

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KUKURBİTASİN I ve *Ecballium elaterium* L. EKSTRAKTININ MEME KANSER
HÜCRELERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Kadir YILMAZ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. İsmet YILMAZ
OCAK-2016**

Tezin Başlığı: **Kukurbitasin I ve *Ecballium elaterium* L. Ekstraktının Meme Kanseri Hücreleri Üzerine İnhibisyon Etkisinin Araştırılması**

Tezi Hazırlayan: Kadir YILMAZ

Sınav Tarihi: 15.01.2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Tez Danışmanı: Prof.Dr. İsmet YILMAZ (Danışman)
İnönü Üniversitesi

Prof.Dr. Fikret KARATAŞ
Fırat Üniversitesi

Prof.Dr. Burhan ATEŞ
İnönü Üniversitesi

Doç.Dr. Türkan KUTLU
İnönü Üniversitesi

Doç.Dr. İlknur ÖZDEMİR
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Alaattin ESEN
Enstitü Müdürü

Ailene

ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “**Kukurbitasin I ve *Ecballium elaterium* L. Ekstraktının Meme Kanseri Hücreleri Üzerine İnhibisyon Etkisinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Kadir YILMAZ

ÖZET

Doktora Tezi

KUKURBİTASİN I ve *Ecballium elaterium* L. EKSTRAKTININ MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Kadir YILMAZ

İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

xv + 80

2016

Danışman: Prof.Dr.İsmet YILMAZ

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Kadınlarda özellikle meme kanseri ciddi bir mortaliteye sahiptir. Kanser tedavilerinde ciddi gelişmeler olmakla beraber mortalitelerde düşüş olmaması hastaları farklı alternatif tedavi yöntemlerini kullanmaya yönlendirmektedir. Bunların başında ise bitkisel tedaviler gelmektedir.

Çalışmamızda Kukurbitasin I, *Ecballium elaterium* L. (*E.elaterium*) bitkisinin meyve suyu ve kloroform ekstraktının meme kanseri hücreleri üzerine inhibisyon etkisini *in vitro* olarak araştırılması amaçlandı. Elde edilen *E.elaterium* bitkisinin meyve suyu ve kloroform ekstraktının Kukurbitasin I içeriği, HPLC cihazıyla tespit edildi. Meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I'nın meme kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri, MTT, Wound Healing ve Koloni Formasyon testleri ile araştırıldı.

Yapılan MTT analizlerine göre; Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde, 400 nM konsantrasyonunda 72. saatte %68,76; MDA-MB-231 hücrelerinde ise aynı konsantrasyonda %82,48'lik inhibisyon etkisi görüldü. *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde, 10 mg/mL'de 72. saatte %85,16; MDA-MB-231 hücrelerinde ise aynı konsantrasyonda %52,47'lik inhibisyon etkisi görüldü. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde, 0,1 mg/mL'de 72. saatte %87,51; MDA-MB-231 hücrelerinde ise aynı konsantrasyonda 72. saatte %64,95'lik inhibisyon etkisi görüldü.

Wound Healing testlerinden elde edilen sonuçlarda ise; 36. saat sonunda kontrol gruplarında hücre göçü devam ederken, Kukurbitasin I, *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile tedavi sonunda hücre göçü yeteneğinin belirgin bir şekilde azaldığı görüldü.

Koloni formasyon testinde de Kukurbitasin I, *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile tedavi sonucu her iki kanser hücrelerinde belli bir dozdan sonra koloni oluşturma yeteneklerinin tamamen yok olduğu tespit edildi.

Deneysel çalışmamızdaki sonuçlarımıza göre; kanser hücrelerinde *E.elaterium*'un meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I'nın anti-proliferatif etki göstererek hücre çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Kukurbitasinlerin etki mekanizmalarının tam olarak belirlenmesi, meme kanseri tedavisi için yeni moleküler hedeflerin tanımlanmasına olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kukurbitasin I, Meme Kanseri, *Ecballium elaterium*

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECT OF CUCURBITACIN I AND *Ecballium elaterium* L. EXTRACT ON BREAST CANCER CELLS

Kadir YILMAZ

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

xv + 80

2016

Supervisor: Prof.Dr.İsmet YILMAZ

Cancer is among the major health problems nowadays. Breast cancer has a significant mortality, especially in women. Although important progress has been made in cancer therapy, it is not enough to decrease mortality rate. Thus, the patients search alternative therapy methods. One of the most popular is herbal remedies.

Objective of this study was to investigate the inhibitory effect of Cucurbitacin I and *Ecballium elaterium* L. (fruit juice and chloroform extract) on breast cancer cells. Cucurbitacin I content of *E.elaterium* fruit juice and chloroform extract was quantified using HPLC. The cytotoxic effects of the fruit juice, chloroform extract and Cucurbitacin I on breast cancer cells were determined by MTT, wound healing and colony formation assay.

According to MTT results, it is observed that a significant inhibitory effect in Cucurbitacin I treated breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 with %68,76 and %82,48 at 400 nM for 72 h, respectively. Inhibitory effect of the fruit juice of *E. elaterium* was %85,16 for MCF-7 cells and %52,47 for MDA-MB-231 at 10 mg/mL for 72 h. In addition, chloroform extract inhibited %87,51 of MCF-7 cells and %64,95 of MDA-MB-231 cells at 0,1 mg/mL for 72 h.

In the dose-time Wound Healing assay, it sees that while cell migration continued in control group (untreated) at 36 h, there was significantly decrease in the cell migration in treated cells with Cucurbitacin I, *E. elaterium* fruit juice and chloroform extract.

It was also found that treated cells with Cucurbitacin I, *E. elaterium* fruit juice and chloroform extract are unable to form colonies after specific dose in Colony Formation assay.

Our data showed that Cucurbitacin I, *E.elaterium* fruit juice and chloroform extract have anti-proliferative activity on the breast cancer cells. Clarifying the mechanisms of cucurbitacins enable to identify new molecular targets for breast cancer therapy.

Key Words: Cucurbitacin I, Breast Cancer, *Ecballium elaterium*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisiyle ve fikirleriyle bize ışık tutan, bilimi bize sevdiren, değerli danışman hocam Prof.Dr. İsmet Yılmaz'a, Yrd.Doç.Dr. Ergül EYOL'e, Prof.Dr. Burhan ATEŞ'e ve Doç.Dr. Turan ARABACI'ya; laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan doktora öğrencileri Fuat KARAKUŞ, Emir TOSUN, Merve Gökşin KARAASLAN, Selam GÜLGEN, Sevgi BALCIOĞLU, Tuğçe YAŐAR'a, İnönü Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Birimine ve Alman Kanser Araştırma Merkezi Toksikoloji ve Kemoterapi Bölümünden Prof.Dr. Martin BERGER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1.Kanser Nedir?	3
2.2.Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme kanseri nedenleri	6
2.2.2. Meme kanserinde tedavi yöntemleri	7
2.2.2.1. Cerrahi tedavi	8
2.2.2.2. Radyoterapi	8
2.2.2.3. Hormonal tedavi	8
2.2.2.4. Kemoterapi	8
2.2.3. Meme kanser tedavilerinin yan etkileri	9
2.2.4. Kanserde tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) yöntemleri	9
2.3. <i>Ecballium elaterium</i> (L). A. Rich.	10
2.3.1. <i>Ecballium elaterium</i> (L). bileşimi	11
2.3.2. <i>Ecballium elaterium</i> (L). A. Rich biyolojik ve farmakolojik özellikleri.....	13
2.3.3. Kukurbitasinler	14
2.3.3.1. Kukurbitasin I.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	19
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Üretici Firmaları	20
3.3. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri.....	21
3.3.1. MCF-7 hücre hattı ve özellikleri	21

3.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı ve özellikleri.....	22
3.4. Hücre Kültürü.....	24
3.4.1. Hücre kültüründe kullanılan besiyeriun hazırlanışı.....	24
3.4.2. Stok hücrelerin ekimi	24
3.4.3. Besiyeri değişimi	25
3.4.4. Hücrelerin pasajlanması	25
3.4.5. Tümör hücrelerinin dondurulması.....	25
3.5. Kukurbitasin I Temini ve Muhafazası	26
3.6. Bitki Materyali ve Ekstraktların Hazırlanması	26
3.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Numunelerinin Hazırlanması	26
3.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri.....	27
3.9. MTT Testi	27
3.10. Wound Healing Testi.....	28
3.11. Koloni Formasyon Testi	29
3.12. İstatiksel Analiz	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1.Kukurbitasin I'nın HPLC Analiz Sonuçları	32
4.2. <i>Ecballium elaterium</i> Meyve Suyunun HPLC Analiz Sonuçları	33
4.3. <i>Ecballium elaterium</i> Kloroform Ekstraktının HPLC Analiz Sonuçları.....	34
4.4. MTT Test Sonuçları.....	34
4.4.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri	35
4.4.2. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri.....	36
4.4.3. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri.....	37
4.4.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri	38
4.4.5. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri	39
4.4.6. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri.....	40

4.5. Wound Healing Test Sonuçları.....	41
4.5.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri	42
4.5.2. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri	44
4.5.3. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri.....	46
4.5.4. MDA-MB-231 hücre hattı için Kukurbitasin I Wound Healing testi analizleri	48
4.5.5. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri	50
4.5.6. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri.....	52
4.6. Koloni Formasyon Testi Sonuçları	54
4.6.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları	54
4.6.2. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	55
4.6.3. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları	56
4.6.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	57
4.6.5. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB 231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	58
4.6.6. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları	59
4.7. Hücre Morfolojisi Görüntü Analizleri	60
4.7.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ..	60
4.7.2. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	61

4.7.3. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	62
4.7.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	63
4.7.5. <i>Ecballium elaterium</i> meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	64
4.7.6. <i>Ecballium elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri	65
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	72
7. KAYNAKLAR	73
8. ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER DİZİNİ

α-Elaterin	Kukurbitasin E
β-Elaterin	Kukurbitasin B
3T3-L1	Embriyonik fibroblast hücre hattı
ATC-CD133⁺	Anaplastik tiroid kanser hücre hattı
AGS	İnsan gastrik karsinoma hücre hattı
B16-F1	Fare melanoma hücre hattı
BJAB	İnsan burkit lenfoma hücre hattı
BALBc	Beyaz deney faresi
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
C3H10T1/2	Fare mezenkimal hücre hattı
CDC25C	Hücre bölünme döngüsü 25C
CDK1	Siklin bağlı kinaz 1
COX-1	Sikloosijenaz-1
COX-2	Sikloosijenaz-2
CT-26	Fare kolon karsinoma hücre hattı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
FBS	Fetal bovin serum
FGFR-1	Fibroblast büyüme faktör reseptörü 1
HIF-1-α	Hipoksi-indüklenebilir faktör 1-alfa
HCT116	İnsan kolon karsinoma hücre hattı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HT1080	İnsan fibrosarkoma hücre hattı
HT29	İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
HUVEC	İnsan umbilikal damar endotelyal hücre hattı
I83-E95	İnsan kronik B lösemi hücre hattı
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
JAK	Janus kinaz
JSI 124	Jack stat inhibitörü 124

KYSE30	Yemek borusu skuamöz karsinoma hücre hattı
MAPK	Mitogen-aktiviteli protein kinaz
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	M.D. Anderson 231 meme kanseri hücre hattı
MTT	3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NALM-6	Prekürsör B İnsan lösemi hücre hattı
NCCAM	Uluslararası Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Merkezi
NCI-H460	İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı
NIH	Uluslararası Sağlık Enstitüsü
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
RPMI 1640	Roswell park memorial institute 1640
SF-268	İnsan gliyoma and astroksitoma hücre hattı
SRB	Sülfat indirgeyici bakteri testi
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivitörü
SW-480	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
TAT	Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi
TNBC	Triple negatif meme kanseri
VEGF-2	Vaskular endotelyal büyüme faktörü-2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Uluslararası Kansere Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre dünyadaki ülkelere göre kanser vakalarının dağılımı.....	3
Şekil 2.2.	Kanser hücrenin oluşumu.....	4
Şekil 2.3.	Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.....	5
Şekil 2.4.	Meme kanseri görüntüsü.....	6
Şekil 2.5.	<i>E.elaterium</i> 'un meyve ve çiçek görüntüsü.....	11
Şekil 2.6.	Kukurbitasinlerin genel formülü.....	12
Şekil 2.7.	<i>E.elaterium</i> 'dan izole edilen stereoller.....	12
Şekil 2.8.	<i>E.elaterium</i> 'dan izole edilen fenolik bileşikler.....	13
Şekil 2.9.	(a). Kukurbitasin I'nın üç boyutlu görüntüsü (b). Kukurbitasin I'nın iki boyutlu görüntüsü.....	17
Şekil 3.1.	MCF-7 hücrenin görüntüsü.....	21
Şekil 3.2.	MDA-MB-231 hücrenin görüntüsü.....	23
Şekil 3.3.	Kukurbitasin I kalibrasyon grafiği.....	27
Şekil 4.1.	Kukurbitasin I'nın HPLC diyagramı.....	32
Şekil 4.2.	<i>E.elaterium</i> meyve suyuna ait HPLC kromatogramı.....	33
Şekil 4.3.	<i>E.elaterium</i> 'un kloroform ekstraktına ait HPLC kromatogramı...	34
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrenin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	35
Şekil 4.5.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrenin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	36
Şekil 4.6.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrenin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	37
Şekil 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrenin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	38

Şekil 4.8.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	39
Şekil 4.9.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları.....	40
Şekil 4.10.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi görüntüleri.....	42
Şekil 4.11.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları.....	43
Şekil 4.12.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	44
Şekil 4.13.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları.....	45
Şekil 4.14.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	46
Şekil 4.15.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları.....	47
Şekil 4.16.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	48
Şekil 4.17.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları.....	49

Şekil 4.18.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	50
Şekil 4.19.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları.....	51
Şekil 4.20.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	52
Şekil 4.21.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri.....	53
Şekil 4.22.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Koloni Formasyon testi sonuçları.....	54
Şekil 4.23.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	55
Şekil 4.24.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücresinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	56
Şekil 4.25.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin 0., 12., 24. ve 36. saat Koloni Formasyon testi sonuçları.....	57
Şekil 4.26.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	58
Şekil 4.27.	<i>E.elaterium</i> 'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücresinin Koloni Formasyon testi sonuçları.....	59

Şekil 4.28.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	60
Şekil 4.29.	Farklı konsantrasyonlarda <i>E.elaterium</i> 'un meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	61
Şekil 4.30.	Farklı konsantrasyonlarda <i>E.elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	62
Şekil 4.31.	Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	63
Şekil 4.32.	Farklı konsantrasyonlarda <i>E.elaterium</i> 'un meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	64
Şekil 4.33.	Farklı konsantrasyonlarda <i>E.elaterium</i> 'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri.....	65

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1.	Kullanılan sarf malzemeler.....	19
Tablo 3.2.	Kullanılan cihazlar ve üretici firmaları.....	20
Tablo 3.3.	MCF-7 hücre hattının özellikleri.....	22
Tablo 3.4.	MDA-MB-231 hücre hattının özellikleri.....	23

1.GİRİŞ

Kanser çağımızın en önemli sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütüne göre 2012 yılında 14,1 milyon insan kansere yakalanmış ve 8,2 milyon kişi kansere bağlı nedenlerden dolayı hayatını kaybetmiştir. Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda, nüfustaki yaşlanmaya ve dünya nüfusunun artışına bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir (globocan.iarc.fr, 2015).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2011 yılı Türkiye Kanser İstatistiklerine göre kadınlarda en çok tespit edilen kanser türü olarak meme kanseri %35,47 oranıyla birinci sırada yer almaktadır (saglik.gov.tr., 2015). Meme kanseri kadınlarda görülen ikinci ölüm nedenidir. Her sekiz kadından birinin yaşamı sırasında meme kanseri tanısı konacağı ve otuz kadından birinin meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir (Sayhan, 2013).

