları ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

VI. ÖNERİLER

Boz armut doğada kendiliğinden yetişen bir meyve olarak bulunmaktadır.

Boz armut içerisinde bulunan antioksidan özelliği sayesinde kanser hücrelerini arttırıcı özelliğe sahip olmamaktadır.

Günümüzde kemoterapilerin yat etkisini azaltmaya yönelik doğal gıdalarla en az etkiye düşürmede takviye olarak kullanılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara örnek olabilir.

Taze boz armut çalışması yapılarak boz armutun içinde bulunan kimyasal bileşikler ve bunların biyoaktivite sonucunda elde edilen ekstraktlardan, fonksiyonel beslenme, tıp ve sağlık, gıda katkı maddesi üretiminde yararlanılabilir.

Başka kanser hücresi üzerinde farklı konsantrasyonlar denenerek antioksidan, antikanserojen etkisine bakılabilir.

Boz armutun sağlık üzerine etkiye dayalı ilaç veya besin takviyesi geliştirilebilir.

VII. KAYNAKÇA

KİTAPLAR

- ANTONIO R. POMBINHO, VINCENT LAIZE, DUARTE M. MOLHA, SANDRA M.P., and MARQUES, M. (2004). **Leonor Cancel Cell Tissue Res** 315:393–406
- BAYTOP, A. (2004). **Türkiye’de Botanik Tarihi Araştırmaları**, Tübitak Yayınları Akademik Dizin. Ankara.
- BELL, R.L., JANİCK, J., & MOORE, J. N. (1996). **Pears. Fruit Breeding Volume I**, Tree and Tropical Fruits. John Willey and Sons Press, New York, 632 pp.
- DIRR, M.A., (1998). **Manual of woody landscape plants: Their identification, ornamental characteristics, culture, propagation and uses**. Fifth Ed. Stipes Publishing Co. Champaign, IL.
- GARTNER, L.P., and HIATT, J.L. (1997). **Colour Textbook of Histology**. WB Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- JAKOBY, W.B., KETLEY, J.N., & HABIG, W.H. (1976). Rat Glutathione S-Transferases: Binding and Physical Properties. In **Glutathione: Metabolism and Function** (Edited by ARIAS I. M. & JAKOBY W. B., pp. 213-223. Raven Press, New York.
- KAYACIK, H. (1982), **Orman ve Park Ağaçları Sistematiği III**, İ.Ü: O.F Yayın NO: 321, 352 s, İstanbul.
- SARI, İ. (2020). **Çok Önemli Tavsiyeler**.
- UYSAL, M. (2006). “Serbest radikaller ve oksidatif stres”. (Ed.). Gürdöl F., Ademoğlu E. **“Biyokimya”**. Nobel Tıp Kitabevleri.

MAKALELER

- AKPOLAT, M., TOPÇU TARLADAÇALIŞIR, Y., Uz YH., SAPMAZ METİN, M., ve KIZILAY, G. (2010). “Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri”, **Yeni Tıp Dergisi**, 27: 142-147

- ARJMANDI, M.K., MOSLEMI, D., ZARRINI, A.S., GORJI, M.E., MOSAPOUR, A., HAGHHAGHIGHI, A., et al. (2016). "Pre and post radiotherapy serum oxidant/antioxidant status in breast cancer patients: impact of age, BMI and clinical stage of the disease". **Rep Pract Oncol Radiother**, 21(3):141-8.
- BARRA, D., SCHININA, M.E., SIMMACO, M., BANNISTER, J.V., BANNISTER, W.H., ROTILIO, G., et al. (1984). "The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase". **J Biol Chem**, 259:12595-601
- BUTLER, R.J., REDFERN, E.J., HOLLAND, P. (1994). "Children's notions about enuresis: and the implication for treatment". **Scand J Urol Nephrol, (Suppl)**, 163:39-57.
- BUTTNER, E. H. (2001). "Examining Female Entrepreneurs" Management Styles: An Analysis. Using a Relational Frame. **Journal of Business Ethics**, 29, 253-269.
- CAKILCIOGLU, U., TURKOGLU, I. (2010). "An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig, Turkey)". **Journal of Ethnopharmacology**. 132: 165-175.
- CAN, Z., ADANALI, G., ve YILMAZ, S. (1997). "Doku kültürü". **Türkiye Tıp Dergisi**, 4:53-7.
- CANSARAN, A., KAYA, Ö.F., YILDIRIM, C. (2007). Ovabaşı, Akpınar, Güllüce ve Köseler köyleri (Gümüşhane/ Amasya) arasında kalan bölgede etnobotanik bir araştırma. **Fırat Üniversitesi Fen Müh Bil Dergisi**, 9: 243-57.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., VAN-ZANDEN, J., and VAN BLADEREN, P.J. (2001). "The Interplay of Glutathione Related Processes in Antioxidant Defense". **Environ Toxicol Pharmacol**. 10(4): 141- 152
- ÇELİK, F., KAZANKAYA, A., ERCİŞLİ, S. (2009). Fruit characteristics of some selected promising rose hip (*Rosa* spp.) genotypes from Van region of Turkey. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 4 (3): 236–240.

