

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Momordica charantia ÖZÜTÜNÜN MİDE KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Kübra EREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORCID: 0000-0003-3305-5131

DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim PİRİM

2023- İZMİR

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***Momordica charantia* ÖZÜTÜNÜN MİDE KANSERİ HÜCRELERİ**
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Kübra EREN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORCID: 0000-0003-3305-5131

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim PİRİM

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2022-TYL-SABE-0015 Proje numarası ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

2023- İZMİR

KABUL VE ONAY

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Prof. Dr. İbrahim PİRİM tarafından yürütülmüş olan “Momordica charantia Özütünün Mide Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 17 / 08 / 2023

Tez Danışmanı :

Prof. Dr. İbrahim PİRİM 0000-0001-8485-3286

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye :

Doç. Dr. Melek PEHLİVAN 0000-0001-8755-4812

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Üye :

Dr. Öğr. Üyesi Levent ELMAS 0000-0002-6865-6466

Bakırçay Üniversitesi

ONAY : Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hatice YILDIRIM SARI

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

o Tezimin/Raporumun Mart 2024 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum. (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

o Tezimin/Raporumun Mart 2024 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

Kübra EREN

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Tez Danışmanım Prof. Dr. İbrahim Pirim danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip elebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

Kübra EREN

TEŞEKKÜR

'*Momordica charantia* Özütünün Mide Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması' başlıklı yüksek lisans tezimde bütün desteklerinden dolayı değerli danışmanım Prof. Dr. İbrahim Pirim'e; değerli hocalarım, Prof. Dr. Tülay Kılıçaslan Ayna'ya, Prof. Dr. Mustafa Soyöz'e ve Doç. Dr. Melek Pehlivan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca bilgi ve deneyimlerini bende esirgemeyen arkadaşlarım H. İlayhan Karahan, Aslı Eldem, Burcu Çerçi Alkaç, Aslı Özkızılcık Koçyiğit ve Tuba Öz'e teşekkür ederim.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Koordinatörlüğü'ne (BAP) yüksek lisans tez desteği verdiklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bitki ekstraktlarının hazırlanma sürecinde benden bilgi, deneyim ve imkanlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı Araş. Gör. Dr. Zekiye Işın Yazıcı Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Berrin Tunca ve doktora öğrencisi Çağla Tekin'e mide kanser hücre hattını paylaştıkları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm süreçte bana her türlü desteği sağlayan babam Mehmet Eren, annem Hasibe Eren, ablam Yasemin Erbay ve kardeşim M. Akif Eren'e teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Kübra EREN

***Momordica charantia* ÖZÜTÜNÜN MİDE KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

İzmir, 2023

Giriş ve Amaç: Ülkemizde Kudret Narı olarak bilinen *Momordica charantia* (MC) bitkisinin yararlı etkileri çok eski zamanlardan beri bilinmektedir. Toplum tarafından şifalı olarak değerlendirilen MC bitkisi zengin içeriği nedeniyle mide rahatsızlıkları ve diyabet gibi hastalıklarda tamamlayıcı tedavi olarak kullanılmış ve kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir. Bu amaçla, bitkinin içeriğindeki bileşiklerin etkileri çeşitli kanser hücre hatlarında araştırılmış ve kanser hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkinliklere sahip olabileceği gösterilmiştir.

Mide kanseri, genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklanan ve farklı evrelerde gelişen bir malignitedir ve tedavisi için geleneksel yöntemlerin yanı sıra alternatif veya tamamlayıcı tedavi seçenekleri üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada, Kudret Narı bitkisinin meyvesinden elde edilen özütün mide kanseri hücre hattı (AGS) üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkinliği değerlendirilmiş ve yara iyileşmesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Materyal-Metot: Bu tezde, MC meyve özütünün mide kanseri hücre hattı AGS'de antitümör etkisi MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür), RT-PCR, Western Blot, yara iyileştirmesi deneyleri ile incelendi ve AGS hücrelerindeki morfolojik değişiklikler Tripan mavisi ile gözlemlendi..

Bulgular: MC uygulamasının AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi kullanılarak belirlendi ve Yarı-Maksimal İnhibisyon Konsantrasyonu (Half-maximal

inhibitory concentration, IC₅₀) değeri 48 saatlik uygulamada 607µg/ml olarak bulundu (p<0.001). Yara iyileşmesi deneyinde, kontrol hücreleri 72. saatte neredeyse tamamen kapanmışken, MC meyve özütü uygulanan hücrelerde yaranın kapanmadığı gözlemlendi (p<0.0001). Tripfan mavisi ile boyanan hücreler mikroskop altında incelendiğinde, özüt uygulanmayan hücrelerin membran bütünlüğünü koruyarak boyayı hücre içine almadığı görüldü. Özüt uygulanan hücrelerde ise hücrelerin %50'sinde membran yapısının bozulduğu ve boyandığı gözlemlendi. Kontrol hücrelerine göre MC uygulanan AGS hücrelerinde *Kaspaz-3* geninin mRNA ekspresyon seviyesinin 0,74 kat azaldığı, *Kaspaz-3* protein ekspresyonunun ise 0,72 kat inhibe edildiği tespit edildi.

Sonuç: MC meyve özütünün antikanser etkileri AGS mide kanseri hücrelerinde incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda MC özütünün, AGS hücrelerinde sitotoksikite göstererek antikanser etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptotik yolda önemli bir rol oynayan *Kaspaz-3* geninin mRNA ve protein ekspresyonunun 48 saat MC uygulanan AGS hücrelerinde kontrol hücrelerine göre azaldığı gözlemlenmiştir. MC özütünün AGS hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin apoptoz yolağında rol alan *Kaspaz-3* üzerinden gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. MC bitkisinin hangi hücre ölüm mekanizmaları aracılığıyla sitotoksik etki gösterdiğinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Momordica charantia*, Mide Kanseri, Antikanser, Tamamlayıcı Tedaviler.

ABSTRACT

Kübra EREN

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF *Momordica charantia* EXTRACT ON GASTRIC CANCER CELLS

MSc in Medical Biology and Genetic

İzmir, 2023

Introduction and Aim: The medicinal effects of the *Momordica charantia* (MC) plant, known in our country as Kudret Nari, have been known since ancient times. MC plant, which is considered as medicinal by the society, has been used as a complementary treatment in diseases such as stomach disorders and diabetes due to its rich content and has become the focus of cancer research. For this purpose, the effects of the compounds contained in the plant have been investigated in various cancer cell lines and it has been shown that it may have cytotoxic and apoptotic activities in cancer cells.

Gastric cancer is a malignancy caused by genetic and environmental factors and develops at different stages and research on alternative or complementary treatment options as well as traditional methods for its treatment continues.

In this study, we evaluated the cytotoxic and apoptotic activity of the extract obtained from the fruit of the pomegranate plant on gastric cancer cell line (AGS) and investigated its effect on invasion ability.

Material-Method: In this thesis, the antitumor effect of the MC fruit extract was investigated using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), RT-PCR, Western Blot, and wound healing experiments, and morphological changes on the AGS cells were observed using Trypan blue.

Finding: The cytotoxic effect of MC treatment on AGS cells was determined using MTT assay and the Half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value was 607µg/ml

at 48 hours ($p < 0.001$). In the wound healing experiment, it was observed that the control cells were almost completely closed at 72 hours, while the wound was not closed in MC fruit extract treated cells ($p < 0.0001$). When the cells stained with trypan blue were examined under a microscope, it was observed that the cells without extract did not take the dye into the cell by maintaining the membrane integrity. In extract-treated cells, membrane structure was disrupted and stained in 50% of the cells. It was observed that the mRNA expression level of *Caspase-3* gene decreased 0.74-fold in MC-treated AGS cells compared to the control cell line. In addition, *Caspase-3* protein expression was inhibited 0.72-fold by Western blot analysis.

Result: The anticancer effects of MC fruit extract were investigated in AGS gastric cancer cells. As a result of the experiments, MC extract was found to have anticancer effect by showing cytotoxicity in AGS cells. It was observed that mRNA and protein expression of *Caspase-3* gene, which plays an important role in the apoptotic pathway, decreased in AGS cells treated with MC for 48 hours compared to control cells. It is necessary to further investigate which cell death pathways mediate the cytotoxic effect of MC extract in AGS cells.

Keywords: *Momordica charantia*, Gastric Cancer, Anticancer, Complementary Therapies.

İÇİNDEKİLER

Onay	i
Yayımlama Ve Fikri Mülkiyet Hakları Beyanı.....	ii
Etik Beyan.....	iii
Teşekkür.....	iv
Özet	v
Abstract.....	vii
İçindekiler	ix
Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini.....	xii
Şekiller Dizini	xiii
Tablolar Dizini	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Tanımı Ve Özellikleri.....	2
2.1.2. Tanı Ve Tedavisi.....	3
2.1.2.1. Kanser Tedavisinin Yan Etkileri	4
2.1.2.2. Kanserde Bitkisel Tedavilerin Rolü.....	4
2.2. Mide Kanseri	5
2.2.1. Epidemiyoloji	6
2.3. Apoptoz	6
2.3.1. Apoptoz Mekanizması.....	7
2.4. <i>Momordica Charantia</i> (Mc)	8
2.4.1. Genel Özellikleri	8
2.4.2. Kullanım Alanları	9
2.4.3. Bileşenleri.....	10
2.4.4. Antikanser Özelliği	10
2.4.5. Dezavantajları.....	11
2.5.6. Önceki Çalışmalar Ve Bulgular	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Araştırmanın Tipi.....	13
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	13

3.3. Araştırmanın Evreni Ve Örneklemi	13
3.4. Çalışma Materyali	13
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	13
3.6. Veri Toplama Araçları	14
3.6.1. Kullanılan Cihazlar Ve Kimyasal Maddeler	14
3.6.2. Deneysel Çalışmalar.....	15
3.6.2.1. Mc Meyve Özütünün Hazırlanması.....	15
3.6.2.2. Hücre Kültürü	16
3.6.2.2.1. Hücre Hattının Temini	16
3.6.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması.....	17
3.6.2.2.3. Hücrelerin Takibi Ve Pasajlanması	17
3.6.2.2.4. Tripın Mavisini İle Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi Ve Hücre Sayımı	18
3.6.2.2.6. Hücrelerin Stoklanması.....	18
3.6.2.3. Sitotoksikite Deneyi (Mtt).....	19
3.6.2.4. Tripın Mavisini İle Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	19
3.6.2.5. Yara İyileşmesi Deneyi.....	20
3.6.2.6. Gerçek Zamanlı Pcr (Real-Time Pcr, Rt-Pcr) Analizi	20
3.6.2.6.1. Rna İzolasyonu.....	20
3.6.2.6.2. Komplementer Dna (Complamenter Dna, Cdna) Sentezi	21
3.6.2.6.3. Gradyent Pcr	22
3.6.2.6.4. Jel Elektroforezi	23
3.6.2.6.5. Rt-Pcr Analizi	24
3.6.2.7. Western Blot Analizi	25
3.6.2.7.1. Hücre Protein Lizatının Hazırlanması.....	25
3.6.2.7.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü (Bradford Protein Tayini).....	25
3.6.2.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel (Sds-Page).....	26
3.6.2.7.4. PvdF Membrana Transfer	27
3.6.2.7.5. Bloklama.....	27
3.6.2.7.6. Primer Antikor İle İnkübasyon.....	28
3.6.2.7.7. Sekonder Antikor İle İnkübasyon	28
3.6.2.7.8. Görüntüleme	28
3.6.2.7.9. Membranın Strip Edilmesi (Membranın Antikorlardan Uzaklaştırılması).....	28
3.6.2.8. İstatistiksel Veri Analizi	29
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41

KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

ATP: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)

β : Beta

bç: Baz Çifti

BSA: Bovine Serum Albumine

cDNA: Komplementer DNA (Complamenter DNA)

CTL: Sitotoksik T Hücreleri (Cytotoxic T Lymphocytes)

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksirübo Nükleik Asit

HRP: Horseradish Peroksidaz

IC₅₀: Yarı-Maksimal İnhibisyon Konsantrasyonu (Half-maximal Inhibitory Concentration)

MC: *Momordica charantia*

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)

NK: Doğal Öldürücü (Natural Killer)

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)

PI: Propidium İyodür

RIP: Rribozomu İnaktive Eden Protein (Ribosome Inactivating Protein)

ROS: Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

RT-PCR: Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR)

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel

TM: Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)

UV: Ultraviyole

Şekiller Dizini

Şekil 1. Olgunlaşmamış MC meyvesi.....	8
Şekil 2. Olgunlaşmış MC meyvesi.....	9
Şekil 3. Deney akış şeması.....	15
Şekil 4. MC meyve ekstraktının hazırlanış şeması.....	16
Şekil 5. AGS mide kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü (10X).....	17
Şekil 6. Gradyent PCR koşulları.....	23
Şekil 7. AGS hücrelerine karşı MC meyve özütünün MTT değerleri.....	30
Şekil 8. Tripan mavisi ile boyanan hücrelerin morfolojik görüntüleri.....	31
Şekil 9. MC uygulanan AGS hücrelerindeki ve kontrol hücrelerindeki yaraların 0, 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri.....	32
Şekil 10. Yara iyileşmesi deneyi yara kapanma analizleri.....	33
Şekil 11. <i>Kaspaz-3</i> için gradiyent PCR ampliconlarının agaroz jel görüntüleri.....	34
Şekil 12. 48 saat MC uygulanmış AGS hücreleri üzerindeki <i>Kaspaz-3</i> ekspresyonu.....	35
Şekil 13. Western Blot analizi ve miktar tayini.....	36

Tablolar Dizini

Tablo 1. Kemopreventif ajanların moleküler hedef üzerine etkileri	5
Tablo 2. Projede kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler	14
Tablo 3. AGS mide kanseri hücre hattı özellikleri	16
Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları	21
Tablo 5. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon koşulları	22
Tablo 6. Gradyent PCR bileşenleri ve miktarları	22
Tablo 7. Primer dizileri	23
Tablo 8. RT-PCR bileşenleri ve miktarları	24
Tablo 9. Liziz tamponu kimyasalları ve miktarları.....	25
Tablo 10. Ayırıştırıcı jel için gerekli kimyasallar ve miktarları	26
Tablo 11. Yükleme jeli için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	27

1. GİRİŞ

Bitkilerin hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılması 18. yüzyıldan günümüze kadar uzanmaktadır. Modern ilaçların yaklaşık %45'i bitkilerden elde edilmektedir ve bu bitkilerden izole edilen bileşenler, kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların formülasyonunda yer almaktadır.