Uygarlığın başından beri dünyadaki bütün medeniyetler bitkileri ilaç olarak kullanmıştır. Örneğin geleneksel Çin Tıbbı, Amerikan yerlilerinin şifa yöntemleri, Hint Ayurveda sistemini de içine alan geleneksel tıp sistemleri tedavi yöntemlerinde öncelikle bitkileri kullanmışlardır. Kanser tedavisinde bitkisel tedavi yöntemleri günümüzde de çok önemlidir. Birçok hasta, doktoruna danışmadan hastalık tedavisine ek olarak bitkisel ürünleri kullanmaktadır (Kılıçarslan, 2012).

Kabakgiller botanik sınıflandırmada Dicotyledoneae sınıfı, Cucurbitales takımı, Cucurbitaceae familyası içerisinde yer almaktadır (Bisognin vd., 2002). Cucurbitaceae familyası bitkileri, insanlar tarafından besin ve lif elde etmede kullanılmıştır. Geleneksel tıpta, Kukurbitasin içeren bitkiler ateş düşürücü, ağrı kesici, iltihaplanmayı önleyici, mikrop öldürücü ve tümörlere karşı aktiviteleriyle bilinmektedir. Cucurbitaceae familyasından *Ecballium elaterium* L. (*E.elaterium*) ülkemizde yaygın olarak yetişen, Mayıs-Eylül arası çiçek açan, çok senelik, monoik otsu bir bitkidir. Halk tıbbında meyvelerden elde edilen özütü çeşitli amaçlarla, müshil ve idrar söktürücü olarak ve sinüzite karşı kullanılmaktadır. Bitkinin içerdiği Kukurbitasinlerden dolayı antitümoral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Dinan vd., 1997).

Kukurbitasinler, 19(10→9β)-abeo-10α-lanost-5en iskeleti son derece oksijenlenmiş C30 triterpenoitlerinin bir grubudur. Tüm Kukurbitasin türleri, bir 5(6)-

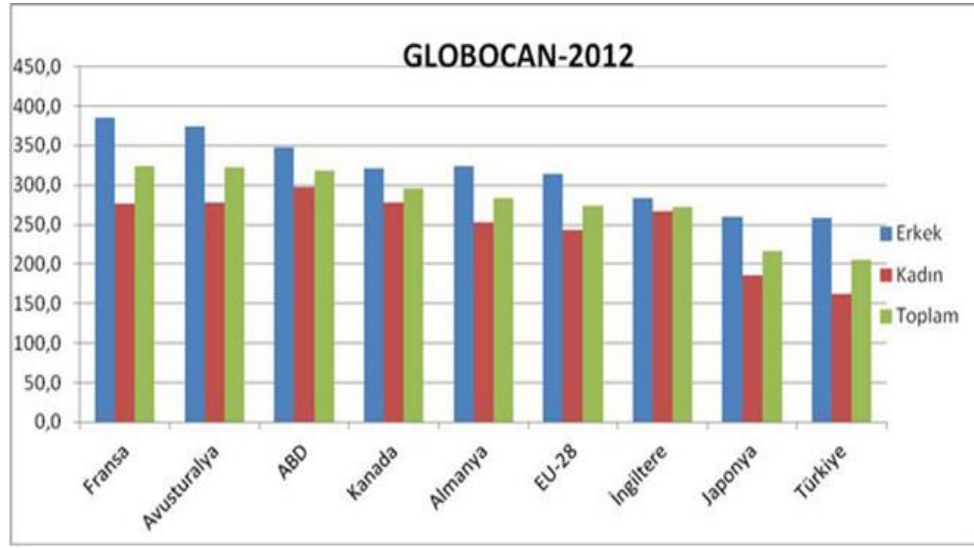
çift bağa sahiptirler. Tam olarak steroidal olmayıp bir metil grubu, C-10'dan ziyade C-9'da yerleşiktir (Şekil 2.6). A'dan T'ye olmak üzere 17 ana molekül vardır. Bunların arasından B, D, E, I, F, O, P ve Q türleri güçlü kanser karşıtı aktivitelerinden dolayı geniş bir şekilde araştırılmıştır (Dinan vd., 1997; Lee vd., 2010).

Çalışmamızda Kukurbitasin I, *E.elaterium* bitkisinin meyve suyu, kloroform ekstraktının meme kanseri hücreleri (MCF-7, MDA-MB-231) üzerine inhibisyon etkisini *in vitro* olarak araştırılması amaçlandı. *E.elaterium* bitkisi, Ağustos ayı sonu ile Eylül ayı başlarında Adana'da toplandı. *E.elaterium* bitkisinin meyve suyu ve kloroform ekstraktı elde edildi. Elde edilen meyve suyu ve kloroform ekstraktının Kukurbitasin I içeriği HPLC cihazıyla tespit edildi. Kukurbitasin I, *E.elaterium* bitkisinin meyve suyu ve kloroform ekstraktının, meme kanser hücrelerini üzerine sitotoksik etkileri; MTT, Wound Healing ve Koloni Formasyon testleri ile araştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

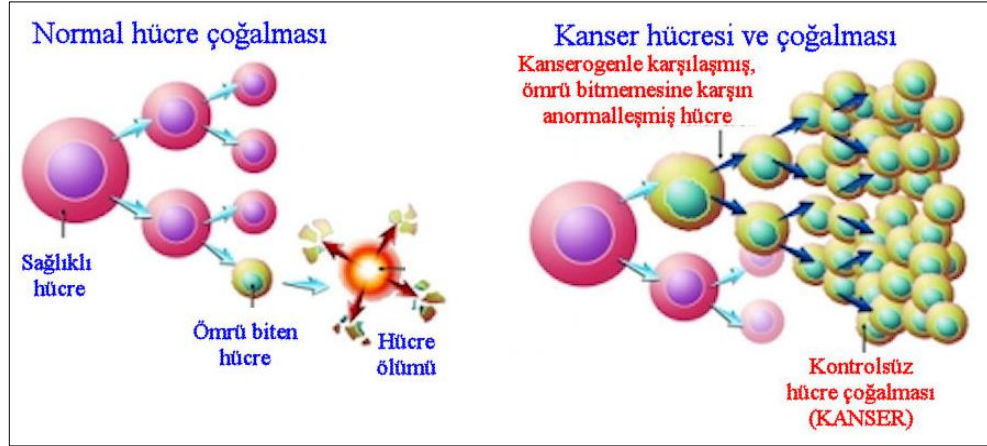
2.1. Kanser Nedir?

Kanser dünyada başlıca hastalık nedeni olmaya devam etmektedir. Dünyada en çok teşhis konulan kanserler arasında başta akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) kanserinin olduğu belirtilmiştir. Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda, nüfustaki yaşlanmaya ve dünya nüfusunun artışına bağlı olarak 2025 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakasının gerçekleşebileceği bildirilmiştir (globocan.iarc.fr, 2015).



Şekil 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre dünyadaki ülkelere göre kanser vakalarının dağılımı (Dünya Standart nüfusu, 100000 kişide)

Kanser, vücut hücrelerinin anormal şekilde vücut içine yayılması ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla tariflenen bir hastalıktır (Dhannikula vd., 1999). Normal dokularda hücre çoğalması ve ölümü arasındaki denge sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu dengedeki bir bozukluk kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olur (Croce, 2008). Bu tip hücre davranışıyla karakterize edilen kanser, genellikle hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kısacası normal davranışlarını kontrol eden mekanizmaların bozulmasına bağlı olarak gelişir (Lodish vd., 2004). Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenleyen baskılayıcı genler ve onkogenleri kodlayan bölgelerdeki mutasyonlar kanser gelişiminde kaçınılmazdır (Duursma ve Agami 2003; Scholzova 2007).



Şekil 2.2. Kanser hücresinin oluşumu (saglik.zararlari.com., 2015)

Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki özelliği vardır. Birincisi, malign hücrelerin hücre dışı matris bileşenlerini parçalayarak kanser hücresinin komşu dokunun içine girmesini sağlayan proteazları salgılamasıdır. İkincisi ise, kanser hücrelerinin anjiyogenezini hızlandıran büyüme faktörlerini salgılamasıdır (Cooper and Hausman, 2006).

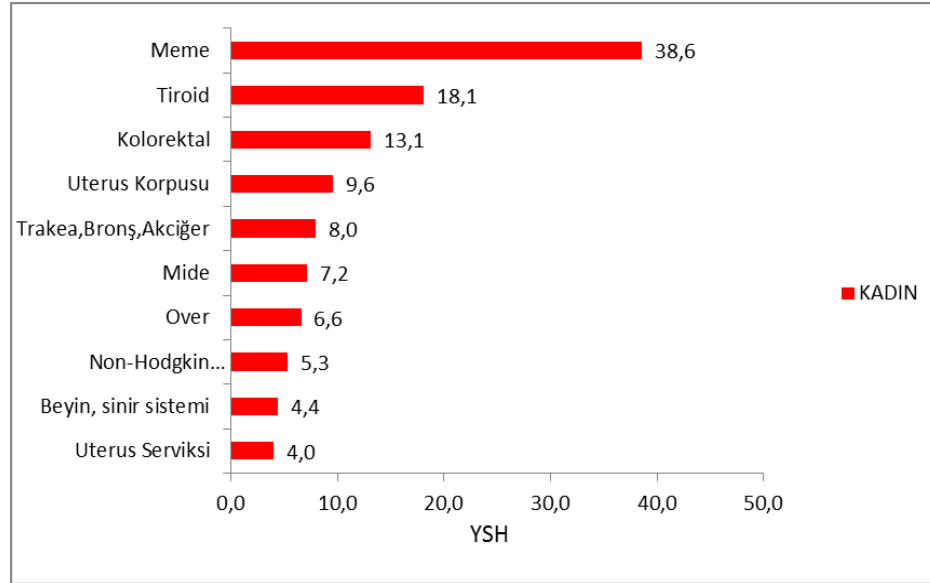
Kanser oluşumunu meydana getiren ajanlar; fiziksel, kimyasal, viral gibi çevresel kaynaklı veya ailesel kanser sendromlarını içeren kalıtsal kaynaklı olabilmektedir (Wong ve Ng, 2007). Kanser oluşum süreci başlangıç, yükselme ve ilerleme olmak üzere üç aşamadan meydana gelir. Başlangıç aşaması, hızlı ve geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Hasara uğrayan DNA'nın onarımı gerçekleşmediği takdirde klonal yayılmaya hücre çoğalmaya başlar ve yavru hücrelere hasarlı DNA aktarılır (Farber 1984; Oliveira vd., 2007). Başlangıç aşamasında, sadece simetrik hücre bölünmesi gerçekleşir ve bu da farklılaşmış yavru hücrelerin aksine benzer tipte iki hücre oluşumunu uyarır. Eğer bu hücreler çevredeki hücreler tarafından baskılanırsa tümör oluşmaz. Diğer yandan çevredeki hücrelerin baskılayıcı etkisini ortadan kaldıran ajanlar tetiklenirse, farklılaşmayan başlangıç hücresi çoğalarak dokuda birikir. Bu aşamaya yükselme evresi denir (Trosko vd., 1996). Başlangıç hücresine diğer genetik ve epigenetik değişimlerin de eklenmesiyle, başlangıç hücresi birikir ve diğer dokulara metastaz yapabilir. Bu aşama ilerleme aşaması olarak kaydedilmiştir (Pitot vd., 1981). İlerleme aşamasında hücre proliferasyonu uyarıdan bağımsızdır ve bu aşamanın

karakteristik özellikleri hızlı gelişim, invazyon, metastaz, anjiyogenez, biyokimyasal, metabolik ve morfolojik özelliklerde değişim olarak sıralanabilir (Folkman, 2002).

Kanser hücreleri vücudun her yerinden çıkabilir ve yayılabilirler. Kanser tipleri karsinoma, sarkoma, lenfoma ve lösemi gibi adlarla karakterize edilir. Amerika da en sık görülen karsinoma tipi meme kanseridir (cancer.org, 2015).

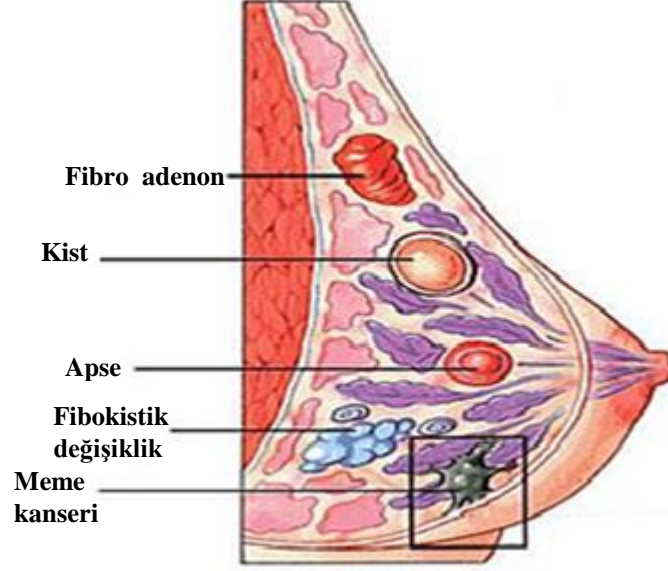
2.2. Meme Kanseri

Kanser giderek artış gösteren global bir sağlık sorunudur. Meme kanseri de dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Ismail-Khan ve Bui, 2010). Amerikan Kanser Derneği'nin 2012 verilerine göre kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %33'unu oluşturmaktadır (cancer.org, 2012).