- EPPERLY, M.W., DEFILIPPI, S., SIKORA, C., GRETTON, J., GREENBRGER, J.S. (2002). "Radioprotection of lung esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene". **Mil Med**, 167: 71-73.
- ERCİSLİ, S. (2004). "A short review of the fruit germplasm resources of Turkey". **Genetic Resources and Crop Evolution**, 51(4), 419-435.
- ERCİŞLİ, S., ve ORHAN, E. (2007). "Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits". **Food Chem.** 103, 1380-1384.
- FATTMAN, L.M., and SCHAEFER, T.D. (2003). Oury. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radical Biology and Medicine**, 35(3): 236-256
- GARGETT, C.E., SCHWAB, K.E., DEANE, J.A. (2016). "Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years". **Hum Reprod.** 22:137–63
- GERSTER, H. (1993). "Anticarcinogenic effect of common carotenoids", **Internat. J. Nutr. Res.** 63: 93-121.
- GÜLTEKİN, H.C., GEZER, A., ve YÜCEDAĞ, C., (2006). "Bazı Ahlat (*Pyrus L.*) türlerinin tohum özellikleri ve çimlendirme olanakları üzerine araştırmalar". **Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi**, Seri: A, Sayı 2, ISSN:1302–7085, s:80–88.
- HARRISON, R.G. (1907). "Observations on the living developing nevre fibers". **Proc Soc Exp Biol Med.** 4:140-3.
- JURIKOVA, T., ROP, O., MLCEK, J. et al. (2012). Phenolic profile of edible honeysuckle berries (genus *Lonicera*) and their biological effects. **Molecules**, 17: 61–79.
- JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., and LETH, T. (1998). "Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavonones in fruits, vegetables and beverages by highperformance liquid chromatography with photodiode array and massspectrometric detection". **Journal of Chromatography A**, 799, 101-110.
- KARAKAYALI, F.Y., EKİCİ, Y., SEVMİŞ, Ş., PEHLİVAN, S., ARAT, Z., ve MORAY, G. (2007). "Meme Kanseri için Risk Belirlenmesinde Gail Modeli". **Ulusal Cerrahi Dergisi**, 23(4): 129-135.

- KARAMAN, B.E., KÖSELER, E., (2017). “Zerdeçalın Kronik Hastalıklarla İlişkisi The Relationship Between Turmeric and Chronic”, **Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi**, 2(2), 96-112
- KUMAR, S., WEST, D.C., and AGER, A. (1987). “Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels”. **Differentiation**, 36:57-70.
- KUNDAKOVIC, T., CIRIC, A., STANOJKOVIC, T., SOKOVIC, M., and KOVACEVIC, N. (2014). “Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Pyrus pyrastrer* Burgsd. and *Pyrus spinosa* Forssk. (Rosaceae),” **African Journal of Microbiology Research**, vol. 8(6), pp. 511-518, 5 February 2014.
- KUSHLEIKA, J., CHECKOWAY, H., WOODS, J.S., JAI-DONG, M., SMITH-WELLER, T., FRANKLIN, G.M., SWANSON, P.D. (1996). “Selegiline and lymphocyte superoxide dismutase activities in Parkinson’s disease”. **Ann Neurol**, 39: 378-381.
- LAUREN M.F. MERLO, J.W. PEPPER, B.J., REID ,C.C. (2006). “Maley Cancer as an evolutionary and ecological process”. **Nature Reviews Cancer**. vol. 6, pp. 924–935.
- LEVIN, E.G., and OSBORN, K.G. (1997). “The expression of endothelial cell tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location”. **J Cell Sci**, 11:139-48.
- MARCUS, D.L., STRAFACI, J.A. ve FREEDMAN, M.L. (2006). “Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer’s Disease”. **Med Sci Monit**, 12, 8- 14.
- MCCORD, J.M., and FRIDOVICH, I., (1969). **Fed. Proc.**, 26, 346.
- MORIN O, PATRY P, LAFLEUR L. (1984). Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. **J Cell Physiol**, 119:327-34.
- NOWELL, P. (1976). “The clonal evolution of tumor cell populations”. **Science**, 194(4260), 23–28. doi:10.1126/science.959840.
- OBERLEY, T.D. (2002). “Oxidative damage and cancer”. **Am J Pathol**. 160(2):403–408. [PubMed: 11839558].