Bitkilerin geleneksel ve tamamlayıcı tedavideki güvenilirliğini arttırmaya yönelik bu çalışmalarda, yaygın olarak kullanılan bitkilerden biri Kudret Narı olarak bilinen *Momordica charantia* (MC) bitkisidir. Türkiye'de özellikle olgunlaşmış MC meyveleri mide rahatsızlıklarında ve yanıkların iyileşmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda diyabette yardımcı doğal bir ürün olarak da kullanılabilir. Literatür taramasında MC bitkisinin meyvesinden, yaprağından ve tohumundan yapılan ekstraktların farklı kanser hücreleri üzerinde öldürücü etki gösterdiği bildirilmiştir, ancak mide kanseri hücre hatları üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Bu tez kapsamında, MC meyve özütünün AGS mide kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisini ayrıntılı bir şekilde inceledik. Çalışmamızın, MC'nin kanser tedavisinde potansiyel bir doğal ürün olarak kullanımını değerlendirmeye yönelik önemli bulgular sunacağı inancındayız. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, bitkinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü teşvik etme ve hücre çoğalmasını inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu ön görmekteyiz. Bu çalışma, mide kanseri tedavisine alternatif bir yaklaşım sunma ve gelecekte daha kapsamlı in vivo ve klinik çalışmalara temel oluşturma potansiyeli taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanser

2.1.1. Tanımı ve Özellikleri

Kanser, DNA (Deoksirübo Nükleik Asit) tamir mekanizmalarında meydana gelen birikmiş mutasyonlar sonucu hücrenin kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır ve hücre morbidite ve mortalitesinde önemli rol oynamaktadır (1,2). Yüksek mutasyon oranına sahip bireylerde kansere yakalanma riski daha fazladır (1). Genetik bir hastalık olan kanser *p53*, *BRCA1* ve *BRCA2* gibi kalıtsal kanser genlerindeki değişimlerden meydana gelmektedir (3). Ayrıca sigara, alkol, çeşitli kimyasallar, UV (ultraviyole) ışınları ve obezite gibi çevresel faktörler (epigenetik) de kanser üzerinde önemli rol oynamaktadır (3–5).

Kanserin meydana gelmesinde önemli role sahip üç gen grubu vardır (3). Bunlar;

1. Tümör baskılayıcı genler,
2. Proto-onkogenler,
3. DNA onarım genleri.

Yüksek ölüm oranına sahip olan kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır ve meme, prostat, kolon, mide kanseri gibi yaklaşık 100 farklı kanser çeşidi vardır (6,7). Hücreler devamlı olarak kendilerini yenileyerek yaşamsal faaliyetlerin devamlılığını sağlarlar. Ömrü dolan hücreler ölümlerini yeni hücrelere bırakırlar. Aşırı proliferasyon sonucu meydana gelen anormal gelişimlerin engellenmesinden sorumlu genlerin işlevini yerine getirememesi ve bazı faktörlerin etkisiyle hücreler kontrolsüz bölünmeye başlar ve anormal bir oluşum meydana getirirler (8). Kanserin gelişimi, tümörün büyümesini ve ilerlemesini mümkün kılan biyolojik değişikliklerin ve edinilmiş yeteneklerin bir dizi dahilinde gerçekleşmesiyle mümkündür. Kanser hücrelerinin bu yetenekleri, kanser hücrelerinin mekanizmalarını anlamaya yardımcı olsa da tümör mikroçevresi her kanser türünde farklılık göstermektedir (9). Kanser hücreleri büyümek için oksijen ve besine ihtiyaç duymaktadır. Anjiyogenez ile kanser hücreleri besin ihtiyacını karşılamakta ve

metastaz ile sağlıklı dokulara göç edebilmektedir (6). Metastatik özellikler kazanmış kanser hücrelerinin tedavisi oldukça zordur ve ölüm riski oranı yüksektir (10).

Normal hücreler, hücre döngüsündeki büyüme sinyalleri ile kontrollü bir şekilde büyüyüp bölünerek çoğalmaktadır. Kanser hücreleri mevcut mekanizmaları bloke ederek hücreyi koruyucu hücresel ve moleküler yolları atlatarak sağ kalmakta ve çoğalabilmektedir. Yani kanser hücreleri yeni mekanizmalar oluşturmamakta, var olan mekanizmaların işleyişini bozmaktadır (11). Bu yüzden genler tarafından düzenlenen sinyal yollarını anlamak, kanser araştırmalarının ilerlemesi için hayati öneme sahiptir (12).

Kanser iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İyi huylu tümörler lokalizedir ve kanserojenik özelliğe sahip değildir. Kötü huylu tümörler ise invaziftir, kanserojenik özellik gösterir ve metastaz ile sağlıklı dokuları istila edebilmektedir (13).

2.1.2. Tanı ve Tedavisi

Kanser teşhisi ve tedavisi, hastalığın yönetimi ve hasta sonuçlarının iyileştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Özellikle erken teşhis, ölüm oranını azaltarak kanserli bireyin iyileşmesini ve hayatta kalmasını sağlamaktadır. Tarama yoluyla erken teşhis, tedavi etkinliğini iyileştirmek ve hayatta kalma şansını artırmak için hayati önem taşımaktadır (14). Yapılan birçok çalışma sayesinde kanserin teşhisi ve tedavisi için önemli faktörler ve yaklaşımlar aydınlatılmıştır (15).

Uygulanacak tedavi kanserin türüne ve evresine bağlı olarak değişiklik göstermekte, tek veya kombinasyon şeklinde tedaviler uygulanabilmektedir (10,16). Kanser için kemoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi, radyoterapi, gen tedavileri, anjiyogenez inhibitörleri ve hedefe yönelik tedaviler gibi bazı mevcut tedavi seçenekleri bulunmaktadır (10,17,18). Birincil ve geleneksel tedavi yöntemi olan kemoterapi, hızla büyüyen ve çoğalan kanser hücrelerini inhibe ederek çoğalmalarını baskılamaya dayalı bir tedavi yöntemidir (10). Bu yöntemler kendi içerisinde değerlendirildiğinde bazı avantaj ve dezavantajlara sahiptir (13).

2.1.2.1. Kanser Tedavisinin Yan Etkileri

Kemoterapi kanser hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak bireyin ömrünü uzatsa da sağlıklı normal hücreler üzerine toksik bir etki göstermektedir. Bazı bireylerin uygulanan kemoterapi ilaçlarına direnç oluşturduğu ve tedaviyi zorlaştırdığı gözlemlenmiştir (10).

Kanser tedavisi gören bireylerde görülen en sık yan etki yorgunluk hissi, ağrı, bulantı ve kusma olarak belirtilmiştir (10). Bazı kanser tedavilerinde ise mukozit, disguzi ve bulaşıcı hastalıklar gibi oral komplikasyonlara da yol açabilmektedir (19).

Kanser tedavisi gören bireyler, tedavinin yan etkisi ve düşük iyileştirme oranından dolayı bitkisel kaynaklara merak duymaya başlamışlardır (20).

2.1.2.2. Kanserde Bitkisel Tedavilerin Rolü

Kemoterapi gibi bazı mevcut tedaviler hedef olmayan hücreler üzerinde yüksek toksik etkiye sahip olduğundan daha az toksik etkiye sahip olduğu düşünülen doğal kaynaklar kanser tedavisinde dikkat çekmektedir (21). Son birkaç yılda yapılan kapsamlı araştırmalar, belirli sebze ve meyvelerin ekstraktlarının düzenli kullanımında bazı kanserlere yakalanma riskinin azalabileceğini ortaya koymuştur. Kemopreventif ajanlar olarak adlandırılan bu sebze ve meyvelerden üretilen fitokimyasallar kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılamakta, apoptozu indüklemekte, anjiyogenezi ve büyüme faktörü sinyal yollarını inhibe etmekte, anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılamaktadır (Tablo 1). Bu kemopreventif ajanların, kanser tedavisi gören hastalarda radyo direnci ve kemorezistansı tersine çevirdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kemopreventif ajanlar mevcut kanser tedavilerine takviye olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (22).

Tablo 1. Kemopreventif ajanların moleküler hedef üzerine etkileri (22)

Moleküler Hedef	Etki
Kanser hücre proliferasyonu	Azalış ↓
Antiapoptotik proteinler	Azalış ↓
Hücre döngüsü proteinleri	Azalış ↓
Büyüme faktörü yolları	Azalış ↓
Apoptozis yolağı	Artış ↑
Anjiyogeneziz	Azalış ↓

Bitkilerden elde edilen bazı biyoaktif bileşenlerin kanser önleyici aktiviteleri olduğu doğrulanmış, bazıları için halen çalışmalar devam etmektedir (23).

2.2. Mide Kanseri

Sindirim sisteminin önemli organlarından biri olan mide, özofagus (yemek borusu) ve ince bağırsak arasında bulunmaktadır. Mide, fiziksel parçalamanın gerçekleşmesi için bazı sindirim enzimleri ve mide asidi salgılamaktadır (3). Mide beş ana katmandan oluşmaktadır. Bunlar; seroza, suberoza, muscularis propria, submukoza ve mukozadır (24). Salgılamamanın yapıldığı kısım midenin en iç katmanında bulunan mukozadır. Mide bezlerinden oluşan mukoza mide kanserinin %90-95'inin gözlemlendiği katmandır (24,25).

Mide kanserinin iki türü vardır. En yaygın türü mide adonekarsinomları iken nadir karşılaşılan türü ise gastrointestinal stromal tümördür (24). Midenin katmanları kanserin derecesini de temsil etmektedir. Kanser diğer katmanlara ne kadar ulaştıysa mide kanseri evresi o kadar ilerlemiş demektir (24).

Mide kanserinin erken evresinde olan bireylerde spesifik bir semptom görülmezken, ilerlemiş evrelerinde kilo kaybı, et türevli gıdaları yiyememe ve anemi gibi semptomlar gözlemlenmektedir (26). Erken evre mide kanseri asemptomatik özellik gösterdiğinden bireylere genel olarak geç evrelerde tanı konmaktadır (4). Kanser tedavisi, kanserin evresine bağlı olarak zorlaşmaktadır (24).

2.2.1. Epidemiyoloji

Kanser türleri arasında beşinci sırada olan mide kanseri, dünya genelinde en sık gözlenen kanser türünden biridir ve kanser kaynaklı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (27). Kansere bağlı ölümler arasında erkeklerde ikinci kadınlarda ise dördüncü sırayı alan mide kanseri, en yaygın karşılaşılan kanser türleri arasındadır (26).

Meme, kolorektal ve prostat kanserine yakalanma sıklığı yüksek olsa da mide kanserine yakalanan bireylerin ölüm oranı bahsi geçen kanser türlerinden daha yüksektir (26).

2.3. Apoptoz

Hücreler bölünerek çoğalır, bir müddet yaşar ve ölür. Hücrelerin çoğalması ile ölümü arasında bir denge bulunmaktadır (28). Hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü gibi farklı isimlerde adlandırılan apoptozun en yaygın kullanılan anlamı; programlanmış hücre ölümüdür (17). Hücreler hasar görmüş, enfekte olmuş veya mutasyona uğramışsa programlı bir şekilde öldürülerek uzaklaştırılmalı, hücre içi denge (homeostaz) sağlanmalıdır (29). Homeostaz sağlanırken hiçbir immün yanıt veya patojenik bir durum oluşmadan hücre ölümü gerçekleşmektedir (17). Apoptoz ile uyarılan hücre, diğer hücrelerle bağını koparır, bulunduğu ortamdan uzaklaşır, kromatinleri yoğunlaşır, hücrede ekstraselüler matriks adhezyonu azalır, hücre büzülür ve DNA nükleozom kısımlarından kesilerek jel elektroforezinde merdiven şeklinde bir görünüm kazanmaktadır (23,28,30). Bu özellikleri ile apoptotik hücrelerin morfolojisi nekroz hücrelerin morfolojisinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (30). Apoptoz sonucu oluşan apoptotik cisimler makrofajlar aracılığı ile tanınmakta ve fagosite edilmektedir. Apoptoz esnasında herhangi bir enflamasyon gözlenmemektedir (28).

Programlı hücre ölümüne örnek olarak embriyonun gelişimi sırasında el ve ayaklardaki bazı hücrelerin apoptoz ile ölmesi sonucu parmakların oluşması ve menstürel dönemde rahim içindeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması verilebilir (29).

Apoptoz mekanizmasındaki bozukluklar sonucunda hücre birikimi veya kaybı meydana gelmektedir ve bunun sonucunda kanser, kalp yetmezliği, nörodejenerasyon gibi bazı hastalıklar ortaya çıkmaktadır (29). Sonuç olarak, kanser tedavisinde apoptoz mekanizmaları önemli rol oynamaktadır (23).

2.3.1. Apoptoz Mekanizması

Hücre ölümünde rol alan sinyaller, iç ve dış faktörler aracılığı ile indüklenmektedir. Bu uyarılara insülin benzeri büyüme faktörü, tümör nekroz faktörü, bazı ilaçlar, koloni uyarıcı faktörler ve glukokortikoidler örnek olarak gösterilebilir (29). Ayrıca çok sayıda gen de apoptozun tetiklenmesinde rol oynamaktadır. Bu genlerden bazıları (*Bax*, *Bid*, *Bad*, *p53*, vs.) apoptoz indükleyici özellik taşıırken, *Bcl-XL*, *Bfl-1*, *Bcl-W*, *c-abl* gibi genler ise apoptozu inhibe etmektedir (23,29). Apoptozda gözlemlenecek bazı biyokimyasal değişiklikler vardır. Bunlar; membran değişikliği, DNA ve protein yıkımı, kaspazların aktivasyonu ve fagozitik hücreler aracılığıyla apoptotik hücrelerin tespiti ve öldürülmesidir (31).

Apoptoz üç yoldan kontrol edilmektedir. Bunlar intrinsik, ekstrinsik ve perforin-granzim yollarıdır (29). İntrinsik yolak aynı zamanda mitokondriyal yol olarak da bilinmektedir. Mitokondri içerisinde bulunan pro-apoptotik molekül ve proteinlerin sitoplazmaya salınması sonucu apoptoz gerçekleşmektedir. Ekstrinsik yolak, transmembran üzerindeki reseptörlerin ölüm ligandlarını algılaması sonucu etkileşime girmekte ve apoptozu indüklemektedir (29). İntrinsik ve ekstrinsik yolda kaspazlar rol oynamaktadır (17). Perforin-granzim yolağında ise bazı apoptoz yolları aktifleştirilerek sitotoksik T hücreleri (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) ve doğal öldürücü (Natural Killer, NK) gibi immün sistem hücreleri ile sinerjik bir etki göstererek kaspazlardan bağımsız bir apoptoz sürecini başlatmaktadır (29).