Şekil 2.3. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Dünya Standart nüfusu, 100000 kişide)

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş, farklılaşmış süt bezleri ve kanallardan oluşan tubulo-alveolar bir ter bezidir. Meme dokusunda bulunan bu süt bezleri ve kanalları oluşturan hücrelerin kontrol dışı çoğalmaları ve vücudun çeşitli yerlerine metastaz yaparak çoğalmaya devam etmelerine meme kanseri denir (Sayhan, 2013).



Şekil 2.4. Meme kanseri görüntüsü (drozon.com, 2015)

Meme kanseri kadınlarda en sık ikinci ölüm nedenidir. Her sekiz kadından birinin yaşamı sırasında meme kanseri tanısı konacağı ve otuz kadından birinin meme kanseri nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Tarama programlarının artmasına, operasyon tekniklerinin gelişmesine ve adjuvan (yardımcı) tedavilere rağmen meme kanseri, kadınlarda mortalite ve morbiditenin önemli nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Bu yüksek risk nedeniyle, meme kanseri bir halk sağlığı sorunu olarak ele alınmaktadır (Sayhan, 2013).

Klinik ve kendi kendine meme muayenesi yapılması, mamografi çektilmesi ve gerekli görüldüğü durumlarda deultrasonografi ile manyetik rezonans gibi ilave tarama yöntemlerinin kullanılması meme kanserinden kaynaklanan ölümlerin önlenmesini ve hastalığa yakalananların erken evrede tanısının konması ve tedavi imkanına kavuşabilmeleri için oldukça önemlidir (Somunoğlu, 2009).

2.2.1. Meme kanseri nedenleri

Meme kanseri genetik ve çevresel faktörlerin çok güçlü rol aldığı kompleks, multifaktöriyel bir hastalıktır (Martin and Weber, 2000). BRCA-1 (breast cancer-1) ve BRCA-2 (breast cancer-2) gibi tümör baskılayıcı gen mutasyonları, ailede meme ve yumurtalık kanseri bulunması gibi genetik faktörler hastalığın ortaya çıkma riskini arttırmaktadır. Bununla beraber risk faktörü olarak reproduktif faktörlerin ilk primer

meme kanseri için önemli olduğu belirlenmiştir (Kelsey vd., 1993). Meme dokusunun uzun dönem östrojene maruz kalma süresi, geç menopozun ve ilk doğumunu 35 yaşından sonra yapmış olmanın da meme kanseri riskini arttırdığı bulunmuştur (MacMahon vd., 1982).

Yağdan zengin beslenme, diyetteki hayvansal yağların %10'dan fazla olması meme kanseri riskini arttırmaktadır (Rohan vd., 1993). Ama diyetteki yağın %5'in altında olması özellikle yağ içermeyen diyetle beslenme, tümörün büyümesini dahi inhibe edebilmektedir. Alkol kullanan kadınlarda da meme kanseri daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Meme kanseri olup tedavi olan kadınların, diğer memesinde kanser gelişme olasılığının meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir. Kadınların adet görmeye erken yaşta başlamaları, bununla birlikte ilerleyen yaşlarda menopoza girilmesi fertil çağını uzatmasıyla birlikte, daha uzun süre östrojen hormonuna maruz kalma süresini artırması, meme kanseri gelişme riskini yükselttiğini işaret etmektedir (Atay, 2014). Riski azaltan faktörler olarak da erken menopoz (Eisen vd., 2005), emzirme (Newcomb vd., 1994), fiziksel aktivite (McTiernan vd., 2000), selektif östrojen reseptör modülatörü kullanımı (Biglia vd., 2004) bildirilmiştir.

Meme kanser tipleri kanser hücrelerinin yerleşim yerine ve yaygınlığına göre isimlendirilmektedir. Genel olarak hücreler süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobüler, medullada ise medüller meme kanseri olarak adlandırılır. Kanser hücreleri, çevresindeki dokulara metastaz yaptıklarında invazif, metastaz yapmadıklarında in situ olarak isimlendirilirler. İnvazif duktal karsinom en fazla görülen meme kanseri tipi olup tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %75'ini oluşturduğu bildirilmiştir (Atay, 2014).

2.2.2. Meme kanserinde tedavi yöntemleri

Günümüzde meme kanserinde ele alınan tedaviler, tümörün evresine, hastanın yaşına ve menopoz öncesi ya da sonrası dönemde olmasına göre, kanser hücrelerinin hormonlara bağlı olup olmasına ve hastanın tercihinine göre değişmektedir (Ogden, 2004). Tedavi seçenekleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve hormonterapiden oluşan multidisipliner tedavilerdir.

2.2.2.1. Cerrahi tedavi

Meme kanserinde ilk kullanılan yöntem cerrahi tedavi olmuştur. Cerrahi tedavinin en uygun olduğu tümör büyüklüğü 5 cm ve altında olan hasta gruplarıdır. (Fisher vd., 2002; Veronesi vd., 2002). Cerrahi tedavinin kullanım amaçları; total kanser hücrelerini azaltmak, primer olarak tümörü çıkartmak ve palyatif olarak hastalık semptomları azaltmaktır. Bununla birlikte yapılan biyopsiler sonucunda konulan tanıya da yardımcı olmaktadır (Dedeoğlu, 2014).

2.2.2.2. Radyoterapi

Radyoterapinin temeli iyonize radyasyon ile tümör hücrelerini yok etmek veya azaltmaktır. Kanser tedavisindeki ilk kullanımı 1899 yılına dayanmakta ve X ve γ ışınlarının kullanılmasıyla uygulanmaktadır. Radyoterapi, DNA lezyonlarına ve hücrenin moleküllerine etki edip hücreleri ölüme götürmektedir (Baba and Cătoi, 2007). Ayrıca radyoterapi tedavisi, koltuk altı lenf nodlarının ileri safhada olduğu durumlarda da uygulanabilmektedir. Radyoterapi meme kanserinde lokal kontrolü arttırdığı gibi genel sağkalımı da uzatmaktadır (Vatansev, 2014).

2.2.2.3. Hormonal tedavi

Meme kanserinde başlangıç evresinde östrojen hormonunun aktivitesi baskılanarak hormonal tedavi yapılır (Sledge, 1996). Hormonal reseptör pozitifliği saptanan hastalarda yaklaşık %60 cevap elde edilebilen hormonal tedavi yöntemi, palyatif ve adjuvan tedavi olarak kullanılmaktadır. Endokrin yanıtı postmenapozal hastalarda aromataz inhibitörü kullanımı, premenapozal hastalarda ise GnRH ve tamoksifen analogları kullanımı günümüzde önerilen tedavi yaklaşımlarıdır (Geçici, 2013).

2.2.2.4. Kemoterapi

Kimyasal ilaçların uygulanması yolu ile kanserin sistematik tedavisidir. Kemoterapik ajanlar çeşitli şekillerde uygulanabilir. Oral veya intravenöz kullanılan tipleri en yaygın olanıdır (Akdemir ve Birol, 2003). Kemoterapi için metotreksat,

siklofosfamid, 5 fluorourasil en sık kullanılan kemoterapik ajanlardır. Meme kanserinde farklı evrelerde uygulanan kemoterapinin, adjuvan olarak kullanıldığında tekrar etme riskini %25, ölüm riskini %15 azalttığı, sağkalımı da anlamlı olarak artırdığı bildirilmektedir (Geçici, 2013).

2.2.3. Meme kanser tedavilerinin yan etkileri

Kanser tedavisinde kemoterapi istenen etkilerinin yanında, istenmeyen çok fazla toksik etkiye sahiptir. Kemoterapi ilaçlarının amacı ve yeteneği hızlı büyüyen ve çoğalan hücreleri yok etmektir. Kanser hücreleri bu özelliklere sahip olduğu için, hasta kemoterapiden fayda görür. Ancak insan vücudundaki sağlıklı hücreler de kanser hücreleri gibi ilaçlardan etkilenecek, zarar görürler. Kemoterapinin en sık görülen yan etkileri mide bulantısı, halsizlik ve saç dökülmesidir. Diğer yan etkiler ise kanamalar, sinir sisteminde nöropati, enfeksiyon, mukozit, uykusuzluk, tat değişikliği, kansızlık ve ağrıdır (Tankişi, 2007).

Radyoterapide tedavi sırasında geçici yan etkiler oluşabilmektedir. Uzun dönemde ise, kalıcı bazı yan etkiler görülebilmektedir. Radyoterapinin yan etkileri uygulanan bölgeye ve doza göre değişiklikler gösterebilir. Saç dökülmesi, lökopeni, fibrozis ve radyasyon pnömonisi oluşan yan etkilerdir. Radyoterapi uygulanan bölgede, ciltte hassaslaşma, kuruma, cildin renginde koyulaşma ve kızarma olabilir (Tankişi, 2007).

Cerrahi tedavide, cerrahi alanda ağrı, geçici şişkinlik, hassasiyet, kanama, hematoma ve enfeksiyon gibi çeşitli yan etkiler oluşabilir. Hormon tedavisinde de, uterus kanseri riskinde artış, kan pıhtılaşması, kalp krizi ve kas ağrısı gibi ciddi yan etkilerin gelişimine neden olabilir (cancer.org, 2012).

2.2.4. Kanserde tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) yöntemleri

Tamamlayıcı tedavi; standart tedaviye destek olarak, semptom kontrolünü sağlamada ve hastanın bakımını güçlendirmede kullanılan yaklaşımlar iken, alternatif tedavi ise standart tedavinin yerine kullanılan bir yöntemdir (Can, 2012).

Kanser hastaları ilaçların yan etkilerini azaltma, immün sistemi güçlendirme, umutsuzluk psikolojisinden kurtulma, çevre baskısı ve internet etkisi nedeniyle

tamamlayıcı ve alternatif (TAT) yöntemlerini kullanmaktadır. TAT kullanımı son yıllarda hem gelişmekte olan hem de endüstrileşmiş ülkelerde giderek artmıştır. Yapılan araştırmalar kanser hastalarının önemli bir kısmının TAT yöntemlerine başvurduğunu ortaya çıkarmıştır (Bilge, 2010).

TAT yöntemlerine artan ilgi nedeniyle 1998 yılında Amerika'da Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) bağlı ulusal tamamlayıcı ve alternatif tıp merkezi (NCCAM) kurulmuştur. Bu merkezin amacı TAT uygulamaları hakkında bilimsel araştırmalar yapmak, bunların etkinliğini ve güvenilirliğini inceleyip halkı bilgilendirmek ve kanıtlanmış tedavilerin modern tıba entegrasyonunu sağlamaktır (Bilge, 2010).

Tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamaları çok sayıda alt gruba ayrılarak incelenebilir. NCCAM'ın TAT sınıflaması aşağıda gösterilmiştir.

1. Biyolojik temelli tedaviler
2. Zihin-beden etkileşimine dayanan uygulamalar
3. Enerji tedavileri
4. El becerileri ve beden ile ilgili yöntemler
5. Tıbbi uygulamalar (Ayurvedik tıp, Çin tıbbı, homeopati ve doğal tıp gibi) (nccam.nih.gov/health/whatiscom., 2015; Gültekin, 2012).

Bu tedavi yöntemlerinin en yaygın olan ve en hızlı gelişen bölümünü, bitkisel kökenli ürünler oluşturmaktadır (Robinson and Zhang, 2011). Ülkemizde ve birçok ülkede antioksidan, antitümör, antikanser, antiinflamatuvar v.b. etkileri nedeniyle dikkatleri üzerine çeken Cucurbitaceae familyasına ait *Ecballium elaterium* L. A. Rich. (*E.elaterium*) bitkisi tıbbi açıdan büyük bir öneme sahiptir (Yeşilada vd., 1989; Sayed vd., 2012; Bohlooli vd., 2012; Imen vd., 2015).

2.3. *Ecballium elaterium* L. A. Rich.

Ecballium elaterium L. A. Rich. (*E.elaterium*) Cucurbitaceae (kabakgiller) familyasına aittir. Kabakgiller botanik sınıflandırmada Dicotyledoneae sınıfı, Cucurbitales takımı, Cucurbitaceae familyası içerisinde bulunmaktadır. Bu familya içerisinde yer alan türler Cucurbitler olarak ifade edilmektedir. Cucurbitaceae familyasında yapılan taksonomik sınıflandırmada 119 cins ve 825 tür bulunmakla birlikte Fevileae, Melothrieae, Cucurbitaceae, Sicyoideae ve Cyclanthereae olmak üzere 5 alt familyaya ayrılmaktadır (Bisognin vd., 2002).