- OKTAR, F., TUYEL, U., DEMİRKOL, N., GUNDUZ, O., SAMUR, R., KANNAN, S., and AGATHOPOULOS, S., (2010). “A new safe method to produce bioceramic nano-powders from nacre venus verrucosa. Artificial Organs Conference, FYROM”, **International Journal of Artificial Organs**, (Special Issue)
- PAREJO, L., CODINA, C., PETRAKIS, C., and KEFALAS, P. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTAinduced luminol chemiluminescence and DPPH center dot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 44, 507-512.
- PENG, C., WANG, X., CHEN, J., JIAO, R., WANG, L., LI, Y.M., et al. (2014). Biology of ageing and role of dietary antioxidants. **Biomed Res Int**.
- PISOSCHI, A.M., and POP, A. (2015). “The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review”. **Eur J Med Chem**. 97:55-74.
- PRINZ, H.. (2015). Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. **Journal of Chemical Biology**, 3(1), 37–44.
- REITER, R.J., MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., POEGGELER, B., BARLOW-WALDEN, L., CHUANG, J., ORTIZ, G.G., and ACUNA-CASTROVIEJO, D. (1995). “A review of the evidence supporting melatonin’s role as an antioxidant”. **J Pineal Res**. 18(1): 1-11.
- SA, G., DAS, T., and BONERJEE, S. (2010). “Division of Molekuler Medicine”, **Bose Institute Ameen Journal Medicine Sciences**, vol;3
- SEBAUGH, J.L. (2011), “Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation”. **Pharmaceut. Statist.**, 10: 128-134.
- SEN, S., and CHAKRABORTY, R. (2011). “The Role of Antioxidants in Human Health. American Chemical Society”, **Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy**. Chapter 1: 1-37.
- SMIRNOVA, G.V., MUZYKA, N.G., GLUKHOVCHENKO, M.N., and OKTYABRSKY, O.N. (2000). “Effects of menadione and hydrogen peroxide on glutathione status in growing Escherichia coli”. **Free Rad. Biol. Med.**, 28(7):1009-16.

- STAGOS, D., AMOUTZIAS, G.D., ANTONIOS, M., SPYROU, A., ARISTIDES, M., TSATSAKIS, D.K. (2012). "Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols". **Food and Chemical Toxicology**, Volume 50, Issue 6, June 2012, p. 2155-2170.
- ŞENGÜL, M., TOPDAŞ, E.F., DOĞAN, H., SERENCAM, H. (2018). "Artvin İlinde Geleneksel Olarak Üretilen Bazı Marmelat Çeşitlerinin Çeşitli Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ile Antioksidan Aktiviteleri ve Fenolik Profillerinin Araştırılması". **Akademik Gıda**, 16(1):51-59.
- VOLPE, D.A., HAMED, S.S., and ZHANG, L.K. (2013). "Use of different parameters and equations for calculation of IC₅₀ values in efflux assays: potential sources of variability in IC₅₀ determination". **The AAPS Journal**, 16(1), 172–180.
- WALLACE, T.L., and PORTER, R.H.P., (2011). "Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease" **Biochemical Pharmacology**, 82:891–903.
- YAZICI, K., ve GÜLGÜNASLAN, B., (2016). "TR83 İllerinde Süs Bitkileri Sektörünün Mevcut Durumu ve Geliştirilmesi Üzerine Bir Araştırma", **Selçuk Gıda Tarım Bilimleri Dergisi**, Sayı: 1, Cilt: 3, s. 18-24.
- YAZIR, Y., ve DALÇIK, H. (2012). "Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü", **Koşuyolu Kalp Dergisi**, 15(3):137-142
- YERLİTÜRK, F.Ü., ARSLAN, O., SİNAN, S., GENCER, N., ÖZENSOY, Ö., (2008). "Characterization of Polyphenoloxidase from Wild Pear (*Pyrus elaeagnifolia*)". **Journal of Food Biochemistry**, 32: 368–383.
- YEŞİLYURT, E., ŞİMŞEK, I., TUNCEL, T., AKAYDIN, G., YEŞİLADA, E. (2016). "Folk Medicine in Selected Towns of the Marmara Subregion (Turkey)". **Marmara Pharmaceutical Journal**, 21(1), 132-148.
- YILDIZ, Ö., ve DEMİR, G. (2004). "Kanser ve Beslenme". **Sağlık ve Hastalıkta Beslenme Sempozyum Dizisi**, No: 41, s. 45-57.
- YILMAZ, K.U., UZUN, A., CAM, M., & ERCİSLİ, S. (2014). "Some morphological and fruit characteristics of naturally grown *Pyrus elaeagnifolia* Pall. of Kayseri Province (Central Anatolia, Turkey)". **Genetic Resources and Crop Evolution**, 62(5), 711–720. doi:10.1007/s10722-014-0190-6