Kaspazlar, hücre ölüm mekanizmalarının işleyişini anlamaya yardımcı bir araştırma konusudur. Her ne kadar uzun yıllar boyunca kaspaz ailesi için yapılan çalışmaların sayısı artsa da halen oldukça geniş içeriğe sahip bir araştırma alanıdır (32). Kaspazlar inhibitör ve efektör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İnhibitör olanlar *Kaspaz-2-8-9-10* iken efektör olanlar *Kaspaz-3-6-7*'dir (23). *Kaspaz-3*, apoptozun ayırt edicisidir ve *PARP*, *DFP-45* gibi substratları parçalayarak apoptozu

indüklemektedir (33). *Kaspaz-3*, efektör kaspazlar arasında yer almaktadır ve *Kaspaz-8* ve *Kaspaz-9* aracılığıyla aktive olmaktadır. Bu kaspaz, birçok hücrel proteinlerin yapısını bozmakta, DNA'nın parçalanmasında rol almakta ve hücrenin morfolojisinin bozulmasına neden olmaktadır (28).

2.4. *Momordica charantia* (MC)

2.4.1. Genel Özellikleri

Momordica charantia (MC), Cucurbitaceae ailesine ait bir bitkidir (34). Türkiye'de kudret narı olarak bilinen bu bitki, balsam pear, bitter melon, African cucumber, bitter gourd, karela gibi birçok isimle adlandırılmaktadır (29,35). MC, Hindistan gibi tropikal iklim gösteren bölgelerde yetişmesine rağmen dünyanın çeşitli ülkelerinde de yayılım göstermektedir (34,36,37). Acı bir tada sahip olan MC, kabak veya salatalığı andıran bir görünüme sahiptir (34). Meyveleri hamken yeşildir (Şekil 1) ve olgunlaştıkça turuncuya dönmektedir (29). Olgunlaşan meyve üç parçaya ayrılarak çekirdekleri ortaya çıkarmaktadır (Şekil 2). Çekirdeklerin kabuğu meyve olgunlaştıkça sertleşmekte ve çekirdeğin dışı kırmızı bir jel ile kaplanmaktadır (34).



Şekil 1. Olgunlaşmamış MC meyvesi



Şekil 2. Olgunlaşmış MC meyvesi

2.4.2. Kullanım Alanları

Hindistan, Çin ve Tayvan'da genel olarak pişirilerek kullanılan MC, Türkiye'de halk arasında yanıkların iyileştirilmesinde ve mide ağrılarının giderilmesinde yardımcı bitkisel ürün olarak kullanılmaktadır (29). Halk arasında olgunlaşmış MC meyvesi zeytin yağı ile bekletilerek cilt yaralarında ve yanıklarında kullanılırken, bal içerisinde bekletilen MC meyvesi mide rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Çeşitli hücre hatlarında ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar ile MC'nin anti-kanser etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca antioksidan, antidiyabetik, antimikrobiyal, antiülser, antienflamatuvar, antibakteriyel gibi önemli aktivitelere sahiptir (34,36,38). Halk arasında beslenmeden kaynaklı mide rahatsızlıklarının tedavisinde, kan şekerini düzenlenmesinde ve yaraların iyileştirilmesinde genel olarak kullanılan MC; kısırlık, gut, obezite, romatizma, sarılık, hepatit, kabızlık, dismenore, hipertansiyon, HIV, AIDS, pnömoni, sedef hastalığı ve egzama tedavilerinde de destekleyici role sahiptir (29,34,36). MC meyvesinin suyu sarılıkta, kronik ateşte, sindirim bozukluklarında veya idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır (36).

2.4.3. Bileşenleri

C vitamini, A vitamini, fosfor ve demir içeriği bakımından zengin olan MC, tıbbi açıdan oldukça faydalı bir bitkidir (34). MC'nin içerdiği başlıca kimyasal bileşenler şu şekildedir: ribozomu inaktive eden protein (Ribosome Inactivating Protein, RIP), MAP30, momorkarinler ve MC lektin gibi proteinler ve peptitler; arabinoz, galaktoz, ramnoz, glikoz ve mannozdan oluşan heteropolisakaritler; kukurbitanlar ve kukurbitasinler gibi terpenoidler ve saponinler; fenolik bileşikler ve flavonoidler; yağ asitleri, uçucu yağlar, amino asitler ve steroller gibi diğer bileşikler (36). MC bitkisi iyi bir protein, karbonhidrat, lif, mineral ve vitamin (çinko, demir, kalsiyum, fosfor ve magnezyum gibi) kaynağıdır ve yüksek besleyici içeriğe sahiptir (29,36). Tohumları %30 oranında protein içermektedir (39). Olgun meyvelerin tohumlarını çevreleyen zar likopen bakımından oldukça zengindir (35). MC meyvesi %93.2 sudan oluşurken, proteinin kuru ağırlığı %18.02 ve lipidlerin kuru ağırlığı %0.76'sını oluşturmaktadır (36). Olgunlaşmamış meyveler A, P ve C vitaminleri, riboflavin, tiamin, niasin içermektedir. Ayrıca potasyum, demir ve fosfor gibi mineralleri de içerisinde barındırmaktadır (29,36). Meyvenin tohumunu çevreleyen kırmızı zarı ve yaprakları ise sırasıyla %94 ve %89,25 oranında su, %30,7 ve %3,3 oranında karbonhidrat içermektedir (40).

2.4.4. Antikanser Özelliği

Literatürde MC bitkisinin antiviral, antiülser, antidiyabetik, hipoglisemik, antioksidan, antibakteriyel, analjezik, antikanser ve antienflamatuvar gibi birçok farmakolojik özelliği bulunmaktadır (29,37).

Alternatif ve tamamlayıcı tedavilerde MC, adjuvan olarak kullanılmaktadır ve oldukça yüksek bir potansiyele sahiptir. Kanser sinyal yollarındaki proteinlerle etkileşime girmekte ve proteinlerin modülasyonunu sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını önlemek için hücre döngüsündeki proteinleri modüle ederek ya da kontrolsüz çoğalan hücrelerin apoptoza uğramasını veya başka hücre ölüm mekanizmalarını aktifleştirerek antikanser etki göstermektedir (34). Kısacası MC bitkisi, tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmekte, apoptozu indüklemekte, tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini arttırmakta ve hücre içindeki

adenozin trifosfat (Adenosine Triphosphate, ATP) seviyelerini etkilemektedir. Böylelikle antikanser etki göstermektedir (29).

2.4.5. Dezavantajları

Hayvan modellerinde doğurganlığı güçlü bir şekilde azalttığı için üremek isteyen kişiler, MC'nin günlük kullanımını dikkatli bir şekilde düşünmelidir. İnsanlarda en ciddi yan etkiler, aç karnına MC bazlı içecek içtikten sonra glisemide güçlü bir düşüş yaşayan iki küçük çocukta rapor edilmiştir. Hayvanlarda histopatolojik değişiklikler olmaksızın transaminaz artışı rapor edildiğinden karaciğer hastalığı olan hastalarda da dikkatli kullanımı konusunda uyarılar mevcuttur (36). Ayrıca 2014 yılında Tumkiratiwong ve ark. yaptıkları çalışmada erkek Wistar sıçanlarda MC tohumunun kısırlığa yol açtığını bildirmişlerdir (41). Kasılmaları hafiflettiğinde gebelerde düşüğe neden olurken süt yoluyla bebeğe geçebileceğinden emziren annelerin kullanmaması önerilmektedir. MC bitkisinin oral alımı bireylerde yan etki göstermezken damar yoluyla uygulanması toksik etki göstermektedir ve geri dönüşü olmayan komplikasyonlara neden olabilmektedir (42).

2.5.6. Önceki Çalışmalar ve Bulgular

Li ve ark. yaptıkları çalışmada metanol ile hazırladıkları MC ekstraktının Hone-1, AGS, HTC-116 ve CL1-0 kanser hücreleri üzerine etkisini gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri veriler sonucunda MC metanol ekstraktının Kaspaz ve mitokondriyal yollarda rol oynadığını göstermişlerdir. Ayrıca, MC metanol yaprak ekstresinin *Kaspaz-3* ve *DFP-45*'in bölünmesini ve *PARP*'ın aktivasyonunu indükleyerek DNA parçalanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (33).

Pitchakarn ve ark. PLS10 sıçan prostat kanser hücre hattında etanol ile hazırlanmış MC yaprak özütü uygulamışlardır. Yaptıkları çalışma sonrasında etanol MC yaprak özütünün *MMP-2* ve *MMP-9* gen ekspresyonunu baskıladığını ve hücre migrasyonunu önemli miktarda azalttığını gözlemlemişlerdir. Ek olarak *MMP-2*'nin ekspresyonunda inhibitör etki göstermesini sağlayan *TIMP-2* geninin mRNA seviyesinde belirgin bir şekilde artış gösterdiğini bildirmişlerdir (43).

Bir başka çalışmada Kai ve ark. 52 farklı bitkiden elde ettikleri tohum ekstraktlarını 7 lösemi hücre hattıyla (ED, Su9T01, S1T, HUT-102, MT-2, Jurkat ve MOLT-4) muamele etmişler ve MC tohumundan elde edilen ekstraktın ED, Su9T01, S1T, HUT-102, MT-2, Jurkat ve MOLT-4 hücrelerindeki IC₅₀ değerlerini sırasıyla 24,5 µg/ml, 0,3 µg/ml, 85,8 µg/ml, 24,0 µg/ml, 41,7 µg/ml, 32,7 µg/ml ve 87,7 µg/ml bulmuşlardır. Sonuç olarak 52 farklı bitki içerisinde MC tohum ekstraktının en iyi ikinci sitotoksik etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (44).

2021 yılında yapılan çalışmada MC tohumlarından yağ elde edilmiş ve hepatoselüler karsinomlu Wistar sıçanları üzerinde tedavi amaçlı uygulamışlardır. 168 gün sonra kontrol ve tedavi uygulanan fareler üzerinde biyokimyasal, histopatolojik, hematolojik, morfolojik ve tümör baskılayıcı genlerin (*p53*, *Kaspaz-3* ve *Bcl-2*) ekspresyon düzeylerine bakmışlar ve indüklenen hepatoselüler karsinom üzerinde antikanser özellik gözlemlemişlerdir (45). Başka bir Wistar çalışmasında etanol ile hazırlanmış MC tohum ekstraktları özofagus yoluyla erkek sıçanlara verilmiştir. Sıçanların testis histopatolojisi, üreme özellikleri, doğurganlık ve testosteron seviyelerindeki değişiklikleri karşılaştırmışlar ve sperm hareketinde yavaşlama, canlılığında azalma gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak yüksek dozdaki etanol MC tohum ekstraktının erkek sıçanlarda doğurganlığı etkilediğini dolayısıyla kısırlığa neden olduğunu belirtmişlerdir (41).

Thiagarajan ve ark. Hindistan ve Çin kökenli olmak üzere MC bitkisinin sıcak ve soğuk sulu ekstraksiyon yöntemlerini A549 insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerine uygulamış, apoptotik etkileri FICT ve DAPI boyamalar, *Kaspaz 3/7* reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species, ROS) ve *p53* aktiviteleri incelenerek apoptotik etki mekanizmalarını değerlendirmişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda sıcak su ile hazırlanan Çin kökenli MC ekstraktının ROS aracılı mitokondri hasarını aktive ederek, A549 akciğer kanser hücrelerinde tedavi edici etki gösterdiği bulunmuştur. (46).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez konusunun belli olmasıyla birlikte Tez Öneri Formu dolduruldu. BAP projesine başvuruldu ve proje Nisan 2022 tarihinde BAP tarafından onaylanarak desteklendi. Çalışmalar Ekim 2022 – Temmuz 2023 tarihleri arasında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın evreni MC uygulanan AGS mide kanseri hücre hattı ve MC uygulanmayan (kontrol) AGS mide kanseri hücre hattı üzerine kurulmuştur.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, kontrol ve IC₅₀ grubu olmak üzere iki grup çalışılmıştır. Çalışmada, hücre kültürü çalışmalarından elde edilen hücre peletleri, bu peletlerden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar ve protein lizatları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Projenin bağımlı değişkenleri; *Kaspaz-3* genindeki mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler ve *Kaspaz-3* protein ekspresyonundaki değişimlerdir. Bağımsız değişkenler ise; MC meyvesinden elde edilen özütün içindeki bileşenlerin homojenliğindeki değişimlerdir.

3.6. Veri Toplama Araçları

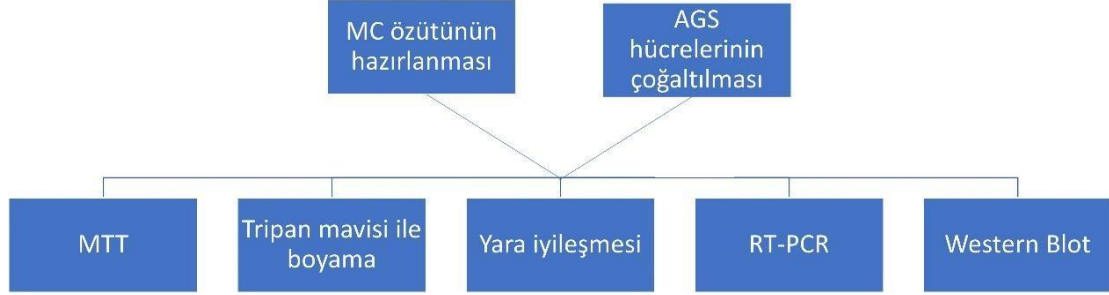
3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Tablo 2. Projede kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Malzeme Adı	Marka/Kod	Kullanım Amacı
Nanodrop	Thermo Nanodrop2000	DNA konsantrasyonunun ölçülmesi
Thermal Cycler	Boeco Germany TC-PRO	İlgili gen bölgelerinin çoğaltılması
Agaroz	Prona	Agaroz jel hazırlama
Elektroforez	Thermo Fisher	Amplikonların kontrol edilmesi
UV Transsimilatör	VILBER LOURMAT ECX-F20.M	Jelde yürütülen ürünlerin görüntülenmesi
Hassas Terazı	Shimadzu TW423L	Agarozun, özütün ve kimyasalların tartılması
Santrifüj	WiseSpin CF-10	Hazırlanan mix'lerin karıştırılması
Mikrodalga	Samsung	Agarozun çözündürülmesi
İnkübatör	İldam	Hücrelerin büyümesi için gerekli koşulların sağlanması
DNA Size Marker	GENESTA 5x Loading Buffer	Agaroz jel yükleme boyası
Ethidium Bromide	Invitrogen	Agaroz jelde DNA fragmanlarının görüntülenmesi
TBE Buffer 10X	A.B.T.	Elektroforez tamponu
DNA Ladder 50 bp	Thermo Scientific GeneRuler	Agaroz jelde DNA merdiveni oluşturma
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)		Hücre canlılığının tespiti
Fetal Bovine Serum	Serox	
Ham's F-12 Cell Culture Medium		Hücreleri beslemek için
Kaspaz-3 Mouse mAb	Cell Signaling (#9668)	Western Blot primer antikor
SYBR® Green Quantitative RTqPCR Kit	A.B.T.	mRNA ekspresyonu tespiti
cDNA Sentez Kiti	A.B.T.	RNA'dan cDNA sentezlemek
RNA İzolasyon Kiti	ECO→Tech	Hücreden RNA izole etmek için

3.6.2. Deneysel Çalışmalar

MC meyve özütünün AGS mide kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve apoptotik özelliklerini değerlendirmek amacıyla yapılacak deneylerin akış şeması Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Deney akış şeması

3.6.2.1. MC Meyve Özütünün Hazırlanması

Eylül 2021 yılında Balıkesir'in 39°14'14.0"N 28°10'23.0"E koordinatından (Rakım: 231 metre) toplanan ham (yeşil) MC meyveleri Ege Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı laboratuvarında Araş. Gör. Dr. Zekiye Işın Yazıcı Kaya eşliğinde ekstrakt haline getirildi (Şekil 4). Yıkanan MC meyveleri kağıt havlu yardımıyla kurulandı. Bistüri yardımıyla ortadan kesilerek içindeki çekirdekler uzaklaştırıldı. Katı meyve sıkacağı yardımıyla MC meyvesinin suyu çıkarıldı. 50 ml'lik falkon tüplerine konularak 4000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi. Süpernatant Whatman kağıdı (No:2) ile süzülerek şilifli balon şişeye (NS 29/32) aktarıldı. 39 °C'de 125 rpm hızda kuruyana kadar Rotary evaporatör (Heidolph) cihazı ile buharlaştırıldı. Şişelerin içerisine tamamen çözülene kadar saf su eklendi. Sıvı 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı ve birkaç gün liyofilize edilerek toz haline getirildi.