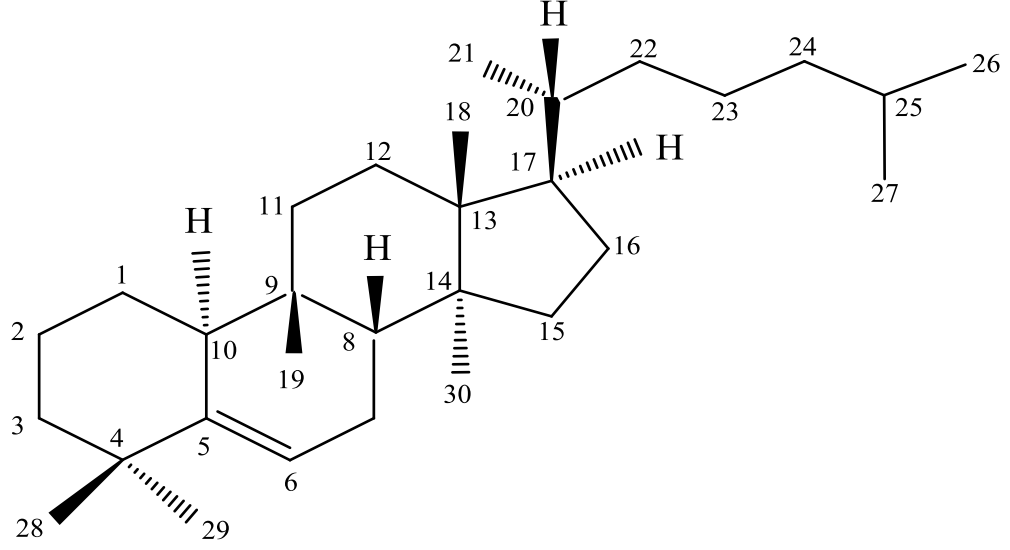
Şekil 2.5. *E.elaterium*'un meyve ve çiçek görüntüsü

E.elaterium; çok yıllık otsu bir bitki olup, gövde ve yaprakları sert tüylerle örtülü ve çiçekleri açık sarı renklidir. Yaprakları üçgen kalp şeklinde ve kenarları dişlidir. Kökleri 30-40 cm olup, gövdesi ise 1-2 m'ye kadar uzanır. Meyveler; oval, saplı ve olgunlukta aşağı sarkık duruşlu ve içerisinde sümüksü bir sıvı vardır. Tohumları ise siyaha çalan koyu kahve renklidir. Meyve olgunlaştıkça içinde büyük bir basınç toplanır ve sonra patlayarak tohumlarını 4-6 m uzağa fırlatır. Tohumlarını şiddetli fırlatması nedeniyle, bu bitkiye, halk arasında cırtatan, cırtlatan, cırtlağan, ciritatan ayrıca eşek hıyarı, acı dülek, acı kavun gibi çeşitli isimler verilmiştir (Baytop, 1984).

2.3.1. *Ecballium elaterium* L. bileşimi

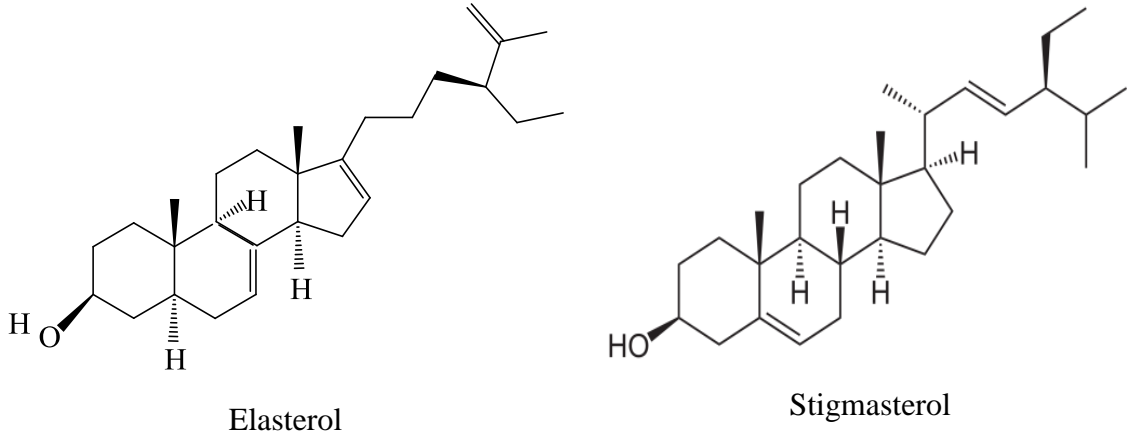
E.elaterium'un en etkin bileşeni, triterpenik bir grup olan kukurbitasinlerdir. Kukurbitasinlerden başka bileşeninde steroller, fenolik bileşikler, amino asitler ve yağ asitleri bulunmaktadır.

E.elaterium'dan ilk izole edilen Kukurbitasin 1831 de Morris ve Hennel'in izole ettiği α -Elaterin (Kukurbitasin E) dir. 1909'da Power ve Moor, bitkiden yeni bir Kukurbitasin izole etmişler ve buna β -Elaterin (Kukurbitasin B) adını vermişlerdir. Günümüze dek bitkiden Kukurbitasin D, I, R, L, H, G diye isimlendirilen bir dizi Kukurbitasin ve bunların türevleri elde edilmiştir. Kukurbitasinlerin genel formülü Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Atasü ve Cihangir, 1985).



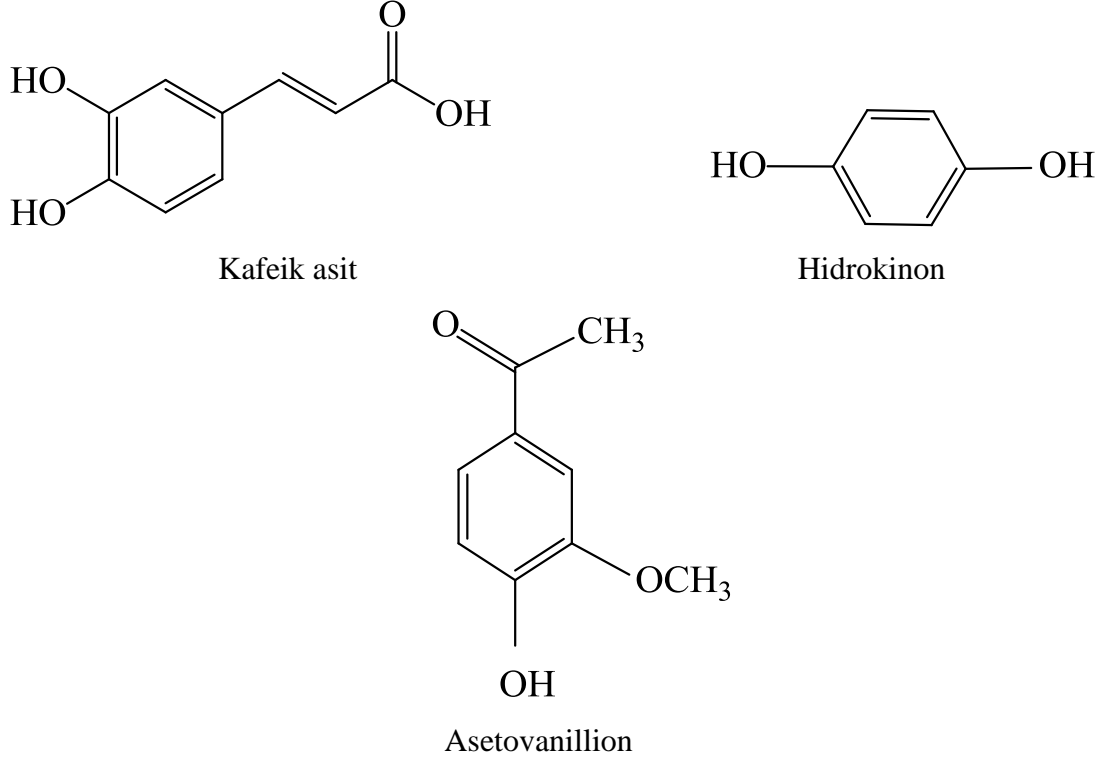
Şekil 2.6. Kukurbitasinlerin genel formülü

Bitkide ana sterolin elasterol olduğu önceki çalışmalarda görülmektedir. Bunun yanında stigmasterolün ve sigloökalenolunda bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 2.7). Steroller, bitkide kökte sentezlenip, yaprakta depolanmaktadır. Bitkide sterol içeriği olgun yaprakta genç yaprağa göre daha fazladır (Memişoğlu, 2005).



Şekil 2.7. *E.elaterium*'dan izole edilen stereoller

E.elaterium'da kafeik asit, hidrokinoon, asetovanillion (Şekil 2.8) gibi fenolik bileşikler eser miktarda bulunmaktadır (Memişoğlu, 2005).



Şekil 2.8. *E.elaterium*'dan izole edilen fenolik bileşikler

Bitkinin tohumlarında m-karboksifenilalanin ve β -pirazolilalanin ve köklerinde allantoin az miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu aminoasitlerin dışında bitkide aspartik asit, glutamik asit, serin, glisin, alanin, lizin, arjinin, trozin gibi çeşitli aminoasitlerin de varlığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda *E.elaterium*'un kök, yaprak ve meyvesinde miristik, laurik, palmitik, linoleik ve linolenik yağ asitlerinin bulunduğu da tespit edilmiştir (Memişoğlu, 2005).

2.3.2. *Ecballium elaterium* L. A. Rich biyolojik ve farmakolojik özellikleri

E.elaterium'un meyve ve kökleri, eski yüzyıllardan beri tanınan ve yaygın kullanımı olan bir drog olarak bilinir. Bitkinin idrar artırıcı ve müshil etkisi bulunmaktadır. Köklerinden elde edilen lapa ve merhemler, haricen tümörlere, egzama gibi kronik cilt yarıklarına ve romatizma ağrılarına karşı kullanılmaktadır. Meyvelerinin sıkılması ile hazırlanan usarenin, buruna çekilmesiyle, sinüzite karşı kullanımı yaygındır (Baytop, 1984; Ekici vd., 1998). Kukurbitasin içeren bazı bitki türleri, geleneksel tıpta farklı patolojilerde antiinflamatuvar olarak kullanılmaktadır. Yeşilada ve arkadaşları,

E.elaterium meyve suyunun antiinflamatuvar etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Yeşilada vd., 1989).

Sayed ve arkadaşları, *E.elaterium*'un etanolik ekstraktından elde ettikleri etil asetat fraksiyonunu, insan hepatokarsinoma hücrelerine (HepG2) karşı sitotoksik etkisini MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi ile ölçmüşlerdir. IC₅₀ değerini 19,12 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu hücrelerin çoğalmalarını yüksek oranda inhibe ettiklerini göstermişlerdir (Sayed vd., 2012).

Bohlooli ve arkadaşları, gastrik adenokarsinoma (AGS) ve yemek borusu (KYSE30) kanser hücrelerini, *E.elaterium* meyvelerinin soğukta dondurulmuş ekstraktları ile 24, 48 ve 72 saat süreyle tedavi etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, *E.elaterium* ekstraktlarının apoptozis yoluyla sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Bohlooli vd., 2012).

Imen ve arkadaşları, Tunusta yetişen, *E.elaterium* meyvelerinin çekirdek yağını Soxhlette hegzanla 80 °C'de ekstrakte etmişlerdir. Elde edilen yağı kullanarak insan kolon kanser hücreleri (HT29) (IC₅₀ 4,86 µg/mL) ve adenosarkoma (HT1080) (IC₅₀ 4,16 µg/mL) hücreleri üzerine antiproliferatif etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Imen vd., 2015).

Bitkinin antitümör aktivite yönünden incelenmesi bitkiye önem kazandırmış ve bitkinin güçlü bir antitümör ajan olduğu saptanmıştır. Bu antitümör etkinin, bitkinin içeriğinde bulunan kukurbitasinlerden kaynaklandığı literatürde geniş ölçüde yer almaktadır (Lee vd., 2010; Clericuzio vd., 2004; Liu vd., 2008; Wakimoto vd., 2008).

2.3.3. Kukurbitasinler

Kukurbitasinler bir 19(10→9β)-abeo-10α-lanost-5en iskeleti son derece oksijenlenmiş C30 triterpenoitlerin bir grubudur. Tüm kukurbitasin türleri, bir 5(6)-çift bağa da sahiptirler. Tam olarak steroidal olmayıp, bir metil grubu, C-10'dan ziyade C-9'da yerleşiktir. A'dan T'ye olmak üzere 17 ana molekül vardır ve bunlardan elde edilen yüzlerce türevler bulunmaktadır. Bunların arasından B, D, E, I, F, O, P ve Q türevleri güçlü kanser karşıtı aktivitelerinden dolayı geniş bir şekilde araştırılmıştır (Dinan vd., 1997).

Kukurbitasinleri kapsayan bazı türler çeşitli patolojilerde antiinflamatuvar olarak geleneksel tıpta kullanılmıştır. Hem kukurbitasin içeren ekstraktlar hem de izole edilmiş bileşiklerin kendileri analjezik etkili maddeler olarak rapor edilmiştir. Kukurbitasin araştırmasındaki en önemli önceliklerden biri bu bileşiklerin sitotoksik ve antikanser etkilerinin bulunması olmuştur (Almeida, 1992).

Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Kukurbitasin B'nin hücre döngüsü inhibisyonu ve siklin B1 downregülasyonu ile akciğer kanseri hücrelerini inhibe ettiği ve kemoterapi ile tedavisinde faydalı bir ajan olarak kullanılabilceğini önermişlerdir (Zhang vd., 2014). Gao ve arkadaşları ise Kukurbitasin B üzerine yaptıkları çalışmada, molekülün prostat kanseri için olası bir kimyasal koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Gao vd., 2014). Ma ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise, Kukurbitasin B molekülünün hipoksi ile uyarılan HIF-1 aktivasyonuna karşı güçlü bir inhibitör aktivitesine sahip olduğunu ve kanser mekanizmasında etkili olabileceğini rapor etmişlerdir (Ma vd., 2014).

Kim ve arkadaşları, *Trichosanthes kirilowii* bitkisinden izole ettikleri Kukurbitasin D molekülünün meme kanseri hücrelerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak bu molekülünün STAT3 aktivitesini azaltarak hücre profilasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Kim vd., 2013).

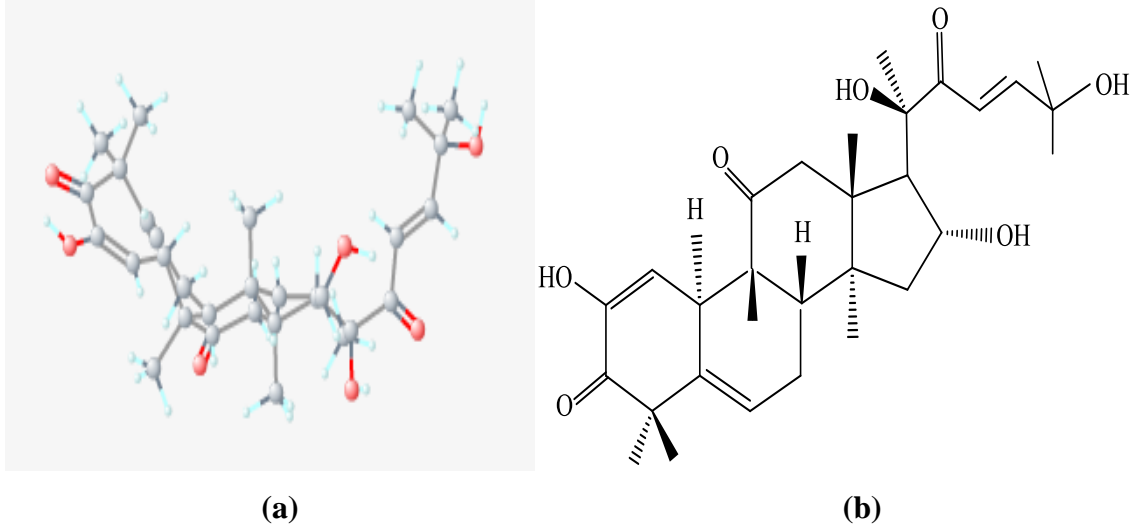
Kong ve arkadaşları ise, Kukurbitasin E'nin meme kanseri üzerine etkisini inceledikleri çalışma sonucunda Kukurbitasin E, apoptoz ve hücre döngüsünün G2/M fazındaki bloklamayı kapsayarak üçlü negatif meme kanseri büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini vurgulamışlardır. Böylece Kukurbitasin E, yeni TNBC (Triple negatif meme kanseri) teropötikleri geliştirilmesi için uygulanabilir bir birleşim olarak görülmüştür (Kong vd., 2014). Ayrıca Feng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Kukurbitasin E molekülünün A549, Hep3B ve SW480 kanser hücrelerinde hücre döngüsü regülatörlerinin ekspresyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Feng vd., 2014).