- YOUNG, I.S., and WOODSIDE, J.V. (2001). "Antioxidants in Health and Disease". **J Clin Pathol.** 54(3): 176-186.
- ZELKO, I.N., MARIANI, T.J., and FOLZ, R.J. (2002). "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression". **Free Radical Biology & Medicine**, 33(3): 337-349
- ZHONG, H., DE MARZO, A.M., LAUGHNER, E., LIM, M., HILTON, D.A., ZAGZAG, D., and SIMONS, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. **Cancer Res.**, 59(22):5830.

TEZLER

- GÜDÜCÜ, F. (2014). "Pyrus elaeagrifolia bitkisi ekstralarının fenolik madde içerikleri, DPPH radikali giderme aktiviteleri ve in vitro antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi". (Master's thesis), Trakya Üniversitesi.
- KARTAL, E. (2013). "Ahlat ve Kozalak Meyvelerinin Yüksek Lifli Tahıl Ürünlerinde Kullanımı". (yüksek lisans tezi), Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- KEÇECİ, L.D. (2017). "Hakkâri yöresi üstün nitelikli ahlat (Pyrus elaeagrifolia L.) genotiplerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi". (Master's thesis), Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- KEÇECİ, S. (2018). "Afyonkarahisar Büyükkalecik Florasına Ait Ahlat (PYRUS ELAEAGNİFOLİA) Bitkisi Özütünün Bazı Kimyasal Özelliklerinin İncelenmesi", (Yüksek lisans tezi), Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- YAYLALI, C., (2007), "Tendon Kılıfı Fibroblastlarının Hücre Kültüründe Tenositlere Farklılaşması ve Tenositlerin Sentezlediği Kollajen Tiplerinin Belirlenmesi", (Yüksek lisans tezi), Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- YILDIRAN-YILMAZ, H. (2008), "Sarımsak Sapları ile Beslemenin İnek Sütü Bileşimine Olan Etkilerinin Saptanması". (Yüksek lisans tezi), Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı soyadı: Sinem TAŞ

Doğum tarihi: 1995

Yabancı dil bilgisi: İngilizce orta seviyede

E-posta adresi: sinem27tas@gmail.com

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Doğu Akdeniz Üniversitesi	2013-2017
Yüksek Lisans	Beslenme ve Diyetetik	İstanbul Aydın Üniversitesi	2017- Devam ediyor

C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

-Gentofit Nişantaşı 07.06.2018. – 4 Ay (Firma Diyetisyeni)

-Dietto 01.04.2019 – Devam ediyor (Firma Diyetisyeni)

D. KLİNİK ARAŞTIRMALARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER

İyi klinik uygulamaları (İKU) ve klinik araştırma konularında eğitim alınmışsa, alınan kurum/kuruluşun adı ve tarihi ile lütfen belirtiniz: -

Varsa, araştırmacı olarak katılan klinik araştırmaları lütfen belirtiniz: -

Varsa, izleyici (monitör) olarak katılan klinik araştırmaları lütfen belirtiniz: -

Varsa, saha görevlisi olarak katılan klinik araştırmaları lütfen belirtiniz: -

Varsa, araştırma eczacısı olarak katılan klinik araştırmaları lütfen belirtiniz: -