Şekil 4. MC meyve ekstraktının hazırlanış şeması

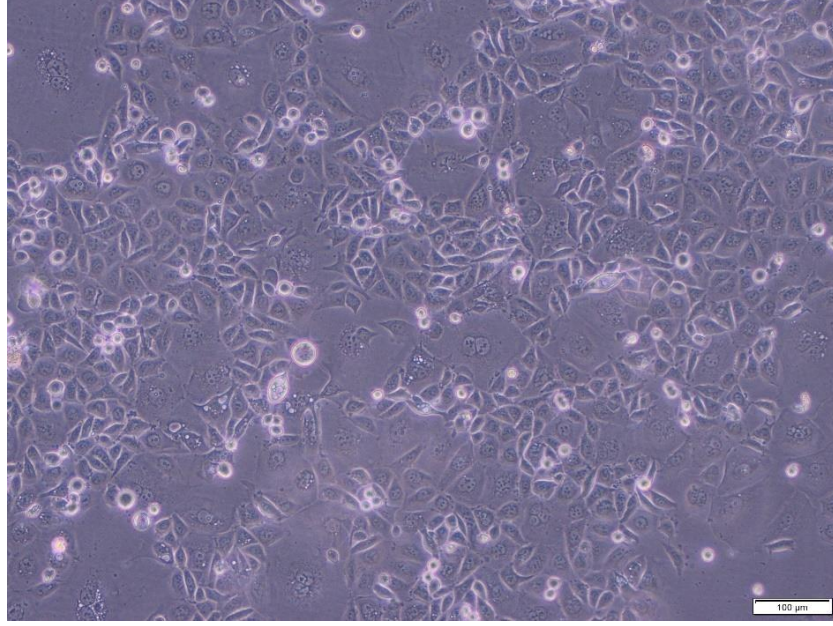
3.6.2.2. Hücre Kültürü

3.6.2.2.1. Hücre Hattının Temini

Tablo 3’te özellikleri gösterilen AGS mide kanseri hücre hattı Bursa Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’ndan Prof. Dr. Berrin Tunca’nın laboratuvarından temin edilmiştir. Hücreler kryo tüp içerisinde kuru buz ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir. Hücrenin morfolojik görüntüsü Şekil 5’te gösterilmektedir.

Tablo 3. AGS mide kanseri hücre hattı özellikleri (25)

Organizma	İnsan (Homo sapiens)
Morfoloji	Epitelyal
Doku	Mide Adenokarsinoma
Hastalık	Gastrik Kanser
Cinsiyet	Kadın
Yaş	52
Büyüme Özelliği	Adherent



Şekil 5. AGS mide kanseri hücre hattının morfolojik görüntüsü (10X)

3.6.2.2.2. Hücrelerin Çoğaltılması

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına soğuk zincir ile gelen AGS mide kanseri hücreleri 2/3'ü çözülene kadar 37 °C'lik su banyosunda dairesel hareketler ile çözdürüldü. Çözünen hücrelerin üzerine hücre ortamı (1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin, 2mM konsantrasyonda L-glutamin ve 10 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren Ham's F-12 Medium) eklenerek 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet 1 ml hücre ortamında pipetaj yapılarak homojen haline getirildi. T25 cm² filtrelili flask'a 5 ml hücre ortamı eklenerek üzerine homojen haldeki hücreler ilave edildi. Hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde bekletilerek hem tutunmaları hem de çoğalmaları sağlandı.

3.6.2.2.3. Hücrelerin Takibi ve Pasajlanması

Flask içindeki hücrelerin doluluk oranı her gün takip edilerek gerektiğinde içindeki hücre ortamı çekilip taze ortam ile değiştirildi. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında Flask içindeki hücre ortamı serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. 1 ml

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, PBS) ile hücreler yıkandı ve PBS aspire edildi. 500 µl Tripsin-EDTA hücrelerin üzerine ilave edildi ve hücrelerin kalkması için 5 dakika inkübatörde (%5 CO₂, 37°C) beklendi. 5 dakika sonrasında hücrelerin kalktığı inverted mikroskopta gözlemlenerek üzerine 5 ml hücre ortamı ilave edildi. Hücreler flask içinden serolojik pipet yardımıyla toplanarak 15 ml'lik falkon tüpüne konuldu ve 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek pelet 1 ml hücre ortamında pipetaj ile homojen haline getirildi. Daha fazla sayıda hücre elde etmek için hücreler T75 cm²'lik flask'a aktarılarak üzerine 11 ml hücre ortamı ilave edildi. Flask 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğalmaya bırakıldı.

3.6.2.2.4. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Kontrol Edilmesi ve Hücre Sayımı

Hücreler öldükleri zaman membran bütünlüğünü kaybetmektedir. Tripan mavisi, membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerin içine girebilmektedir. Canlı hücrelerde membran bütünlüğü bozulmadığı için hücreler mikroskopta parlak bir görüntüye sahip olmaktadır.

Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüjlenerek pelet oluşturuldu. Hücre peleti 3 ml hücre ortamında pipetaj yapılarak homojen haline getirildi. 100 µl Tripan mavisi endorff tüpüne aktarıldı ve üzerine 100 µl homojen haline gelmiş hücre süspansiyonu ilave edildi. Neubauer lamı üzerine lamel kapatıldı. 10 µl Tripan mavisi ile boyanmış hücreler lam ve lamel arasındaki boşluğa mikro pipet ile bırakıldı. 10X objektifte ışık mikroskopunda canlı hücreler gözlemlenerek sayıldı. 1 ml içindeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

3.6.2.2.6. Hücrelerin Stoklanması

Flask içindeki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüjlenerek pelet oluşturuldu. Pelet 1:10 oranında DMSO/FBS içeren ortam ile homojen haline getirilerek kryo tüplerine 1 ml paylaştırıldı. Kademeli dondurma işlemi uygulanarak hücreler donduruldu, -80 °C'de ve sıvı azotta stoklandı.

3.6.2.3. Sitotoksosite Deneyi (MTT)

Uygulanacak MC meyve özütünün sitotoksik dozunu belirlemek için MTT testi uygulanmıştır. MTT hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan kolorimetrik bir testtir.

Hassas terazide 122 mg MC meyve özütü tartıldı, 10 ml hücre ortamında çözdürülerek ana stok hazırlandı ve +4 °C’de saklandı.

AGS mide kanseri hücreleri Tripsin-EDTA ile kaldırılarak Neubauer lamında sayımı yapıldı. 96 kuyulu plakalara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde hücreler ekildi. 24 saat boyunca hücrelerin tutunması için %5 CO₂ ve 37 °C’lik inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

24 saat sonra hücreler plaka yüzeyine tutunduğunda farklı dozlarda (500, 550, 600, 650, 700 ve 750 µg/ml) MC meyve özütü ile muamele edildi. Ayrıca negatif kontrol (sadece hücre ortamı) ve pozitif kontrol (hücre + hücre ortamı) koşulları da oluşturuldu. Bitkilerin verildiği saat dilimi not edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakıldı.

Süresi dolan plakalara 15 µl MTT solüsyonu (5mg/ml konsantrasyonundaki) ilave edildi ve 4 saat inkübatörde inkübe edildi. Suda çözünebilen MTT solüsyonu canlı hücrelerdeki aktif metabolizma ile MTT’yi suda çözünmeyen mor renkli formazan kristaline indirgemektedir. Bu formazan’ı çözdürmek için ortama çözen (Dimetil Sülfoksit (DMSO)) eklenmelidir. 4 saat sonra kuyulardaki ortam aspire edildi ve 100 µl DMSO ilave edilerek spektrofotometre veya plaka okuyucu ile kuyuların absorbansı 570 nm’de ölçüldü. Pozitif kontroldeki hücre canlılığı %100, negatif kontroldeki hücre canlılığı ise %0 olarak kabul edildi. Aşağıdaki formül ile doz bağımlı hücre canlılığı hesaplandı ve deney 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler GraphPad Prism (versiyon 8.0.2) ile analiz edilerek IC₅₀ değeri bulundu.

3.6.2.4. Tripkan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

96 kuyulu plakalara 5000 hücre/kuyu olacak şekilde AGS mide kanseri hücreleri ekim yapıldı. Hücreler 24 saat plaka yüzeyine tutunmaları için %5 CO₂ ve 37 °C’de inkübe edildi. MTT sonucu bulunan IC₅₀ değeri hücrelere uygulandı. 48 saat

sonrasında hücreler 1:1 oranında Tripan Mavisi ile boyandı ve 5 dakika inkübe edildi. Kuyulardaki bütün ortam aspire edildi. Mikroskopta 10X objektif kullanılarak görüntüleri alındı.

3.6.2.5. Yara İyileşmesi Deneyi

AGS hücrelerinin MC meyve özütü ile tedavisinden sonra göç etme yeteneğini değerlendirmek için, in-vitro yara iyileştirme deneyi gerçekleştirildi. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler Neubauer lamında sayılarak 6 kuyulu plakalara 250.000 hücre/kuyu ekildi. Hücreler 2 gün boyunca inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 2 gün sonunda kuyulardaki hücre ortamı aspire edildi ve steril 100 µl'lik pipet ucu yardımı ile kuyuların ortasından çizilerek yara modeli oluşturuldu. Kalkan hücreleri temizlemek amacıyla kuyular 1 ml PBS ile yıkandı ve kontrol kuyusuna 2 ml hücre ortamı konulurken MC meyve özütünün konulacağı kuyuya ise MTT testi sonucunda hesaplanan IC₅₀ dozu konuldu. Kuyuların 0, 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri inverted mikroskopta 4X objektifte çekildi. Yaranın genişliği CellSens programı ile, yaranın % kapanma alanı ImageJ programı ile ve yaranın kapanma hızı ise TrackFast AI programı ile hesaplandı.

3.6.2.6. Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR, RT-PCR) Analizi

Hücrelerin gen ekspresyon seviyelerini incelemek için 6 kuyulu plakaya 100.000 hücre/kuyu ekildi ve 24 saat sonra IC₅₀ ve kontrol kuyuları oluşturuldu. Hücreler 48 saat sonra hücre kazıyıcı yardımıyla kuyulardan kaldırıldı. Pipetleme yapılarak bütün hücrelerin homojen bir şekilde kalktığından emin olundu ve ependorf tüpüne aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek pelet oluşturuldu.

3.6.2.6.1. RNA İzolasyonu

ECO→Tech RNA İzolasyon kiti kullanılarak hücreden RNA izole edildi. Üreticinin protokolüne göre süpernatant aspire edilerek pelet üzerine 400 µl RNA Liziz Tamponu eklendi ve 10 saniye vortekslendi. Üzerine 400 µl %90-100'lük etanol eklenerek 10 saniye boyunca vortekslendi. Tüp içindeki lizat, filtreli tüp içine aktarıldı ve 30 saniye boyunca maksimum hızda santrifüj edildi. Filtreli tüp 400 µl Yıkama Tamponu-1 eklenerek maksimum hızda santrifüjlendi. Daha sonra filtreli tüp 500 µl Yıkama Tamponu-2 ile maksimum hızda santrifüj edildi. Filtreli tüp tekrar 200 µl

Yıkama Tamponu-2 ile maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filtrelili tüp kapaklı bir tüpün içine aktarıldı ve üzerine 50-100 µl Nükleaz içermeyen su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında 30 saniye maksimum hızda santrifüj edildikten sonra RNA saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop cihazı kullanılarak ölçüldü. RNA örnekleri -80 °C’de muhafaza edildi.

3.6.2.6.2. Komplementer DNA (Complamenter DNA, cDNA) Sentezi

RNA örnekleri -80 °C’den çıkartılarak çözdürüldü ve buz üzerine alındı. RNA’ların konsantrasyonunu 200 ng’da eşitlemek amacıyla ara stoklar oluşturuldu. A.B.T.TM cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) kullanılarak RNA örnekleri cDNA’ya dönüştürüldü. Kit protokolüne uyularak Tablo 4’teki miktarlar 0,2 ml’lik PCR tüpüne aktarıldı. Isı döngüleyici (Termal Cycler) ile Tablo 5’teki PCR koşulları uygulandı. Oluşan cDNA örnekleri -20 °C’de muhafaza edildi.