Kukurbitasinlerin kanser hücrelerinin çoğalmaları ve yaşamaları için oldukça önemli olduğu bilinen JAK-STAT ve MAPKinaz yolağını inhibe ettiklerini belirtilmiştir. (Alghasham, 2013). Sitokin dönüştürücü sinyallerin en iyi bilinen şekli bir enzim olan janus kinazlar (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleridir. JAK aktivasyonunu takiben

STAT fosforilasyonu ve aktivasyonu sonucu, STAT'lar reseptörden ayrılıp nükleusa göç ederek hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. JAK ailesi, JAK-STAT yoluyla, sitokin aracılı sinyallerin dönüşümünü sağlayan bir grup tirozin kinaza verilen isimdir. Bu yolaktaki transkripsiyon faktörleri ise STAT'lar olarak bilinir. STAT aktivasyonu karsinogenez ile ilişkilidir. Örneğin STAT1, STAT3 ve STAT5 ekspresyonu kanserin neredeyse her tipinde belirlenmiştir. JAK-STAT sinyal ileti yoluyla, sitokinlere ve büyüme faktörlerine hücresel yanıtın düzenlenmesinde görev alarak, gen ifadenmesini düzenler. Programlanmış hücre ölümü (apoptozis), genetik olarak düzenlenen ve embriyonik gelişimde, normal hücre homeostazının sağlanmasında ve kendiliğinden ya da ilaçla uyarılmış tümör hücrelerinin ölümünden sorumlu bir mekanizmadır. STAT3 transkripsiyon faktörleri, apoptozisin düzenlenmesinde etkin rol oynayan Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 gibi antiapoptotik ve cyclin D1, c-Myc ve p21 gibi proliferasyonunda görevli genlerin ifadenmesini uyarır. Kukurbitasin I (Elaterisin B), JAK2/STAT3 sinyal yolunun seçici kuvvetli bir inhibitörüdür. Kukurbitasin I'in akciğer kanseri, göğüs kanseri, anaplastik lenfoma gibi bazı insan kanser hücre hatlarında, JAK2 ve STAT3 fosforilasyonunu baskılayarak apoptozisi uyardığı ve hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Blaskovich vd., 2003; Schindler vd., 1995, Eyol vd., 2014).

2.3.3.1. Kukurbitasin I

Kukurbitasin I, birkaç bitki türünden izole edilmiş, toksik, doğal olarak oluşan bir tetrasiklik triterpenoid bileşiktir (Chen, 2005). Kukurbitasin I, DMSO ve etanol gibi organik çözücülerde yaklaşık olarak sırasıyla 5 ve 10 mg/mL çözünürlüğe sahiptir. Sulu çözeltilerde eser miktarda çözünür (www.tocris.com, 2015). Kukurbitasin I'ya Elaterisin B, Cucurbitacine (I), 1,2-Dehidroelaterisin A, JSI 124 diye de adlandırılmaktadır. Kukurbitasin I'nın molekül ağırlığı 514,65028 g/mol ve molekül formülü $C_{30}H_{42}O_7$ 'dir.



Şekil 2.9.a. Kukurbitasin I'nın üç boyutlu görüntüsü **b.** Kukurbitasin I'nın iki boyutlu görüntüsü

Kukurbitasin I, JAK/STAT-3 yolağını inhibe ederek hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-proliferatif ve anti-tümör aktivite göstermektedir (Ishdorj vd., 2011). Örneğin farelerde STAT-3'ün ekspresyonunu azaltarak, tümör ilişkili B hücrelerini baskılayıp meme kanseri gelişimini inhibe ettiği (Ren vd., 2014); fare 3T3-L1 and C3H10T1/2 adiposit hücrelerinde adiposit farklılaşmasını inhibe ettiği (Cho-Rong vd., 2014); bortezomib ile kombine tedavide STAT3 ekspresyonunu azaltıp, ısı-şok proteini (HSP-90) ekspresyonunu artırarak dentritik hücrelerin fonksiyonunu düzelttiği (Jung vd., 2014); küçük hücreleri olmayan akciğer kanserinde (NSCLC), yine STAT3'ün ekspresyonunu baskılayarak kemoradyoterapi cevabını arttırdığı (Hsu vd., 2011); glioblastomalı hastaların hücrelerinde da apoptozu ve otofajiyi aktive ettiği (Guang vd., 2014), B lösemi hücre hatlarında (BJAB, I-83 ve NALM-6) hücreleri apoptoza duyarlı hale getirdiği (Ishdorj vd., 2010), ATC-CD133⁺ hücrelerinin Kukurbitasin I ile tedavisi sonrasında radyasyon ve kemoterapatik ilaçlara karşı duyarlılığının arttığı bildirilmiştir (Tseng vd., 2012).

Jayaprakasam ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, *Cucurbitacea andreana*'dan izole ettikleri Kukurbitasin B, D, E ve I'nın antikanser ve antiinflamatuvar özelliklerini incelemişlerdir. Kukurbitasin I'nın kolon (HCT-116) ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde sırasıyla 0,4 μM 'da %65 ve %12 inhibitör etki gösterirken, akciğer kanser hücresinde (NCI-H460) 0,1 μM 'da %2 ve sinir sistemi kanser hücresinde

(SF-268) 0,05 μM 'da %4 inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca Kukurbitasin I, 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de COX-2 enzimini %27 oranında etki ederken, COX-1 enzimine herhangi bir inhibitör etki yapmadığını belirtilmiştir (Jayaprakasam vd., 2003).

Knecht ve arkadaşları fare melanoma hücresinde (B16-F1) yaptıkları çalışmada, Kukurbitasin I'nın cofilin ve gelsolin proteinlerinin kimyasal yapılarında modifikasyonlara sebep olarak aktin filamentlerin depolimerizasyonunun başlamasını geciktirdiğini bildirmişlerdir (Knecht vd., 2010).

Kim ve Kim yaptıkları çalışmada, Kukurbitasin I'nın, insan umbilikal venindeki endotelial hücresinde (HUVEC), antianjiyogenik aktivitesini ölçmüş ve Kukurbitasin I'nın HUVEC'de; endotelial hücre fonksiyonunda ve anjiyogeneziste önemli rol oynayan VEGF-2 (vasküler endotelial büyüme faktörü 2) ve FGFR-1'i (fibroblast büyüme faktörü 1) inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Kim and Kim, 2015).

Jin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Kukurbitasin I'nın SW480 kolon kanser hücresinde, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklus proteinlerinden siklin-B1, siklin-A, CDK1 and CDC25C proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak hücre siklusunu G2/M fazında tutukladığını bildirmişlerdir. Ayrıca in vivo olarak BALB-c farelerde CT-26 kolon karsinoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır (Jin vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Kimyasallar	Üretici
RPMI 1640 Besiyeri	Lonza, İsviçre
FBS (Fetal Bovin Serum)	Biowest, Fransa
L- Glutamin	Lonza, İsviçre
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Almanya
PBS(Fosfat tamponlu salin)	Sigma, Almanya
DMSO (Dimetilsulfoksit)	Carl Roth, Almanya
İzopropanol	Fluka, İsviçre
Etanol	Honeywell, Almanya
Metanol	Riedel-de-Haën, Almanya
Kloroform	Carlo Erba, İtalya
Asetonitril	Sigma, Almanya
MTT (3-(4,5-Dimetil -2 thiazolil) - 2,5 -difenil- 2H-tetrazolyum bromid)	Serva, Almanya
HCl	Fluka, İsviçre
Asetik Asit	J.T.Baker, Almanya
Sodyum Hidroksil	Pharmazia, Almanya
Kukurbitasin I	Merck, Almanya
Kristal viyole	Merck, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Üretici Firmaları

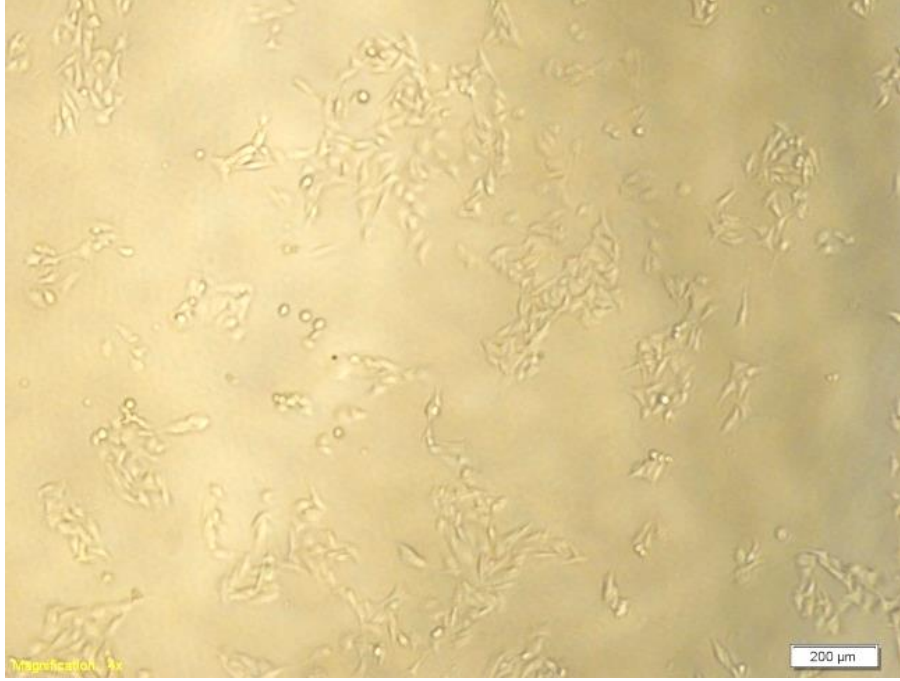
Tablo 3.2. Kullanılan cihazlar ve üretici firmaları

Cihazlar	Üretici
Işık mikroskobu	Olympus DP72, Japonya
UV Kabin	Muttenz, İsviçre
İnkübatör	Heracell 150i, ABD
Liyofilizatör	Christ Alpha, İngiltere
Mikroskop	Leica, Almanya
Laminar	BioGARD Hood Sanford, ABD
Derin Dondurucu	Heraeus, Almanya
Buz Dolabı	Liebherr, Almanya
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Almanya
Otoklav	Euroklav, Almanya
Su Banyosu	Julabo, Almanya
Filtreli Enjektör Ucu 22G	B.Braun, Almanya
Neubauer Hücre Sayım Lamı	Superior, Almanya
Pipet Ucu	Greiner, Almanya
Petri	Greiner, Almanya
Hücre Kültür Şişesi (25cm ² -75cm ²)	TPP, İsviçre
Santrifüj Tüpleri (0,5mL-50 mL)	Greiner, Almanya
5 um UniverSil C18 i.d. analitik kolon	Düren, Almanya
LC1220 (HPLC),	Deka, Japonya
96, 24 ,6'lık WellPlatte	Greiner, Almanya
Mikroplate Reader	Biotek, ABD
Hassas terazi	APX-200, ABD
Spin vorteks	Heidolph, Almanya
0,45 µm filtre	Whatman, ABD
Hemositometre	Marienfeld, Almanya

3.3. Kullanılan Hücreler ve Özellikleri

3.3.1. MCF-7 hücre hattı ve özellikleri

MCF-7, 1970’de meme kanseri olan 69 yaşında Kafkas bir kadından elde edilmiş ve Michigan Cancer Foundation-7 kısaltması olan (MCF-7) olarak isimlendirilmiştir. MCF-7 hücre hattı insan meme dokusundan ve metastatik bölgelerden elde edilir. Hücre çeşidi olarak sadece epitel hücreleri içerir (Anait ve Craig; 1997). Bu hücre hattı transfeksiyon için uyumludur. Sıvı azotta veya -80 °C’de dondurulmuş olarak saklanır. Hücre kültürü şartları %5 CO₂ ve 37 °C olarak belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarımızda kullandığımız MCF-7 hücre hattı Alman Kanser Araştırma Merkezi Toksikoloji ve Kemoterapi Bölümünden Prof.Dr. Martin Berger tarafından hediye edildi. MCF-7 hücrelerinin görüntüsü Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. MCF-7 hücrelerinin görüntüsü (4x büyütme)

MCF-7 hücre hattının özellikleri temel olarak Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. MCF-7 hücre hattının özellikleri

Kaynak	İnsan
Doku	Meme
Morfoloji	Epitel hücre
Yapışma özelliği	Evet
Antibiyotik	Yok
Büyüme sıcaklığı	37 °C
Östrojen reseptörü	Pozitif
Karbondiyoksit konsantrasyonu	% 5
Pasaj metodu	% 0,25 tripsin
Ayırım oranı	1:8
Ömür	Sonsuz

3.3.2. MDA-MB-231 hücre hattı ve özellikleri

MDA-MB-231, 1973'de meme kanseri olan 51 yaşında Kafkas bir kadından M.D. Anderson Kanser Merkezi'nde elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı insan meme dokusundan ve metastatik bölgelerden elde edilir. Hücre çeşidi olarak sadece epitel hücreleri içerir. Bu hücre hattı transfeksiyon için uyumludur. Sıvı azotta veya -80 °C'de dondurulmuş olarak saklanır. Hücre kültürü şartları %5 CO₂ ve 37 °C olarak belirlenmiştir (cellbiolabs.com; 2015). Hücre kültürü çalışmalarımızda kullandığımız MDA-MB-231 hücre hattı Alman Kanser Araştırma Merkezi Toksikoloji ve Kemoterapi Bölümünden Prof.Dr. Martin Berger tarafından hediye edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin görüntüsü aşağıda Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinin görüntüsü (4x büyütme)

MDA-MB-231 hücre hattının özellikleri temel olarak Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. MDA-MB-231 hücre hattı ve özellikleri

Kaynak	İnsan
Doku	Meme
Morfoloji	Epitel hücre
Yapışma özelliği	Evet
Antibiyotik	Yok
Büyüme sıcaklığı	37 °C
Östrojen reseptörü	Negatif
Karbondioksit konsantrasyonu	% 5
Pasaj metodu	% 0,25 tripsin
Ayrım oranı	1:8
Ömür	Sonsuz

3.4. Hücre Kültürü

Bütün hücreler %5'lik CO₂ ve 37 °C'de standart şartlarda kültür edildi. Hücre vasatı olarak tüm hücreler için RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Bütün hücreler -80 °C'de muhafaza edildi. Hücreler kullanılmak istendiğinde 37 °C çözdürülüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan hücre peleti taze hücre vasatına alınarak inkübatöre bırakıldı.