Tablo 4. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları

	1 Örnek İçin Hacim
10X Reaction Buffer	2 µl
dNTP mix (2.5 mM)	1 µl
Random hexamer (50 µM)	2 µl
Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
RNase free Water	3.5 µl
RNA	10 µl
Total	20µl

Tablo 5. cDNA sentezi için gerekli reaksiyon koşulları

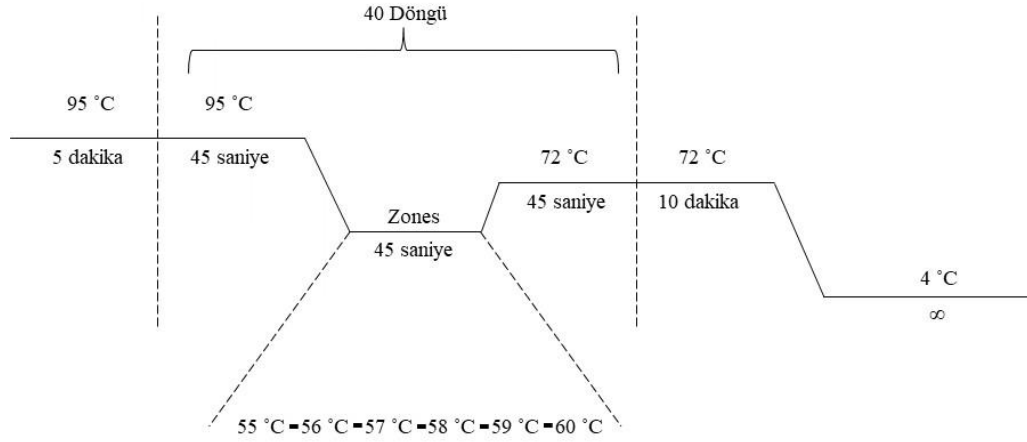
Basamak	Derece (°C)	Zaman	Döngü
1. Adım	25	10 dakika	1
2. Adım	37	120 dakika	1
3. Adım	85	5 dakika	1
4. Adım	4	∞	1
Total Süre		2 saat 15 dakika	

3.6.2.6.3. Gradyent PCR

Kaspaz-3 gen bölgesi için Yun ve ark. (47) yaptığı çalışmadan alınan primer dizileri firma aracılığıyla sentezlendi. Gelen primerin TM (Erime Sıcaklığı, Melting Temperature) sıcaklığının optimizasyonun için gradiyent PCR yapıldı. -20 °C'den çıkartılan cDNA örnekleri eridikten sonra buz üzerine konuldu. Sentezlenen *Kaspaz-3* primerleri üretici firmanın talimatına göre saf su ile sulandırıldı ve 1:10 oranında seyreltilerek ara stok oluşturuldu. Tablo 6'daki bileşenler 0,2 ml'lik PCR tüpüne kondu ve farklı sıcaklıklar denenmek için 6 tane PCR tüpüne eşit miktarda paylaştırıldı. Şekil 6'deki PCR koşulları (TM: 55-60 °C) uygulanarak optimum sıcaklık belirlendi. Kullanılan primerlerin uzunlukları baz çifti (bç) olarak Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Gradyent PCR bileşenleri ve miktarları

	1 örnek için hacim
Taq Master Mix	25 µl
MgCl ₂	1 µl
F Primer	1 µl
R Primer	1 µl
Su	20 µl
cDNA	2 µl
Total Hacim	50 µl



Şekil 6. Gradyent PCR koşulları

Tablo 7. Primer dizileri

Primer	Dizi	PCR Ürününün Büyüklüğü
<i>Kaspaz-3 F</i>	5'- TGAGCCATGGTGAAGAAGGA-3'	220 bç
<i>Kaspaz-3 R</i>	5'- TCGGCCTCCACTGGTATTTT-3'	

3.6.2.6.4. Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin baz çifti bakımından büyüklüklerini değerlendirmek için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. %1,5'luk agaroz jel hazırlamak için 1,5 gram agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 100 ml 1X TBE Buffer eklendi ve mikrodalga fırında birkaç dakika eriyene kadar ısıtıldı. İlk ısısı çıktıktan sonra 2 µl etidyum bromid eklendi ve tarakları takılmış jel döküm aparatına aktarıldı. Kabarcık kalmadığından emin olunduktan sonra jel donmaya bırakıldı. Donan jel içinde 1X TBE Buffer bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılarak yükleme kuyuları oluşturuldu. Kuyulardan birine moleküler ağırlık belirleyici (100 bç DNA Ladder) yüklendi. Diğer kuyulara ise PCR ürünleri yükleme boyası ile yüklendi. 30 dakika boyunca 140 V, 400 A'de örnekler yürütüldü ve UV ışık altında bantlar gözlemlendi.

3.6.2.6.5. RT-PCR Analizi

Elde edilen cDNA örneklerinin *Kaspaz-3* mRNA ekspresyon seviyelerini tespit etmek için A.B.T.TM 2X qPCR SYBR Green Master Mix (without ROX) kullanılarak RT-PCR yapıldı. cDNA örnekleri ve primerler -20 °C'den çıkartılıp çözdürüldü ve buz üzerine kondu. Tablo 8'de bulunan kit protokolüne uyularak örnekler 96 kuyulu PikoReal plakaya yüklendi. Plakanın yüzeyi yapışkan film ile kapatılarak oluşacak buharlaşma önlenildi. Aşağıda belirtilen sıcaklık koşulları uygulanarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Analizler $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Her bir örnek 3 tekrarlı olarak çalışıldı ve *GAPDH* ekspresyon seviyesine göre normalize edildi.

- └ 95 °C'de 5 dakika
- └ 40X Döngü
 - └ 95 °C'de 30 saniye
 - └ 58 °C'de 30 saniye
 - └ Data Acquisition
- └ Melting Curve 65 °C; 95 °C
 - └ Data Acquisition

Tablo 8. RT-PCR bileşenleri ve miktarları

	1 örnek için hacim
Master Mix	5µl
Primer F	0,5µl
Primer R	0,5µl
Su	2µl
cDNA	2µl
Total Hacim	10µl

3.6.2.7. Western Blot Analizi

AGS mide kanseri hücreleri üzerine belirlenen IC₅₀ dozunun protein seviyesi üzerine etkisini incelemek amacıyla Western Blot yöntemi ile hedef proteinlerin ekspresyon seviyeleri gözlemlendi.

3.6.2.7.1. Hücre Protein Lizatının Hazırlanması

6 kuyulu plakalara 100.000 hücre/kuyu hücre ekildi ve ertesi gün IC₅₀ dozu ile muamele edildi. 48 saat sonra hücre kazıyıcı yardımıyla hücreler kuyulardan kaldırıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet üzerine Tablo 9'da bulunan kimyasallardan hazırlanmış liziz tamponundan 60 µl ilave edildi. 5 dakikada bir pipetaj yapılarak buz üzerinde bekletildi. Bu işlem yaklaşık 6 kez tekrarlandıktan sonra maksimum hızda 20 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant temiz bir ependorf tüpüne aktarıldı ve lizatın içindeki protein konsantrasyonu ölçüldü. Örnekler -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 9. Liziz tamponu kimyasalları ve miktarları; *Radio Immuno Precipitation Assay, **Liziz tamponundaki son konsantrasyonlar

Kimyasallar	1 Örnek İçin Gerekli Miktar
1X RIPA*	200 µl
İnhibitör Kokteyl	2 µl
1 mM PMSF**	2 µl
1 mM NaF**	0,4 µl
1 mM NaV**	0,2 µl

3.6.2.7.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü (Bradford Protein Tayini)

Bu yöntemde absorbansı ve konsantrasyonu bilinen Bovine Serum Albumine (BSA) değerleri referans alınarak elde edilen lizat içerisindeki protein miktarı hesaplandı. 10 mg/ml konsantrasyona sahip BSA proteini 96 kuyulu plakaya sırasıyla 0, 2, 4, 6, 10, 15 ve 20 µl kondu. Üzerlerine sırasıyla 20, 18, 16, 14, 10, 5 ve 0 µl distile

su eklendi. Farklı kuyulara 20 µl lizat örneklerinden konuldu ve bütün kuyuların üzerine 200 µl Bradford Reaktifinde ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübe edildi. Plaka okuyucu ile 595 nm’de absorbansları ölçüldü. Elde edilen BSA absorbansları ile Excel üzerinde standart grafiği çizildi ve $y = ax+b$ denklemi oluşturuldu. Sırasıyla y değerine kontrol ve IC₅₀ absorbansları girilerek 30 µg protein konsantrasyonu için ne kadar protein lizatından konulması gerektiği hesaplandı.

3.6.2.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE)

Proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayrışması için SDS-PAGE jel elektroforezi uygulandı. Bu elektroforez için ayrıştırıcı ve yükleme olmak üzere 2 farklı jel döküldü. Jel döküm aparatına ilk önce Tablo 10’daki kimyasallar ile hazırlanan ayrıştırıcı jel döküldü. Üzerini kaplayacak miktarda izopropanol eklenerek 20 dakika jelin donması için beklenildi. Jel donduktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı ve Tablo 11’deki kimyasallar ile yükleme jeli hazırlandı. Taraklar jel döküm aparatına takıldıktan sonra yükleme jeli döküldü. Donan jeller yürütme tankına alınarak içine yürütme tamponu eklendi. Taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılarak kuyular oluşturuldu.

Tablo 10. Ayrıştırıcı jel için gerekli kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	1 Örnek İçin Gerekli Miktar
Distile Su	2,4 ml
%40 Acrylamide/Bisacrilamide	1,25 ml
1,5 M Tris (pH: 8,8)	1,25 ml
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	2 µl

Tablo 11. Yükleme jeli için gerekli kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	1 Örnek İçin Gerekli Miktar
Distile Su	2,2 ml
%40 Acrylamide/Bisacrilamide	250 µl
1,5 M Tris (pH: 6,8)	250 µl
% 10 SDS	20 µl
% 10 APS	20 µl
TEMED	2 µl

30 µg'lık protein lizatları jele yüklenmeden önce, 2X Laemmli Buffer ile 95 °C'de 5-10 dakika inkübe edilerek denatüre edildi. Denatüre edilmiş protein lizatları ve protein marker'ı yükleme jeline yüklendi. Marker tamamen açılana kadar örnekler 70-110 V'ta yürütüldü.

3.6.2.7.4. PVDF Membrana Transfer

Marker tamamen açıldığında jelin yürütmesi durduruldu ve jel döküm aparatından çıkartıldı. Protein içermeyen yükleme jeli kesilerek atıldı. Jelin büyüklüğünde PVDF membran kesilerek metanolde 5 dakika bekletildi ve saf su ile birkaç kez yıkandı. Bir kaba transfer tamponu konuldu ve blot kağıdı, sünger ve membran ıslatıldı. Transfer kasetine sırasıyla sünger, blot kağıdı, jel, membran, blot kağıdı ve sünger konuldu. Jel ve membran arasındaki kabarcıkların oluşması önlenerek transfer kaseti kapatıldı. Kaset tankın içine yerleştirilerek transfer tamponu ile dolduruldu. Tank içerisine buz konuldu ve transfer sürecinde tank içindeki sıvı karıştırıldı. 2-3 saat 300 mA'de membrana transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2.7.5. Bloklama

Membrana transfer işlemi bittikten sonra TBST (Tris buffered saline – %0,05 Tween 20) ile %5'lik süt tozu hazırlandı. Membran, çalkalayıcı üzerinde (19 rpm) %5'lik süt tozu ile 1 saat inkübe edilerek bloklama işlemi tamamlandı.

3.6.2.7.6. Primer Antikor ile İnkübasyon

Bloklama işleminden sonra membran, primer antikorda (*Kaspaz-3*) bir gece boyunca 4 °C'de karıştırıcı ile hareket halinde inkübe edildi. Ertesi gün membran üzerindeki non-spesifik bağlanmaları uzaklaştırmak için 1 saat boyunca çalkalayıcıda (19 rpm) TBST ile yıkandı. Her 10 dakikada bir TBST tazelendi.

3.6.2.7.7. Sekonder Antikor ile İnkübasyon

%5'lik süt tozunda hazırlanmış Horseradish peroksidaz (HRP) bağlı sekonder antikor (anti-mouse) ile membran 1 saat inkübe edildi. Bir saat sonunda membran 20 dakika TBST ile çalkalayıcıda yıkandı. Her 5 dakikada bir TBST tazelendi.

3.6.2.7.8. Görüntüleme

Bütün işlemlerden sonra membran 5 dakika ECL solüsyonunda bekletildi. Membran üzerindeki ECL solüsyonu iyice uzaklaştırıldıktan sonra şeffaf bir poşet dosya içerisine yerleştirildi. Şeffaf dosya içerisindeki membran, yansıtıcı yüzeyli radyolojik kaset (Exposure Cassette, Kodak, X-Omatic – Seri no:1482277) içerisine bant yardımı ile sabitlendi. Karanlık odada kırmızı ışık altında kaset içerisine radyolojik film (Kodak, Biomax Light Film-Kat no:8761520) yerleştirilerek uygun görüntü alınana kadar (1 saniye-1saat) bekletildi. Kasetten çıkartılan film sırasıyla Developer ve Fixer solüsyonlarında bekletildi. Bantlar netleştikten sonra film, su ile yıkanarak kurulandı. Film tamamen kuruduktan sonra kaset içerisine tekrardan yerleştirildi ve protein marker'ı CD kalem ile işaretlendi.

3.6.2.7.9. Membranın Strip Edilmesi (Membranın Antikorlardan Uzaklaştırılması)

Görüntüsü alınan membranın ikinci defa başka bir antikor ile muamele edilmesi gerektiğinde membran strip edilerek antikorlarından uzaklaştırılır ve tekrar primer ve sekonder antikor ile blotlanabilir. Membran, strip solüsyonu ile 25 dakika boyunca çalkalayıcıda antikorlarından uzaklaştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca TBST ile yıkandı. TBST her 5 dakikada bir tazelendi. Strip edilmiş membran tekrar %5'lik süt tozunda bloklandı. Membran bu sefere yeni primer antikor (*β -Aktin*) ve sekonder antikor (anti-mouse) ile inkübe edildi. Görüntü alınıp ImageJ programı ile

bantların boyutları hesaplandı. *Kaspaz-3* sonuçlar β -Aktin ile normalize edildi ve GraphPad Prism programı aracılığıyla istatistiksel analizi yapıldı.

3.6.2.8. İstatistiksel Veri Analizi

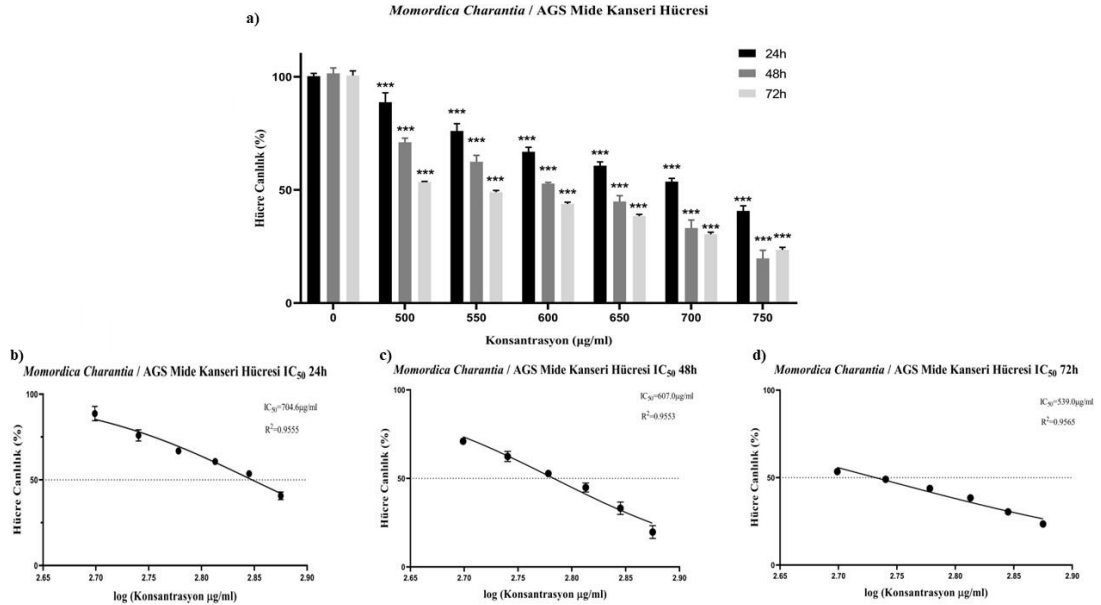
Bütün deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır. Bu deneylerden elde edilen verilerin ortalamaları alınarak GraphPad Prism ve ImageJ programlarında istatistiksel analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Deneyi (MTT) Bulguları

MC meyve özütünün mide kanseri hücre hattı olan AGS hücrelerindeki sitotoksik etkisine MTT testi ile bakılmıştır. Bu amaç ile AGS hücreleri 24, 48 ve 72 saat olmak üzere artan konsantrasyonlarda (500-750 µg/ml) MC meyve özütüne maruz bırakılmıştır (Şekil 7,a). Kontrol grubuna meyve özütü uygulanmamıştır ve canlılık oranı %100 olarak kabul edilmiştir. 3 tekrarlı absorbans değerlerinin ortalaması alınarak dozların yüzde canlılığı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler GraphPad Prism programında One-Way ANAVO testi kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak hücrelerin %50 oranında canlı kaldığı doz (IC₅₀) hesaplanmıştır.