3.4.1. Hücre kültüründe kullanılan besiyerinin hazırlanışı

500 mL RPMI-1640 besiyerinin içerisine aşağıdaki bileşenler eklenerek kullanıldı. Besiyeri +4 °C'de muhafaza edildi.

- %10 FBS
- %1 penisilin/streptomisin
- %1 L-Glutamin

3.4.2. Stok hücrelerin ekimi

1. Kabin ve kullanılacak pipetler, çalışma öncesinde %70'lik etanol ile temizlendi.
2. Stok hücreler alınarak 37 °C'deki su banyosunda 2 dakika bekletildi.
3. 5 mL besiyeri konan falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler aktarıldı.
4. 25 °C'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıp, süpernatant atıldı.
5. Hücrelerin üzerine 5 mL besiyeri konulup pipetaj yapılarak hücreler çözüldü.
6. 10 mL RPMI-1640 besiyeri flasklara bırakılarak pipetaj işlemi uygulandı.
7. Pipetaj işleminin ardından çözülen hücrelerin ekimi yapıldı.
8. Flasktaki hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra flask inkübatöre (37 °C) konuldu.
9. Her çalışmanın sonunda 30 dakika kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi.

3.4.3. Besiyeri değişimi

- 1- Besiyeri, 37 °C'ye gelene kadar su banyosunda bekletildi.
- 2- Flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı.
- 3- 5 mL besiyeri eklenip, %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.4.4. Hücrelerin pasajlanması

- 1- Hücreler buldukları flasklarda yeterli doluluğa ulaştığı zamanlarda pasajlama işlemi yapıldı.
- 2- RPMI-1640, 1X PBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37 °C'ye ısıtıldı.
- 3- Flask dik konuma getirilip hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden besiyeri çekildi.
- 4- Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine 1X PBS (5 mL) ilave edilip, yüzey yıkanıp PBS çekildi.
- 5- 3 mL Tripsin-EDTA eklenip, flask 3-5 dakika CO₂ inkübatöründe tutulup hücrelerin kalkması sağlandı.
- 6- Mikroskopta hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 7- 5 mL besiyeri eklenip pipetaj yapılarak 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı.
- 8- 10 µL alınıp hemositometre ile hücre sayımı yapıldı.
- 9- 25 °C'de 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 10- Süpernatant atılıp pelet temiz besiyeri içinde homojen olana kadar çözdürüldü.
- 11- Deney kabına ekim işlemi yapıldı.
- 12- %5 CO₂ içeren inkübatöre (37 °C) bırakıldı.

3.4.5. Tümör Hücrelerinin Dondurulması

Yukarıda hücre pasajında belirtilen işlemler hücre peleti elde edilinceye kadar aynı şekilde yürütüldü. Bu hücre peleti hazırlanan özel bir besiyeri içine (%70 RPMI-1640 Besiyeri, %20 FBS ve %10 DMSO) alındı. 1 mL hücre süspansiyonu içinde $1,5 \times 10^6$ hücre gelecek şekilde hesaplandı. Önce -80 °C soğutulmuş daha sonrada sıvı azot içine (-196 °C) bırakılarak muhafazası sağlandı.

3.5. Kukurbitasin I Temini ve Muhafazası

Kukurbitasin I AppliChem firmasından temin edilip toz halinde +4 °C'de muhafaza edildi. Etanolde çözüldürüldükten sonra -20 °C'de saklandı.

3.6. *Ecballium elaterium*'un Meyve Suyu ve Kloroform Ekstraktının Hazırlanması

E.elaterium bitkisinin olgun meyveleri Adana'da toplandı. Toplanan bitkinin tayini İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Turan ARABACI tarafından yapıldı. Meyveler ışık almayan ve klimalı bir odada +18 °C'de 48 saat süreyle bekletildi. Bu süre içerisinde meyveler kendiliğinden meyve sularını dışarıya verdi. Yaklaşık olarak 3 L meyve suyu elde edildi. Meyve suları yaklaşık olarak ikiye bölündü. Birinci kısım, liyofilize edilip kuru halde meyve suyu elde edildi.

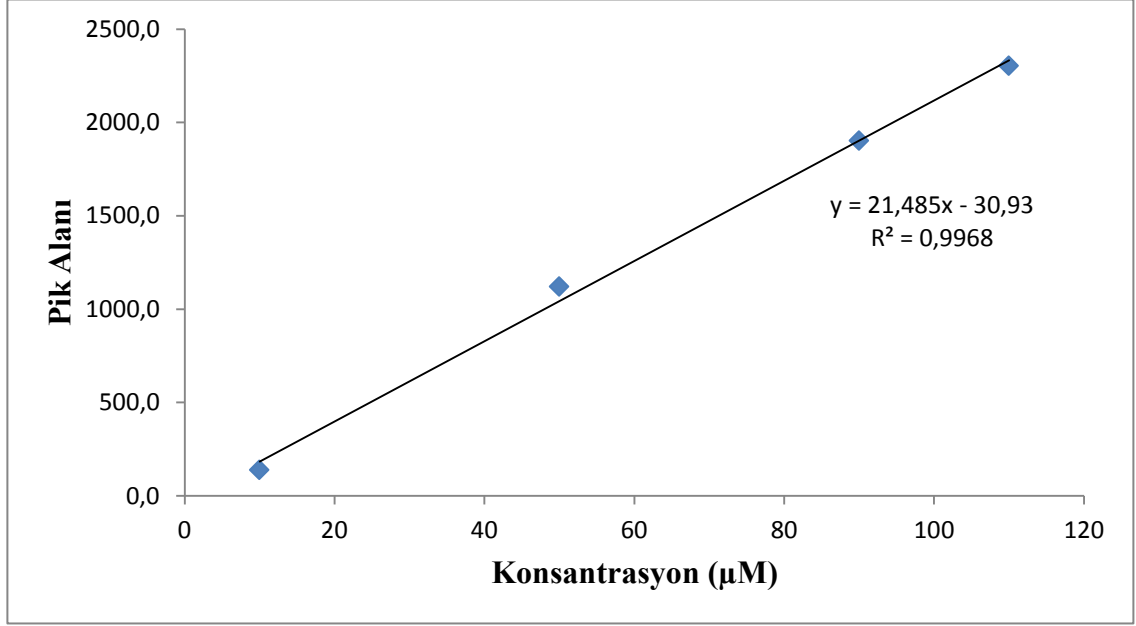
Kloroform ekstraktının hazırlanması; ikinci kısımdan 25 mL meyve suyu alınıp, polar olmayan organik çözücü hekzan ile ekstrakte edildi. Organik faz uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan sulu faz, kloroform ile ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi, meyve suyu:kloroform 1:1 oranında her biri 3 saat süreyle ardışık üç kez yapıldı. Elde edilen kloroform ekstraktları birleştirilip toplam 75 mL ekstrakt elde edildi. Ekstrakt, 250 mL'lik cam balon içinde vakum altında 40 °C'de 3 mL kalıncaya kadar evapore edildi. 3 mL'lik örnek daha sonra liyofilize edilerek katı halde ekstrakt elde edildi. Daha sonra yeterli miktarda kuru madde (kloroform ekstraktı) elde edebilmek için yukarıda yapılan işlemler tekrarlandı.

Meyve suyu ve kloroform ekstraktı liyofilizatörde 0,20 mbar basınçta -86 °C'de dondurularak kurutuldu. 50 g meyve suyu ve 3,6 g kloroform ekstraktının kuru maddeleri elde edildi. Liyofilize edilen meyve suyu ve kloroform ekstraktı deneysel çalışmalarda kullanılabilecek kadar -18 °C'de saklandı.

3.7. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Numunelerinin Hazırlanması

10 mg liyofilize meyve suyu, 10 mg liyofilize kloroform ekstraktı 1 mL etanolde çözülerek HPLC cihazında analize verildi. 110, 90, 50 ve 10 µM Kukurbitasin I

standartları HPLC saflıkta etanolde çözülerek hazırlandı. Stardart çözeltilerle oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.3’de aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kukurbitasin I Kalibrasyon Grafiği

3.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

E.elaterium meyve suyu ve kloroform ekstraktının Kukurbitasin I içerip içermediği 1220LC (Liquid Chromatography) cihazı ile analiz edildi. MN (Düren, Almanya) marka Nucleosil 100-5 C18 (5µm) 250x4.6 mm i.d. analitik kolon kullanıldı. Mobil faz A; Asetonitril ve Mobil faz B; %1’lik asetik asit yürütücü fazları kullanılarak gradiyent analiz (başlangıçta % 20 B, 30. dakikada % 55 B ve 50. dakikada tamamlandı) yapıldı. Akış hızı 1 mL/dk, dedeksiyon 229 nm dalga boyunda yapıldı.

3.9. MTT Testi

MTT testi, tedaviden sonra yaşayabilen hücrelerin sayısının fotometrik olarak belirlenmesini sağlamaktadır. MTT testi, canlı hücrelerin (3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) boyası ile boyanması esasına dayanmaktadır. Bu boya hücreler tarafından alınarak formazan kristallerine metabolize edilip, mor renkli kristaller oluşmaktadır. Bu testle MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin *in vitro* proliferasyon yetenekleri belirlendi.

Yapılan ön çalışmalarda; hücre sayısı her iki hücre hattı için de 4000 olarak optimize edildi ve etil alkolün hücreler üzerine etkisini belirlemek için çeşitli etil alkol konsantrasyonları hazırlanarak hücre hatlarına uygulandı. %2,5 etil alkol konsantrasyonuna kadar kontrole göre absorbanslarda herhangi bir değişim olmadı. Hazırlanan Kukurbitasin I konsantrasyonlarında %0,5'in altında kullanılan etil alkol, sitotoksik etki göstermediğinden kontrol olarak sadece besiyeri kullanıldı.

24, 48 ve 72 saatler her iki hücre hattı için de hücre yaşam süresi olarak belirlendi. Kukurbitasin I için kontrol, 0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM; *E.elaterium*'un meyve suyu için kontrol, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL; *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı için kontrol; 0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL konsantrasyon hazırlandı. Hücre ekiminin ardından ilk 24 saatten sonra 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna 10 µl steril MTT çözeltisi eklendi ve inkübatörde 4 saat bekletildi. Bütün kuyucuklardaki besiyeri vasatı uzaklaştırıp her bir kuyucuğa 100 µl 0,04 N HCl içeren izopropanol eklendi. Kuyucuklardaki çözelti çekilip bırakılarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Absorbanslar, mikroplate reader'da 570 nm'de ölçüldü. Aynı işlemler 48 ve 72 saat sonra da tekrarlandı.

Kontrol kuyucuklarının absorbans değerleri %100 canlı kabul edildi ve numunelerin % canlılık sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılması ile belirlendi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Antiproliferatif etki (tedavi edilenx100/Kontrol) eşitliği ile belirlendi. Test Eyol tarafından bildirilen protokole uygun olarak yapıldı (Eyol, 2012).

3.10. Wound Healing Testi

Hücre göçünün (migrasyon) ve etkileşiminin analiz edildiği bir testtir. MCF-7 hücre hattı için hücre ekimi sayısı 24 kuyucuklu platelere 0,5 mL içinde 40000, MDA-MB-231 hücre hattı için ise 30000 olacak şekilde ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra, pipet ucu ile kuyucuğun ortasına düz ve eşit olacak şekilde çizgi çizildi. Ardından kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak yeni besiyeri ile birkaç kez yıkandı. Belirlenen konsantrasyonlarda (Kukurbitasin I için kontrol, 0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM; *E.elaterium*'un meyve suyu için kontrol, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL; *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı için kontrol, 0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL,

0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) 500 µL eklendi ve 0., 12., 24. ve 36. saatlerde görüntüleri alınıp imageJ 1.48 programı kullanılarak analiz edildi. Test Kaleağasıoğlu ve Berger tarafından bildirilen protokole uygun olarak yapıldı (Kaleağasıoğlu and Berger, 2012).

3.11. Koloni Formasyon Testi

Bu test, bir tek kanser hücresinin koloni oluşturma yeteneğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Hücre ekimi için 6 kuyucuklu platelerin her birine her iki hücre hattı için de 1000 hücre ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra belirlenen konsantrasyonlarda (Kukurbitasin I için kontrol, 0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM; *E.elaterium*'un meyve suyu için kontrol, 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL; *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı için kontrol, 0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) 1 mL eklendi. 5 gün sonra besiyeri vasatı dökülerek ikinci tedavi yapıldı. 10 gün sonra hücreler PBS ile yıkanıp, kristal viyole boyası ile boyanarak 20 dakikadan sonra tekrar yıkama işlemi yapıldı. 6 kuyucuklu platelerin görüntüleri alınarak analiz edildi. Bu test Tekedereli ve arkadaşlarının bildirdiği protokolden bazı değişiklikler yapılarak uygulandı (Tekedereli vd., 2013).

3.12. İstatiksel Analiz

Bütün veriler SPSS 22 programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk ile test edildi ($p>0,05$). Hem MCF-7 hücresi hem de MDA-MB-231 hücresi için veriler; tek yönlü MANOVA ve tekrarlayan ölçümlerde ANOVA test ile değerlendirildi. Mauchly's Sphericity testi 0,05'den düşük bulunduğu, MCF-7 hücresi verileri için Huynh-Feldt düzeltmesi ($\epsilon>0,75$) yapılırken MDA-MB-231 hücresi verileri içinde Greenhouse-Geisser düzeltmesi uygulandı ($\epsilon<0,75$). Grupları arasında fark olduğunda, farkın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için varyansların homojen olup olmamasına göre ikili karşılaştırma (post-hoc) olarak Dunnett testi yapıldı. Herhangi bir zamandaki etken madde veya doz ortalaması açısından gruplar arası farklar tek yönlü ANOVA testi ile belirlenip, p değerleri gösterildi. Farkın hangi etken maddeden veya dozdan kaynaklandığını bulmak için post-hoc Tukey HSD testi yapıldı. p değeri 0,05'den düşük ise anlamlı olarak kabul edildi.

Herhangi bir zaman için bir etken maddenin dozları arasındaki farklar tek yönlü ANOVA ile test edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kanser, hücrelerin aşırı hızlı yayılım göstererek çoğalmasından dolayı tedavisi zor olan bir hastalıktır. Birçok farklı tedavi yöntemleri kullanılarak bu sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Farklı tedavi yöntemlerinin ortak amacı tümörün kontrol altına alınarak büyümenin önlenmesini sağlamaktır. Fakat bu süreç, yan etkiyi de beraberinde getirerek metabolizma düzeninin bozulmasına yol açmaktadır. Bu nedenle antikanser ajanlarının hücresel düzeydeki etkilerinin çok iyi ve kontrollü bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

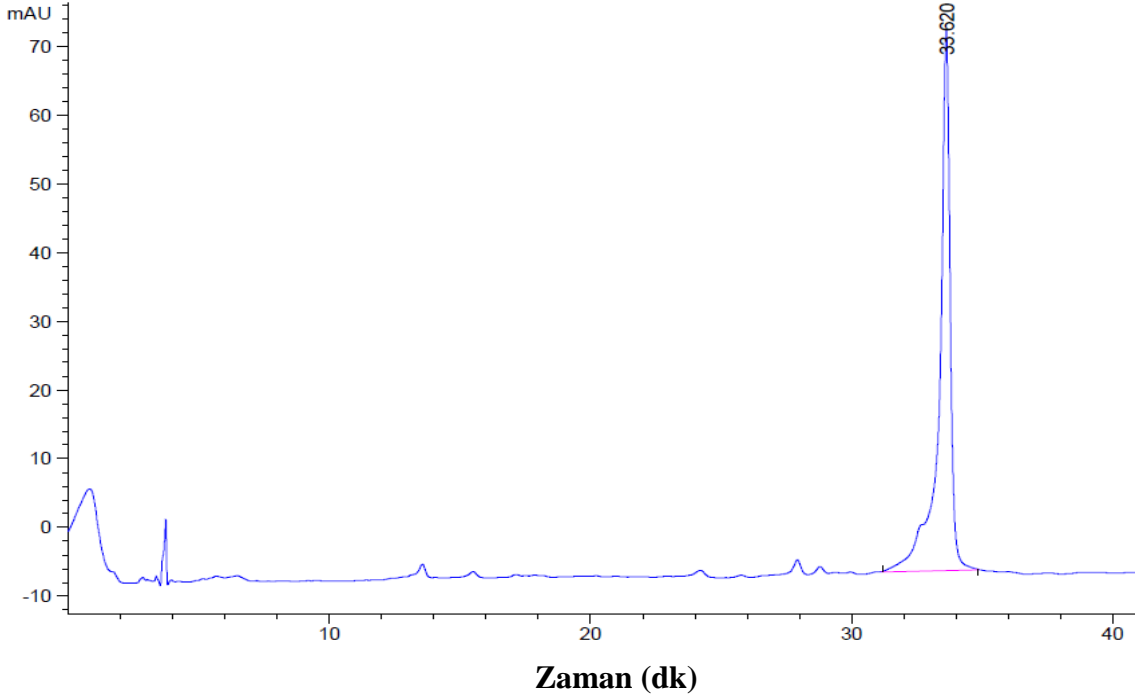
Kanser tedavisinde her ne kadar umut verici gelişmeler olsa da başarı yüzdesinin düşük olması, kanser hastalarını ve araştırmacılarını alternatif yeni yöntemler araştırmaya sevk etmiştir. Bunların başında ise halk tıbbında önemli bir yere sahip olan bitkisel tedavi yöntemleri gelmektedir.

Yüzyıllar öncesinde, halk arasında kullanılmaya başlanan bitkilerden biri olan Cucurbitaceae familyasına ait *E.elaterium*'un antitümör bir ajan olduğu saptanmakla birlikte antiinflamatuvar, sitotoksik, antiproliferatif etkileri gibi birçok tedavi edici özelliği vardır. Bu tedavi edici etkisinin, içeriğinde bulunan tetrasiklik triterpenoid bileşik olan kukurbitasinlerden kaynaklandığı bilinmektedir (Sayed vd., 2012; Bohlooli vd., 2012; Imen vd., 2015).

E.elaterium bitkisinin olgun meyveleri, Ağustos ayı sonu ile Eylül ayı başlarında Adana'da toplandı. Bitkinin olgun meyvelerinden meyve suyu ve kloroform ekstraktı elde edildi. Elde edilen meyve suyu ve kloroform ekstraktının Kukurbitasin I içeriği, HPLC cihazıyla belirlendi. *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine antiproliferatif etkisi, MTT testi ile; hücre göç yeteneği, Wound Healing testiyle ve koloni oluşturma yeteneği ise Koloni Formasyon testi ile analiz edildi. Ayrıca, hücre morfolojilerinde oluşan değişim incelenip, araştırıldı.

4.1. Kukurbitasin I'nın HPLC Analiz Sonuçları

Kukurbitasin I standardının (110 μ M) HPLC kromatogramı Şekil 4.1'de verilmiştir.

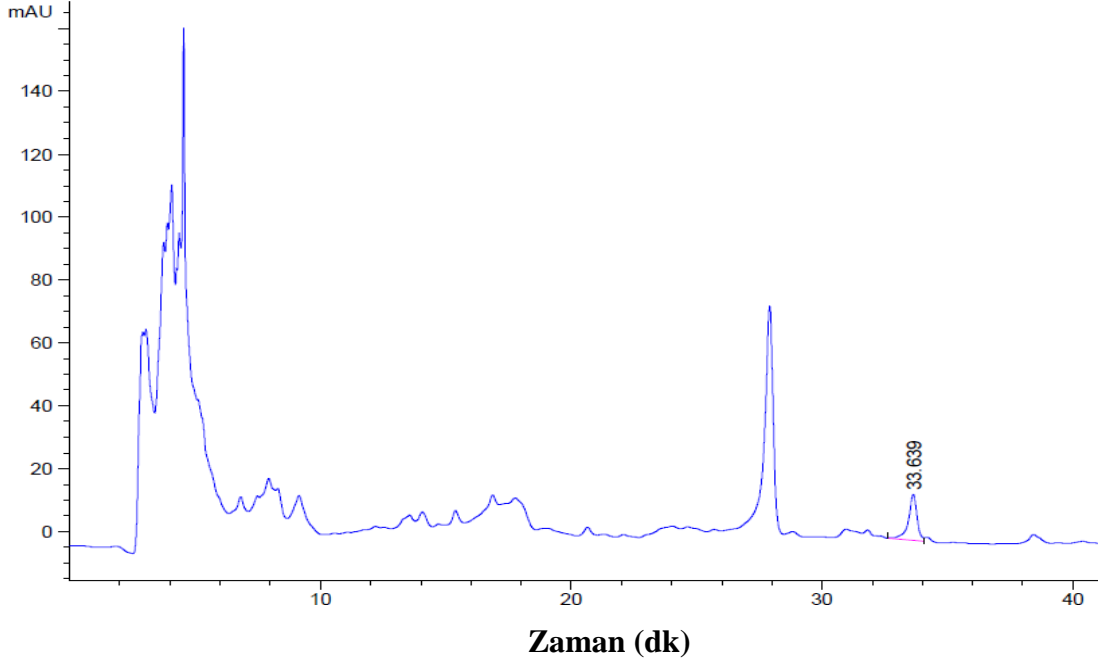


Şekil 4.1. Kukurbitasin I standardına ait HPLC diyagramı

HPLC analizlerinde; deneysel çalışmalardaki kromatografik koşullarda, Kukurbitasin I pikinin alıkonma zamanı 33.62 dakika olarak görüldü.

4.2. *Ecballium elaterium* Meyve Suyunun HPLC Analiz Sonuçları

E.elaterium meyve suyuna ait HPLC kromatogramı Şekil 4.2’de verilmiştir.



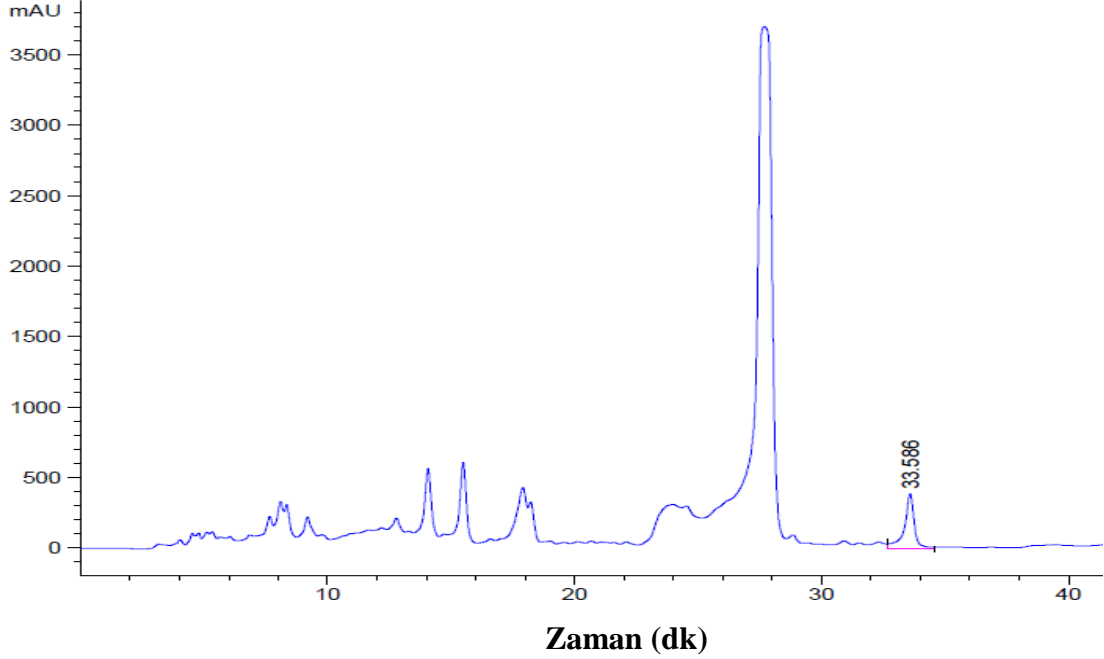
Şekil 4.2. *E.elaterium* meyve suyunun HPLC kromatogramı

E.elaterium'un meyve suyunun HPLC analizinde; deneysel çalışmalardaki kromatografik koşullarda, Kukurbitasin I pikinin alıkonma zamanı 33.639 dakika olarak görüldü.

HPLC analizi sonucu elde edilen Kukurbitasin I'ya ait pik alanı, kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konularak meyve suyu içerisindeki Kukurbitasin I konsantrasyonu 175,7 μ M olarak tespit edildi.

4.3. *Ecballium elaterium* Kloroform Ekstraktının HPLC Analiz Sonuçları

E.elaterium'un kloroform ekstraktına ait HPLC kromatogramı Şekil 4.3'te aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.3. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktına ait HPLC kromatogramı

E.elaterium'un kloroform ekstraktının HPLC analizinde; deneysel çalışmalardaki kromatografik koşullarda Kukurbitasin I pikinin alıkonma zamanı 33.586 dakika olarak görüldü.

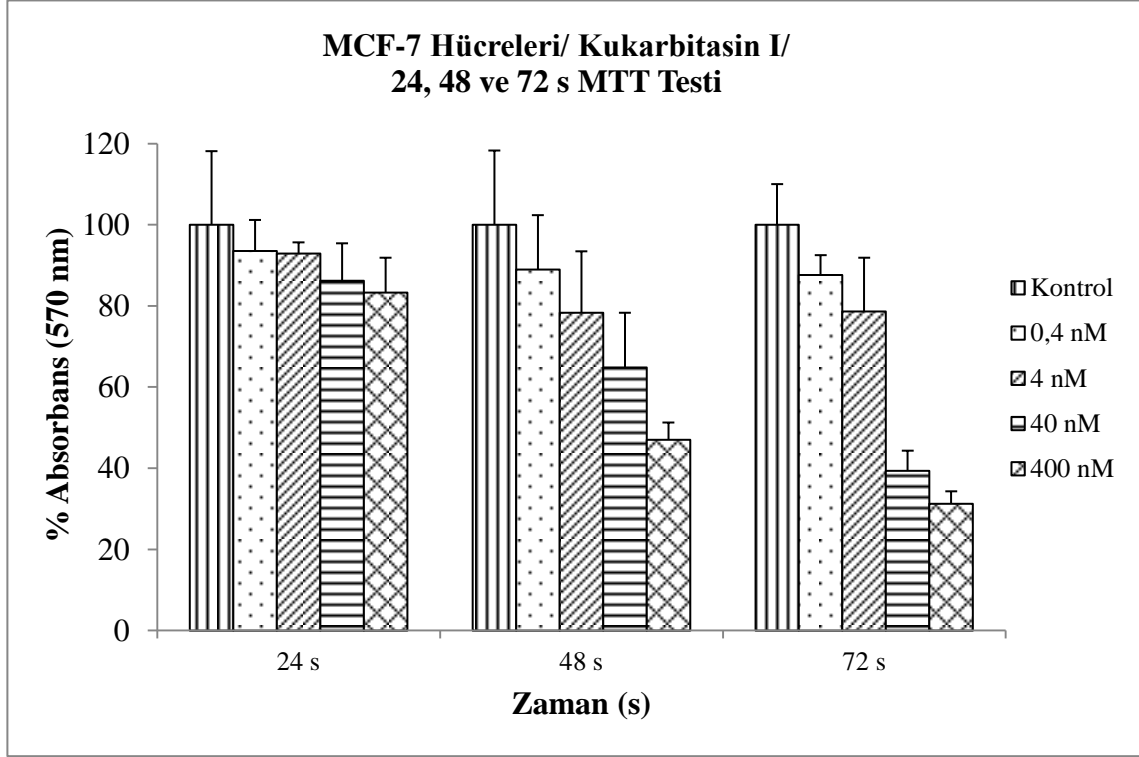
HPLC analizi sonucu elde edilen Kukurbitasin I'ya ait pik alanı kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konularak kloroform ekstraktındaki Kukurbitasin I konsantrasyonu 102,8 μ M olarak tespit edildi.