24. saatteki IC₅₀ değeri 704,6 µg/ml olarak bulunmuştur (p<0.001)(Şekil 7,b). 48. saatteki MC meyve özütünün IC₅₀ değeri 607,0 µg/ml bulunmuşken (p<0.001)(Şekil 7,c), 72. saatte bu değer 539,0 µg/ml olarak hesaplanmıştır (p<0.001)(Şekil 7,d).

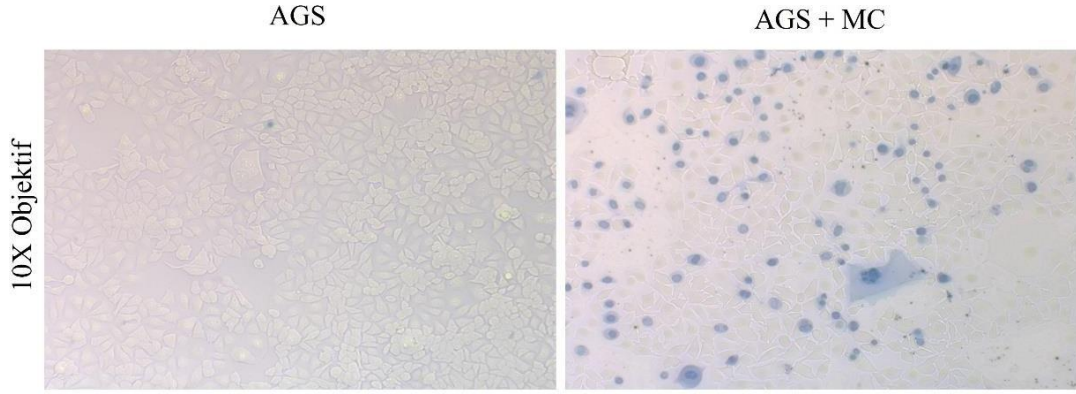


Şekil 7. AGS hücrelerine karşı MC meyve özütünün MTT değerleri; **a)** 24, 48 ve 72. saatteki doz bağımlı hücre canlılığı (%). ******, p<0.001. **b)** 24. saatteki MC meyve özütünün AGS hücreleri üzerine hücre canlılığı (%). **c)** 48. saatteki MC meyve özütünün AGS hücreleri üzerine hücre canlılığı (%). **d)** 72. saatteki MC meyve özütünün hücre canlılığı (%).

4.2. Tripkan Blue ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesinden Elde Edilen Bulgular

MC IC₅₀ dozu uygulanan ve uygulanmayan AGS hücreleri 48 saat sonunda Tripkan mavisi ile boyanıp hücrelerin canlılıkları ve morfolojik görüntüleri değerlendirildi.

Özüt uygulanmayan AGS hücreleri boyayı hücre içerisine almazken, özüt uygulanan hücreler membran bütünlüğünü kaybettiğinden dolayı boyayı hücre içerisine almıştır (Şekil 8). Ölen hücreler parlak görüntülerini kaybetmiş ve büzüşmüştür. Kromatinleri yoğunlaşmış, hücre çekirdeği parçalanmıştır.

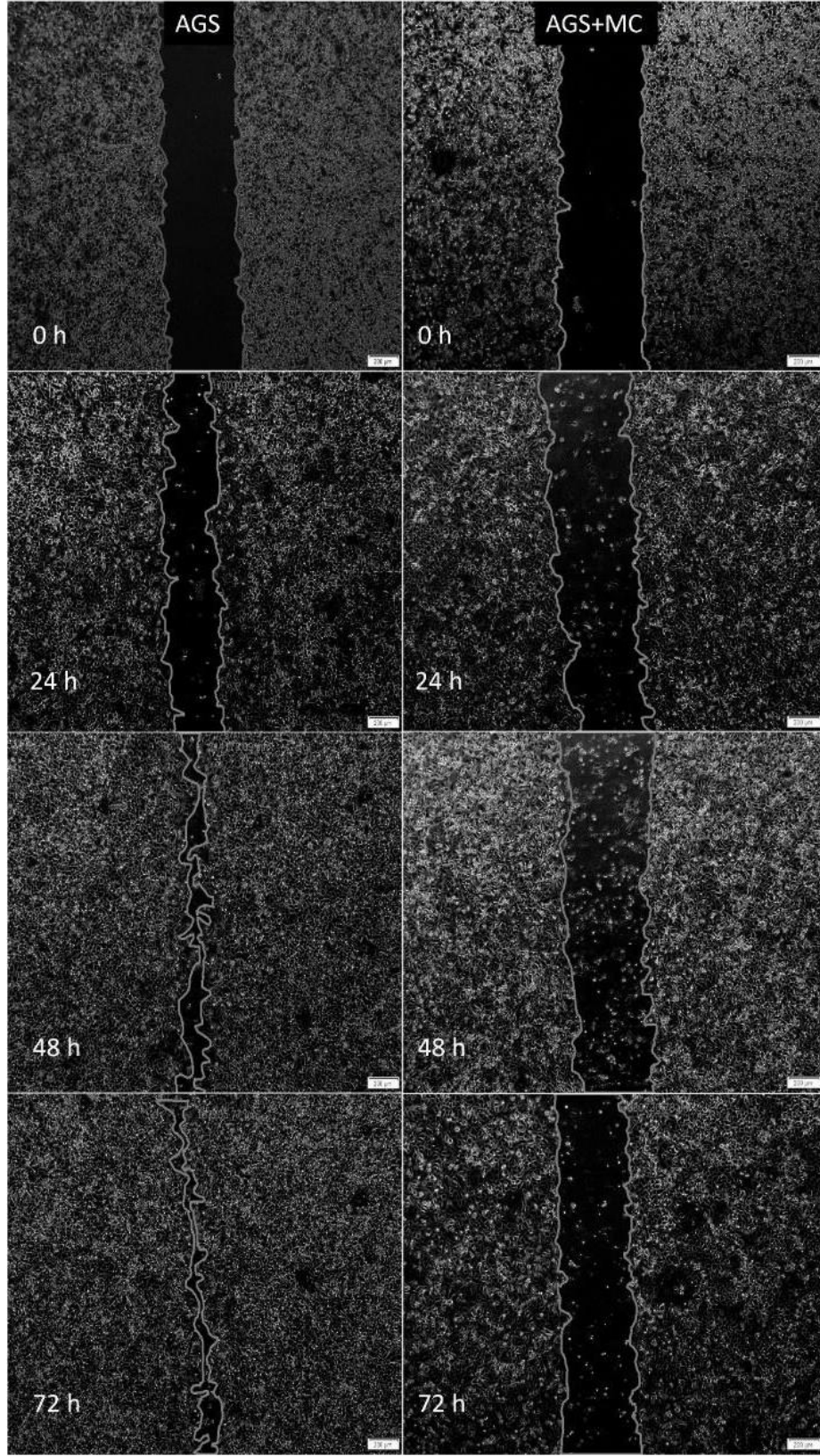


Şekil 8. Tripkan mavisi ile boyanan hücrelerin morfolojik görüntüleri

4.3. Yara İyileşmesi Bulguları

MTT verilerine göre belirlenen MC meyve özütünün 48. saatteki IC₅₀ dozunun AGS mide kanseri hücreleri üzerindeki göç yeteneği özelliğini incelemek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Yaranın görüntüleri her 24 saatte bir inverted mikroskop yardımıyla çekilmiştir.

MC meyve özütünün uygulanmadığı kontrol grubunda zamana bağlı olarak yaranın kapandığı gözlenirken, MC meyve özütü uygulanan yarada kapanma gözlenmemiştir (Şekil 9).

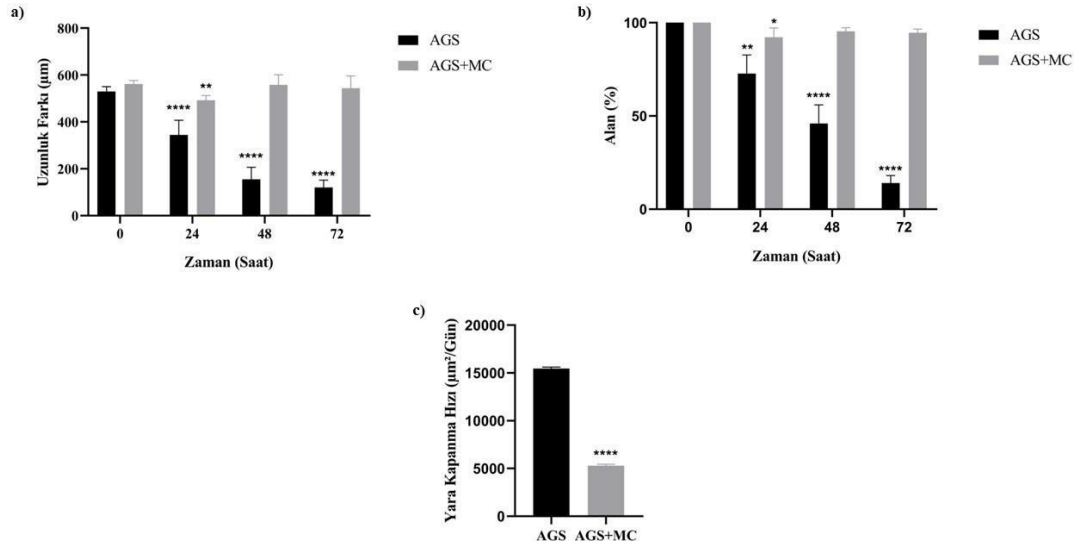


Şekil 9. MC uygulanan AGS hücrelerindeki ve kontrol hücrelerindeki yaraların 0, 24, 48 ve 72. saatteki görüntüleri

ImageJ programı ile yaranın 6 farklı noktasından uzunluklar alınmış, elde edilen veriler GraphPad Prism uygulamasına girilerek Two-Way ANOVA testi yapılmıştır. MC özütü uygulanan AGS hücrelerindeki yara genişliği kontrole göre karşılaştırıldığında hücre göçünde anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 10.a).

ImageJ programının bir uzantısı olan “Wound_healing_size_tool” eklentisi ile yaraların % alanı hesaplanarak 0. saatteki alan verilerine göre orantılanmış Şekil 10.b’deki grafik oluşturulmuştur. Grafiğe bakıldığında kontroldeki yaranın % alanı azalırken, IC₅₀ dozu uygulanan yaranın % alanında önemli bir değişiklik gözlenmemektedir. Verilerin istatistiksel analizi yapıldığında kontrol olarak değerlendirilen AGS hücreleri anlamlı bir azalış gösterirken, özüt uygulanan AGS hücrelerinde sadece 24. saatte anlamlı bir azalış tespit edilmiştir.

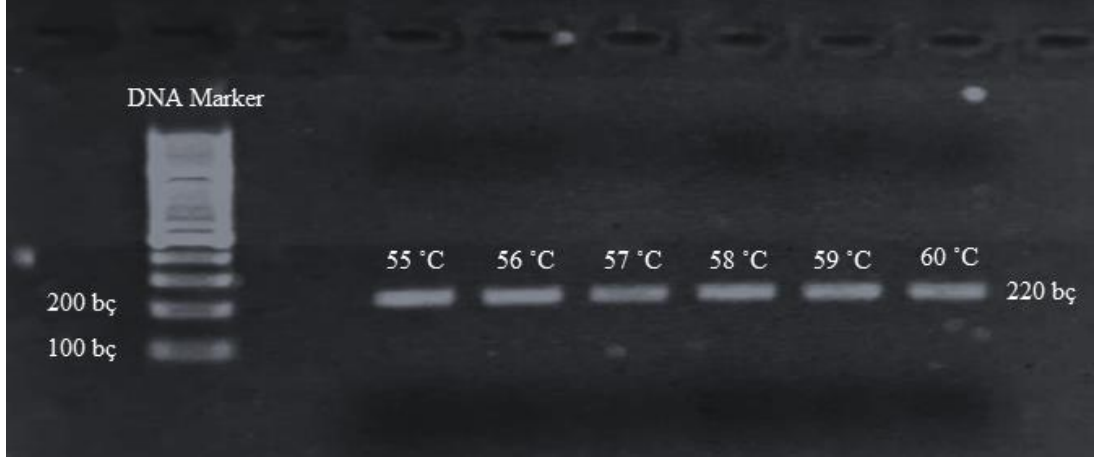
Yaranın bir gündeki kapanma hızı ise TrackFast AI analizi (Ibidi) ile hesaplanmış ve Şekil 10.c’deki grafik çizilmiştir. Unpaired t testi ile analiz yapılmış ve anlamlı derecede MC uygulanan AGS hücrelerinde yara kapanma hızında yavaşlama gözlenmiştir ($p<0.0001$).



Şekil 10. Yara iyileşmesi deneyi yara kapanma analizleri; **a)** Yaranın µm bazında uzunluk fark grafiği. **, $p=0,0086$. ****, $p<0.0001$. **b)** Yüzde bakımından yara iyileşmesi alan grafiği. *, $p=0,0265$. **, $p=0,0048$. ****, $p<0.0001$. **c)** Yaranın gün içerisinde kapanma hızı. ****, $p<0.0001$.

4.4. Gradyent PCR Bulguları

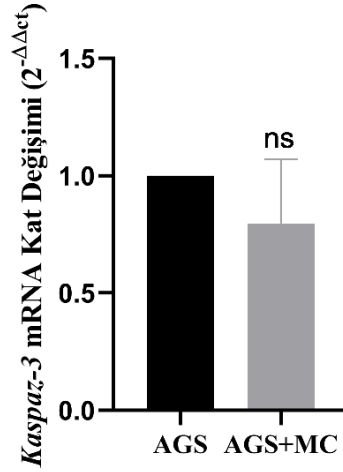
Gradyent PCR amplikonları agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV ışık altında gözlemlendi. *Kaspaz-3* primerlerinin bç açısından doğru gen bölgesini kapsadığı agaroz jel elektroforezi ile kanıtlanmıştır. Ayrıca optimum TM sıcaklığının kaç olduğu bu yöntem ile gözlemlenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. *Kaspaz-3* için gradyent PCR amplikonlarının agaroz jel görüntüleri

4.5. RT-PCR Bulguları

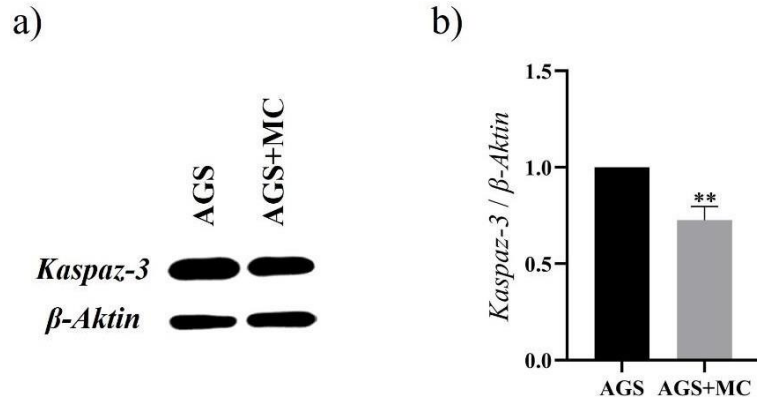
Gradyent PCR sonunda *Kaspaz-3* geninin optimum sıcaklığı 58 C olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda MC meyve özütü uygulanan AGS hücreleri ve uygulanmayan hücrelerden izole edilen RNA'dan cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'ların *GAPDH* ve *Kaspaz-3* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile tespit edilmiştir. *Kaspaz-3* verileri *GAPDH* verilerine göre normalize edilmiş ve kontrol hücresine göre MC uygulanan AGS hücrelerindeki *Kaspaz-3*'ün ekspresyonu 0,74 kat azalmıştır (Şekil 12). İstatistiksel olarak analizi Unpaired t testi ile yapılmış ancak anlamlı bir azalış gözlemlenmemiştir (ns: no significant).



Şekil 12. 48 saat MC uygulanmış AGS ve kontrol AGS hücreleri üzerindeki *Kaspaz-3* ekspresyonu. ns: no significant. Kontrol hücrelerinin ekspresyon değişimi 1 olarak alınmıştır.

4.6. Western Blot Analizi Bulguları

6 kuyulu plakaya AGS hücreleri ekildi ve kontrol amaçlı kuyulardan birine MC uygulanmazken diğerine MC uygulandı. Hücreler 48 saatin sonunda toplandı ve protein lizatı elde edildi. Lizatların konsantrasyonu Bradford yöntemi ile hesaplandı ve SDS-Page jele yüklenerek yürütüldü. Jel, membrana transfer edilerek, *Kaspaz-3* ve β -*Aktin* antikorlarıyla muamele edilerek görüntüleri alındı. Bantların boyutları ImageJ programı ile hesaplandı (Şekil 13.a). Kontrol ve MC uygulanan hücre verileri β -*Aktin*'e göre normalize edilerek hesaplamaları yapıldı. *Kaspaz-3*'ü β -*Aktin*'e oranlayarak *Kaspaz-3*'ün 0,72 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 13.b). Unpaired t testi ile analiz yapıldı ve p değeri 0,0026 bulunarak Kaspaz seviyesinde anlamlı bir azalış gözlemlendi.



Şekil 13. Western Blot analizi ve miktar tayini. a) Eksprese olan proteinlerin bant görüntüleri. b) Referans gene göre normalize edilen *Kaspaz-3* protein seviyesinin kat artışı. **, $p=0,0026$.

5. TARTIŞMA

Kanser dünya genelinde sıklıkla karşılaşılan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Günümüzde kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi gibi birçok farklı kanser tedavi yöntemi mevcuttur. Kanseri önleyici ve tedavi edici amaçla kullanılan ilaçların, böbrek ve karaciğer hasarı, genotoksik-sitotoksik etki veya alerjik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (40). Kanser tedavisinde bazı geleneksel tedaviler mevcut olsa da bu tedaviler sağlıklı hücreler için toksik etki yaratabilmektedir. Bu yüzden yeni terapötik moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu terapötik moleküllere kemopreventif ajanlar da denmektedir. Kemopreventif ajanların görevi kemoterapinin meydana getireceği toksik zararı en aza indirgeyerek düşük toksik özellikli bir tedavi planı sunmaktadır. Dolayısıyla; güvenilir, yan etkisi tolere edilebilir, düşük toksisiteye sahip, ekonomik ve doğal kaynakların tedavide kullanılması büyük önem arz etmektedir. Bitkiler de kemopreventif ajanlar bakımından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. *Momordica charantia* (MC) bu bitkiler arasında yer almaktadır.

MC bitkisi, başta antikanser olmak üzere, antidiyabetik, antienflamatuvar, antioksidan, antiülser, antibakteriyel ve antimikrobiyal gibi bazı farmakolojik özelliklere sahiptir. Her ne kadar bitkilerin tedavi amaçlı kullanımıyla ilişkili çalışmaların sayısı artmış olsa da çalışılmamış çok sayıda bitki çeşidi bulunmaktadır. Bu bitkilerin veya bitkilerden izole edilen bileşenlerin kanser tedavisinde kullanılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında MC meyvesinde elde edilen özüt, AGS mide kanseri hücreleriyle muamele edilmiş ve oluşacak sitotoksik ve apoptotik yanıt incelenmiştir. MC bitkisi özellikle bal ile bekletilerek mide rahatsızlıklarında, zeytin yağı ile bekletilerek de cilt yanıklarında halk arasında kullanılmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak hipotezimizi MC meyve özütünün AGS mide kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi vardır üzerine kurduk.

Yapılan literatür taramasında sadece Li ve ark. MC bitkisini AGS mide kanseri hücreleri üzerinde incelemiş olup, bitkinin yaprağından elde ettikleri ekstraktı

kullanmışlardır (33). Tezimizdeki özgün değer, MC meyve özütünün AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik özelliğinin ilk defa ortaya konmasıdır.

Brennan ve ark. 2012 yılında yayınladıkları makalede H295R ve Y1 adrenokortikal kanser hücrelerine MC meyve suyu ile hücre ortamını % oran olarak vermişler ve IC₅₀ dozunu %2'lik MC bulunan ortamda gözlemlemişlerdir (48). Güneş ve ark. yaptıkları çalışmada MC meyvesini etanol ve aseton ile ekstrakte etmişler ve etanol ekstresinin (0,8 mg/ml) test edilen tüm hücre hatlarında %80'den fazla sitotoksositeye neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Aseton ekstresinin ise Jurkat ve MCF-7 hücrelerinde %78 ve %82, K562 ve A549 hücrelerinde sırasıyla %60 ve %25 sitotoksositeye neden olduğunu belirtmişlerdir (49). Bir başka çalışmada Hindistan ve Çin'den temin edilen MC meyveleri toz haline getirilmiş, sıcak ve soğuk su ile ekstrakte edilmiştir. A549 hücreleri ile muamele edilen bu ekstraktlar, MTT verilerine göre IC₅₀ değeri hesaplanmış, Hindistan soğuk ekstraktın en düşük (26,7 µg/ml) %50 öldürücü aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Hindistan sıcak, Çin soğuk ve Çin sıcak IC₅₀ değerleri de sırasıyla 36,9 µg/ml, 28,1 µg/ml ve 32,5 µg/ml'dir (50). Literatürdeki çalışmalar ile bizim çalışmamızda elde edilen MTT verileri sonucunda IC₅₀ değerlerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar bitki özütünün saflığı ve bileşimi, ekstraksiyon için kullanılan solvent (etanol, aseton, metanol, su, vs.), solventin katıya oranı, ekstraksiyon süresi ve diğer biyoaktif bileşiklerin varlığı gibi faktörlerden ve çalışılan hücre grubundan etkilenmektedir. Yukarıda bahsedilen çalışmaların in vitro çalışmalar olduğunu ve kanser hastalarında MC ekstraktları kullanılarak klinik deneyler yapılmadığını belirtmek önemlidir. Bu nedenle, MC'nin potansiyel antikanser etkilerini ve etki mekanizmalarını tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

MC uygulanan AGS hücrelerinin morfolojik değişikliklerini gözlemek için Tripan mavisi ile hücreleri boyadığımızda yaklaşık %50 oranında ölü hücre gözlemledik. Bu veri MTT sonucumuzun sağlamasını yapmamıza yardımcı olmuştur. Yakın objektiflerde hücreleri gözlemlediğimizde, hücrenin şeklinin bozulduğunu, membran bütünlüğünü kaybederek boyayı içerisine aldığını ve bazı sitoplazmik parçacıkların hücre dışına çıktığını gözlemledik.

2012 yılında yapılan bir çalışmada, MC yaprakları metanol ile ekstrakte edilmiş ve dört farklı kanser (AGS, Hone-1, CL1-0 ve HCT-116) hücrelerindeki apoptotik etkisi *Kaspaz-3* üzerinden incelenmiştir. MC yaprak özütünün *Prokaspaz-3* aktivasyonunun zamana bağlı bir şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir (33). Bu makale çalışmamıza destekleyici veriler sunmaktadır. *Kaspaz-3* ekspresyonundaki bu azalma çeşitli faktörlerden kaynaklanabilmektedir. *Kaspaz-3* apoptozda önemli role sahip kilit bir enzimdir ve aşağı regülasyonu hücre ölümünü ve apoptotik yolu etkilemektedir. Tabata ve ark. MC yaprak özütünden Kuguaglikozit C bileşenini izole etmiş ve IMR-32 insan nöroblastoma hücrelerindeki etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri bileşiğin *Kaspaz-3* aktivasyonunu azalttığını bildirmişlerdir (51). *Kaspaz-3* ekspresyonunun düzenlenmesi protein-protein etkileşimlerinden, transkripsiyonel düzenlemeden, transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan ve çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir. MC ekstraktının içeriğindeki farklı bileşenler tarafından düzenleyici faktörler veya sinyal yolları modüle olabilmektedir. Bu nedenle MC meyve ekstraktının hücre ölümü üzerindeki etkisi kaspaz bağımsız yollar aracılığı ile de gerçekleşebilir.

Kanser hücrelerindeki apoptoz ve/veya apoptoz direncinin azalması birkaç mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. Bunlar, ölüm sinyallerindeki bozulmalar ve proapoptotik/antiapoptotik protein dengesinin bozulması olabileceği gibi kaspaz aktivasyonundaki azalmalar da apoptozdan kaçınmanın bir göstergesidir. Bununla birlikte, bu etkilerden sorumlu spesifik mekanizmaların ve bileşenlerin farklı bitki özüleri ve kanser hücre türleri arasında değişebileceğine dikkat etmek önemlidir. Bu nedenle, MC meyve ekstresi ile muamele edilen AGS hücrelerinde *Kaspaz-3* ekspresyonunda gözlenen azalmanın altında yatan spesifik mekanizmaları aydınlatmak ve potansiyel terapötik uygulamalarını tam olarak anlamak gerekmektedir. Zhou ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada *Kaspaz-3*'ün sadece hücre ölümünden sorumlu olmadığı, aynı zamanda *Kaspaz-3*'ün nakavt edildiği hücrelerde kanser hücrelerinin istilacılığı ve metastatik potansiyelinin kontrole göre azaldığını gösterdiler. Aynı zamanda *kaspaz-3* nakavt kolon kanseri hücre hatlarında *Kaspaz-3*'ün bazal membran bozulmasında, hücre göçünde ve istila hücrelerinin yeni bir ortamda hayatta kalmasında önemli rol oynayan epitelyalden mezenkimal geçiş (EMT) sürecine katkıda bulunabileceğine dair veriler elde ettiler (54).

Yara iyileşmesi deneyi ile AGS hücrelerinde pipet ucu yardımıyla oluşturulan yaranın MC ekstraktı ile nasıl bir hücre göçü özelliği gösterdiğini inceledik. MC özütü uygulanmayan hücrelerde yaranın hızı 48 saat sonunda neredeyse kapanmış, 72. saatte 48. saate göre daha az bir kapanma gözlenmiştir. Ancak MC uygulanan AGS hücresinde oluşturulan yarada anlamlı bir kapanma gözlemlenmemiştir. Bir yüksek lisans tezinde MC ekstraktını U87G glioblastoma hücrelerinde incelemiş ve MC bitkisinin kanserli hücrelerde migrasyonu azalttığını göstermişlerdir (52). Literatürdeki çoğu yara iyileşmesi çalışmaları MC bitkisinin Wistar sıçanların derisinde açılan yaralar üzerindeki etkisini incelemiştir. Singh ve ark. Albino fareler üzerinde oluşturdukları yaraya MC bitkisini uygulamışlar 0, 6, 12 ve 18 gün sonra yaranın kapanma alanını incelemişlerdir. Sonuç olarak sağlıklı farelerde açılan yaranın MC uygulanmasıyla zamana bağımlı olarak kapandığını bildirmişlerdir (53). Literatürdeki bu bilgiler çalışmamıza destek sağlamaktadır. Çalışmamızda kanser hücrelerinde oluşturulan yaranın MC ekstraktı ile kapanmaması bize bu bitkinin kanserli hücrelerin migrasyon özelliğini azalttığını göstermektedir. Ayrıca sağlıklı farelerde yaranın kapanması bu bitkinin normal hücrelerde toksik bir etkiye neden olmadığını ifade etmektedir. Bitki özleri çeşitli çalışmalarda potansiyel yara iyileştirici özellikler göstermiş olsa da kanser hücreleri üzerinde iyileştirici bir etki beklenmemektedir.

Bazı bitki özütleri kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir (54). Bu sitotoksikite kanser hücrelerinin yara iyileşmesi sürecini de etkilemektedir. Çalışmamızdan yola çıkarak MC ekstraktı AGS kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurarak yaranın kapanmasını engellemektedir. MC bitkisi bunu hücre proliferasyonunda rol oynayan sinyal yollarını modüle ederek gerçekleştiriyor olabilir. MC ekstraktının kanser hücrelerinde yara kapanmasını engellemesi, biyoaktif bileşiklerin sitotoksik etkileri, sinyal yollarının modülasyonu ve kanser hücrelerinin değişen özellikleri gibi çeşitli faktörlere bağlanabilir. MC ekstraktının kanser hücrelerinde yara iyileşmesinin altta yatan mekanizmaları ve potansiyel etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda, MC ekstraktı AGS mide kanseri hücreleri üzerinde önemli sitotoksik bir etki göstermiştir. MTT deneyi, 48 saatte 607 µg/ml'lik bir IC₅₀ dozu ortaya koyarak AGS mide kanseri hücre çoğalması üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye işaret etmiştir.

Ayrıca, gerçek zamanlı PCR ve Western Blot analizinden elde edilen veriler, MC ekstresi ile muamele edilen AGS hücrelerinde *Kaspaz-3* mRNA ekspresyonunda (0,74 kat) ve *Kaspaz-3* protein ekspresyonunda (0,72 kat) düşüş olduğunu ortaya koymuştur. *Kaspaz-3* gibi kaspazların aktivasyonu apoptozun ayırt edici bir özelliğidir ve MC ekstraktına yanıt olarak aşağı regülasyonu kaspazdan bağımsız bir apoptotik mekanizmaya işaret eder.

MC meyve ekstraktı ile muamele edilen AGS hücrelerinde yara iyileşmesi gözlenmediğinden, yara iyileşmesi deney sonuçları MC ekstraktının sitotoksik potansiyelini daha da desteklemektedir. Bu bulgu, tümör metastazının sınırlandırılmasında çok önemli olan kanser hücrelerinin göç kapasitesinde önemli bir bozulmaya işaret etmektedir.

Bu sonuçların kombinasyonu, MC ekstraktının mide kanseri hücreleri üzerindeki çok yönlü etkisini vurgulamaktadır. Kaspaz bağımsız yollarla hücre ölümünü indükleme yeteneği, karmaşık ve potansiyel olarak sinerjik bir etki mekanizmasına işaret etmektedir. Gözlemlenen anti-proliferatif ve anti-göç etkileri, MC ekstraktını mide kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak daha fazla araştırma için umut verici bir aday haline getirmektedir.

Elde edilen verilerin yanında MC ekstraktının sitotoksik etkisinin bütünüyle ortaya konması ve etraflıca tartışılmasında bazı sınırlılıklar mevcuttur. Çalışmamızda sunulan veriler MC ekstraktının AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri olduğunu göstermiştir ancak hücrelerin ölümünün altında yatan moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, ekstraktın potansiyel bir terapötik müdahale olarak etkinliğini ve güvenliğini

doğrulamak için diğer mide kanseri hücre hatlarında ve sağlıklı mide hücreleri üzerinde in vivo çalışmalar ve araştırmalar gereklidir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular MC ekstresinin sitotoksik özelliklerine ışık tutarak gelecekteki prelinik ve klinik araştırmalar için n veri sağlayacaktır. Ekstraktın bileşenlerinin etki ettiği kesin moleküler yolakların anlaşılması, mide kanseri hastaları için yeni ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir

KAYNAKLAR

1. Capellini A, Williams M, Onel K, Huang KL. The functional hallmarks of cancer predisposition genes. *Cancer Manag Res.* 2021;13:4351–7.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 Jan;70(1):7–30.
3. Karataş U. Irs1 Gly972arg ve Irs2 Gly1057asp Polimorfizmlerinin Gastrik Kanseri Gelişimi İle Arasındaki İlişki. [Van, Türkiye]: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi; 2020.
4. Austin CR. The Role of Frizzled-7 in Gastric Cancer. [Cardiff, UK]: Cardiff University; 2020.
5. Kayacan NS. Endemik *Centaurea Nerimaniae* Ekstresinin Kanseri Hücre Soylarında Sitotoksik Ve Apoptotik Etkileri. [İstanbul, Türkiye]: İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2015.
6. Babaç M, Ekinc M, İlem-Özdemir D. Monoclonal Antibodies Used in Cancer Diagnosis and Treatment. *Ankara Univ Eczac Fak Derg.* 2023;47(1):295–310.
7. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
8. Yılmaz HK, Özer RM. Ketojenik Diyet ve Kanseri. *Haliç Üniversitesi Sağlık Bilim Derg.* 2021;
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell.* 2011. p. 646–74.
10. Wanders D, Hobson K, Ji X. Methionine restriction and cancer biology. Vol. 12, *Nutrients.* MDPI AG; 2020.
11. Grose RP, Senga SS. Cite this article: Senga SS, Grose RP. *Open Biol.* 2021;11.
12. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science (80-).* 2013;340(6127):1546–58.
13. Keleş AY. Çeşitli Mantar Ekstraktlarının Kolorektal Kanseri Hücre Hatlarında Genotoksik, Apoptotik, Sitotoksik Ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi. [Van, Türkiye]: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2021.
14. Shewaye TN, Mekonnen AA. Benign-Malignant Lung Nodule Classification with Geometric and Appearance Histogram Features. 2016 May 26 [cited 2023 Jul 28]; Available from: <https://arxiv.org/abs/1605.08350v1>
15. Yen YC, Huang CY, Chan HW, Wang YY, Changchien TC, Wang DW, et al. Longitudinal Association of Universal Screening and Treatment for Major Depressive Disorder with Survival in Cancer Patients. *J Pers Med [Internet].* 2022 Aug 1 [cited 2023 Jul 27];12(8):1213. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4426/12/8/1213/htm>
16. Elen Ö. Perioperatif Kemoterapi Alan Mide Kanseri Hastaların Klinik, Patolojik Özellikleri

- Ve Trombosit/Lenfosit, Nötrofil/Lenfosit Oranlarının Prognozla İlişkisi. [Kocaeli, Türkiye]: Kocaeli Üniversitesi; 2021.
17. Ceylaner B. Hipoksi Koşullar Altında Mide Kanserinde Vincristine'nin Apoptoz Ve Otofaji Üzerine Etkisi. [İstanbul, Türkiye]: Haliç Üniversitesi; 2019.
 18. Tawfik O, Alallaf J. Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Breast Cancer and Future Directions. *Women Heal Care Issues*. 2019 Mar 22;2(1):01–6.
 19. Mosel DD, Bauer RL, Lynch DP, Hwang ST. Oral complications in the treatment of cancer patients. *Oral Dis* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2023 Jul 29];17(6):550–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1601-0825.2011.01788.x>
 20. Teasure J. Herbal medicine and cancer: an introductory overview. Elsevier [Internet]. 2005 [cited 2023 Jul 28]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208105000379?casa_token=vfPjWaY1LNgAAAAA:K4E5Usl2brzFk8Q2CIG1t2s5MEBI1xCBjMe7CrLkIRt-xcLHUa9fStTrYQpcMdm5-XxRgCR3SXi
 21. Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res* [Internet]. 2015;6(10):4103–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594645%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4650206>
 22. Dorai T, Aggarwal BB. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2004 Nov 25;215(2):129–40.
 23. Wang H, Shu L, Su Z, Fuentes F, Lee J-H, Kong A-NT. Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(10):1281–305.
 24. Ishraq M. In Silico Validation Of Prognostic Mrna Signature In Gastric Cancer And Identification And Validation Of Novel Gastric Tissue Specific Reference Genes For Quantitative Pcr. [Ankara, Türkiye]: Bilkent Üniversitesi; 2021.
 25. Tekin Ç. Mide Kanseri Hücrelerinde Olea Europaea Yaprak Özütünün Tedavi Edici Potansiyelinin Araştırılması. [Bursa, Türkiye]: Bursa Uludağ Üniversitesi; 2021.
 26. Ji J. The Role of Wnt-induced secreted proteins (WISPs) in Gastric Cancer. 2015.
 27. Gao X. Clinical Significance of SphK1 in Chemotherapy Resistance of Gastric Cancer Patients. 2019.
 28. Kaşıkçı Y. Myrtus Communis Bitkisinden Elde Edilen Esansiyel Yağın ve Bileşenlerinin Mcf7, Mcf10a Ve Bj Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Ve Apoptotik Etkisinin İncelenmesi. [Adana, Türkiye]: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi; 2020.
 29. Deligöz H. Sh-Sy5y Hücrelerinde Hidrojen Peroksit ile Uyarılan Oksidatif Hasar Ve Apoptoz Karşı Momordica Charantia (Kudret Narı) Ekstresinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. [Kayseri, Türkiye]: Erciyes Üniversitesi; 2023.
 30. Eryılmaz IE. İki Farklı Juniperus Türü (Juniperus Communis L. Var. Saxatilis Pall. Ve Juniperus Excelsa M. Bieb. Subsp. Excelsa)'Ne Ait Yaprak Ve Meyve Özütlerinin Du145 Ve Pc-3 Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksik Ve Antitümöral Etkilerinin Araştırılması [Internet]. [Bursa, Türkiye]: Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2016. Available from:

[http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10947/Miñano Guevara%2C Karen Anali.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3346/DIVERSIDAD DE MACROINVERTEBRADOS ACUÁTICOS Y SU.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0A](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10947/Miñano%20Karen%20Anali.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttps://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/3346/DIVERSIDAD%20DE%20MACROINVERTEBRADOS%20ACUÁTICOS%20Y%20SU%20PDF?sequence=1&isAllowed=y%0A)

31. Asta C. Kudret Narı (Momordica Charantia) Çekirdek Özütünün Prostat Kanseri Hücrelerinde Genomik Olmayan Androjen Reseptör Yolağı Üzerinden Antiproliferatif Etkisi. [Kayseri, Türkiye]: Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi; 2022.
32. Frejlich E, Rudno-Rudzińska J, Janiszewski K, Salomon Ł, Kotulski K, Pelzer O, et al. Caspases and their role in gastric cancer. *Adv Clin Exp Med*. 2013;22(4):593–602.
33. Li CJ, Tsang SF, Tsai CH, Tsai HY, Chyuan JH, Hsu HY. Momordica charantia extract induces apoptosis in human cancer cells through caspase-and mitochondria-dependent pathways. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012.
34. Aydın G, Kaya E. A Review: Momordica charantia L.'s Biological Active Components and Its Potential Use in Traditional Therapies. Vol. 1. 2020.
35. Akyüz E, Türkoğlu S, Sözgen Başkan K, Tütem E, Apak MR. Comparison of antioxidant capacities and antioxidant components of commercial bitter melon (Momordica charantia L.) products. *Turkish J Chem*. 2020;44(6):1663–73.
36. Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. Momordica charantia, a nutraceutical approach for inflammatory related diseases. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY).
37. Thiagarajan SK, Rama Krishnan K, Ei T, Husna Shafie N, Arapoc DJ, Bahari H. Evaluation of the Effect of Aqueous Momordica charantia Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2019;2019.
38. Chang CI, Cheng SY, Nurlatifah AO, Sung WW, Tu JH, Lee LL, et al. Bitter melon extract yields multiple effects on intestinal epithelial cells and likely contributes to anti-diabetic functions. *Int J Med Sci*. 2021;18(8):1848–56.
39. Horax R, Hettiarachchy N, Chen P. Characteristics and functionality enhancement by glycosylation of bitter melon (Momordica charantia) seed protein. *J Food Sci*. 2014;79(11):C2215–21.
40. Ersöz Ç. Drosophila Melanogaster'de Sisplatin ve Valproik Asit'in İndüklediği Genotoksositeye Karşı Kudret Narı'nın (Momordica Charantia L.) Etkisi. [Erzincan, Türkiye]: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2019.
41. Tumkiratiwong P, Ployattarapinyo R, Pongchairerk U, Thong-asa W. Reproductive toxicity of Momordica charantia ethanol seed extracts in male rats. *Iran J Reprod Med*. 2014;12(10):695–704.
42. Akpınar H. Kudret Narı'nın (Momordica Charantia) Östrojen Reseptörlerinden ESR1 ve ESR2 Gen Düzeyleri İle Oksidatif DNA Hasarı Üzerindeki Etkisi. [İstanbul, Türkiye]: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2013.
43. Pitchakarn P, Ogawa K, Suzuki S, Takahashi S, Asamoto M, Chewonarin T, et al. Momordica charantia leaf extract suppresses rat prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2234–40.
44. Kai H, Akamatsu E, Torii E, Kodama H, Yukizaki C, Sakakibara Y, et al. Inhibition of proliferation by agricultural plant extracts in seven human adult T-cell leukaemia (ATL)-

related cell lines. *J Nat Med.* 2011;65(3–4):651–5.

45. Ranasinghe KNK, Premarathna AD, Mahakapuge TAN, Wijesundera KK, Ambagaspitiya AT, Jayasooriya AP, et al. In vivo anticancer effects of *Momordica charantia* seed fat on hepatocellular carcinoma in a rat model. *J Ayurveda Integr Med.* 2021;12(3):435–42.
46. Thiagarajan S, Arapoc DJ, Husna Shafie N, Keong YY, Bahari H, Adam Z, et al. *Momordica charantia* (Indian and Chinese Bitter Melon) Extracts Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549 via ROS-Mediated Mitochondria Injury. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2019;2019.
47. Yun Z, Chinnathambi A, Ali S, Jin Z. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Vetex negundo* and evaluation of pro-apoptotic effect on human gastric cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2020;203(November 2019):111749.
48. Brennan VC, Wang CM, Yang WH. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract suppresses adrenocortical cancer cell proliferation through modulation of the apoptotic pathway, steroidogenesis, and insulin-like growth factor type 1 receptor/RAC- α serine/threonine-protein kinase signaling. *J Med Food.* 2012 Apr 1;15(4):325–34.
49. Güneş H, Alper M, Çelikoğlu N. Anticancer effect of the fruit and seed extracts of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on human cancer cell lines. *Trop J Pharm Res.* 2019;18(10):2057–65.
50. Thiagarajan S, Arapoc DJ, Husna Shafie N, Keong YY, Bahari H, Adam Z, et al. *Momordica charantia* (Indian and Chinese Bitter Melon) Extracts Inducing Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line A549 via ROS-Mediated Mitochondria Injury. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2019;2019.
51. Tabata K, Hamano A, Akihisa T, Suzuki T. Kuguaglycoside C, a constituent of *Momordica charantia*, induces caspase-independent cell death of neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 2012 Dec;103(12):2153–8.
52. Erdoğan K. U87G KANSER HÜCRESİNDE KUDRET NARI (*Momordica charantia*) ÖZÜTÜNÜN Sparc ve Src-1 PROTEİN EKSPRESYON SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ. [Bilecik, Türkiye]: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; 2020.
53. Singh MP, Sarangdevot YS, Sisodia SS. Wound healing activity of the whole plant of *Momordica charantia* Linn. in rats. *Indian Drugs.* 2018;55(11):64–70.
54. Alsarayreh AZ, Attalah Oran S, Shakhanbeh JM. In vitro and in vivo wound healing activities of *Globularia arabica* leaf methanolic extract in diabetic rats. *J Cosmet Dermatol [Internet].* 2022 Oct 1 [cited 2023 Aug 1];21(10):4888–900. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jocd.14882>

ÖZGEÇMİŞ