4.4. MTT Test Sonuçları

Meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231); Kukurbitasin I, *E.elaterium* meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile belirli konsantrasyonlarda tedavi edilip hücre proliferasyonu MTT (3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid) testi ile ölçüldü.

4.4.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri

MCF-7 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.4'te verilmiştir.

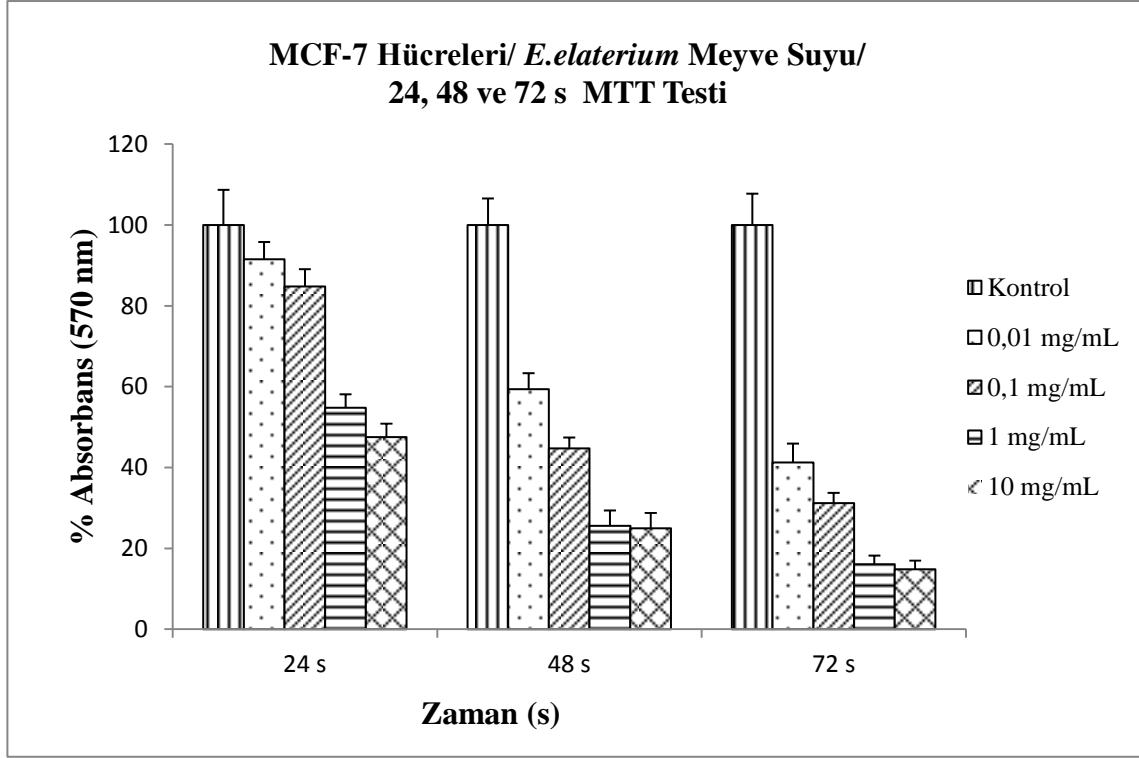


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları

MCF-7 hücrelerinin, 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan Kukurbitasin I (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile tedavisi sonrasında 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde 400 nM'de 24. saatte %16,67, 48. saatte %52,96 ve 72. saatte ise %68,76'lık inhibisyonun gerçekleştiği görüldü. IC₅₀ değeri 48. saatte 330,12 nM; 72. saatte ise 35,12 nM olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 48. ve 72. saatlerde ≥ 40 nM konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.4.2. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri

MCF-7 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.5'te verilmiştir.

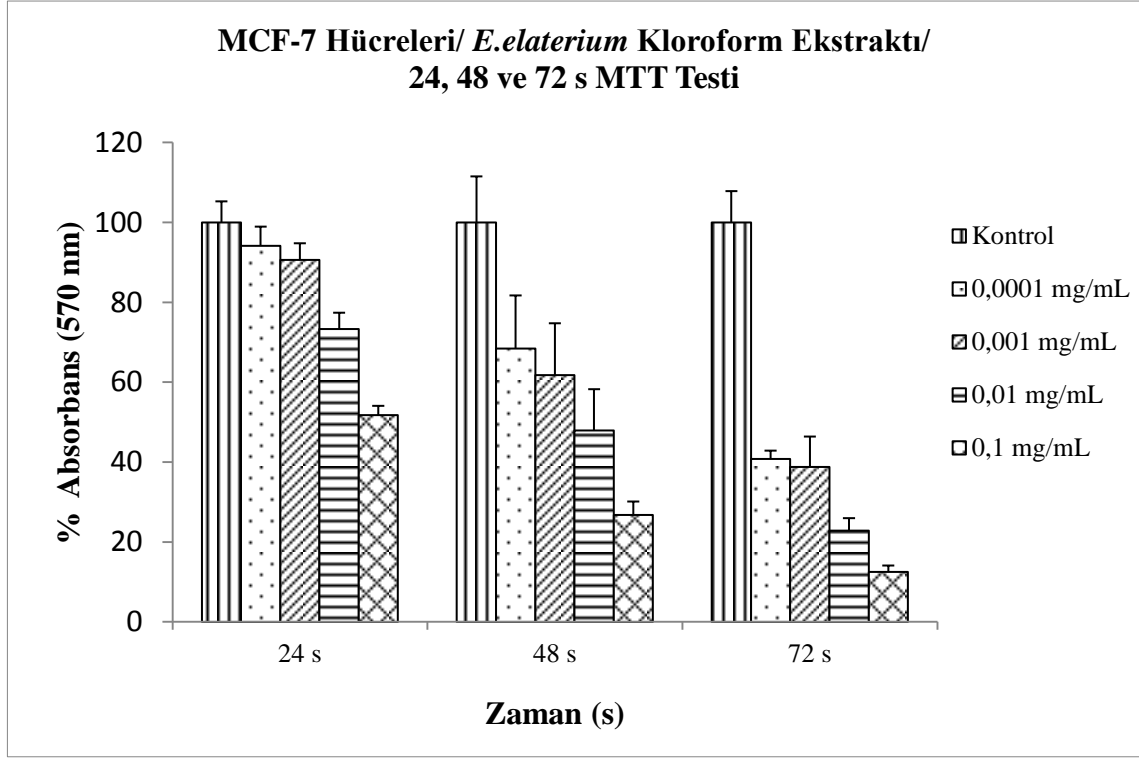


Şekil 4.5. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 24., 48. ve 72.saat MTT test sonuçları

MCF-7 hücreleri *E.elaterium*'un meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. 10 mg/mL doz tedavide 24. saatte %52,46, 48. saatte %75,02 ve 72. saatte ise %85,16'lık inhibisyonun gerçekleştiği görüldü. IC₅₀ değeri 24. saatte 5,19 mg/mL, 48. saatte 0,038 mg/mL, 72. saatte ise 0,00088 mg/mL olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 24. saatte 1 mg/mL ve 10 mg/mL'de, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.4.3. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin MTT testi analizleri

MCF-7 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.6'da verilmiştir.

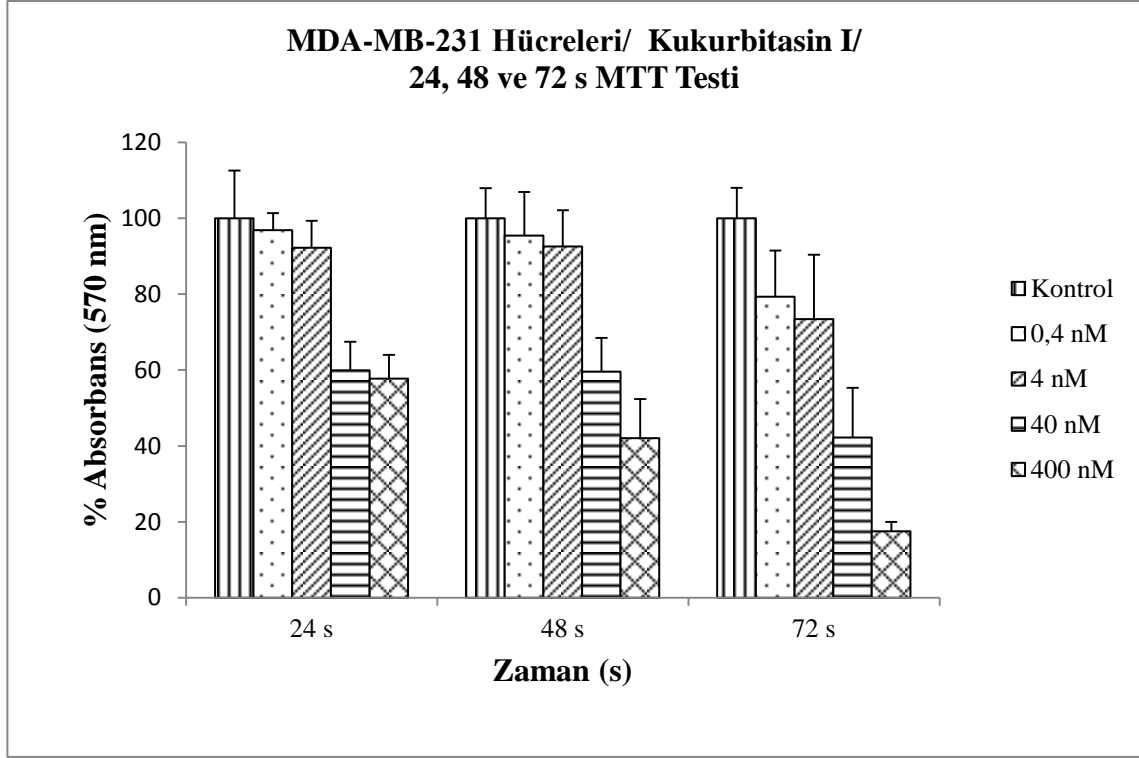


Şekil 4.6. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları

MCF-7 hücreleri *E.elaterium* kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. Kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde 0,1 mg/mL'de 24. saatte %48,22, 48. saatte %73,25 ve 72. saatte ise %87,51'lük inhibisyonun gerçekleştiği görüldü. IC₅₀ değeri 48. saatte 0,0049 mg/mL, 72. saatte ise 0,000025 mg/mL olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 24., 48. ve 72. saatlerde tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.4.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri

MDA-MB-231 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.7’de verilmiştir.

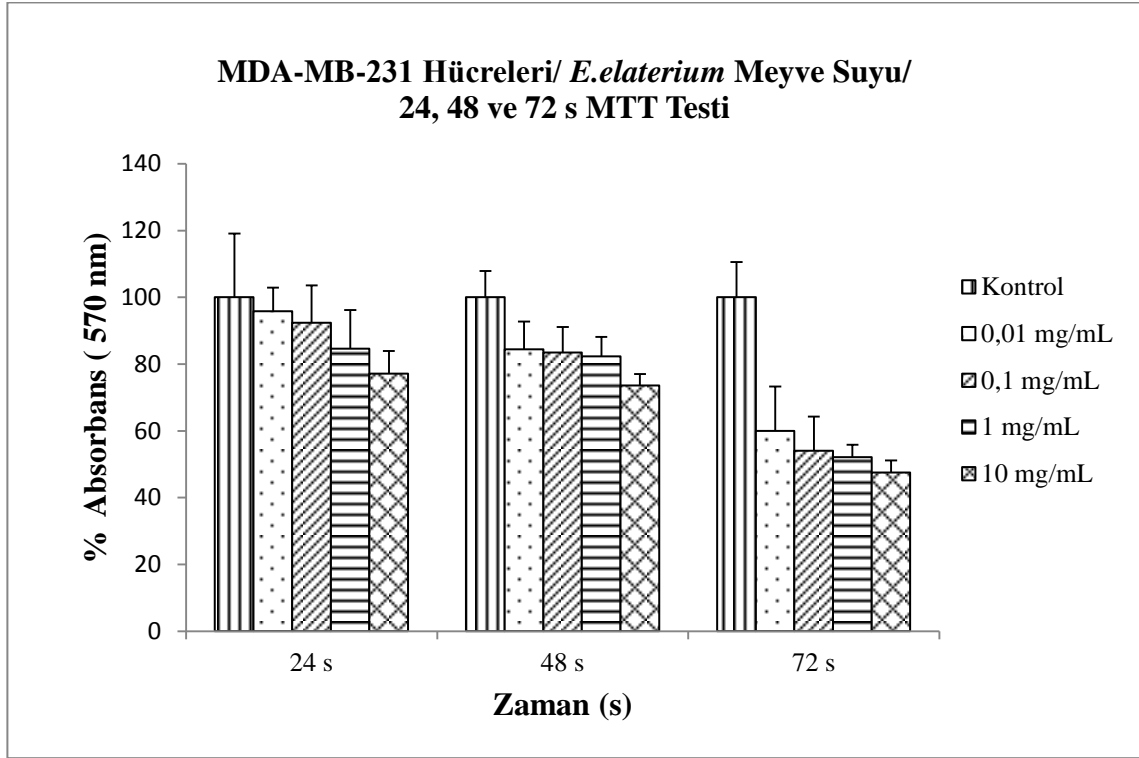


Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları

MDA-MB-231 hücreleri Kukurbitasin I'nın 4 farklı konsantrasyonu (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde 400 nM'de 24. saatte %42,27, 48. saatte %57,94 ve 72. saatte ise %82,48'lik inhibisyonun gerçekleştiği analiz edildi. IC₅₀ değeri 48. saatte 183,47 nM, 72. saatte ise 17,69 nM olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 24. saatte ≥ 4 nM'de, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.4.5. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri

MDA-MB-231 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.8'de verilmiştir.

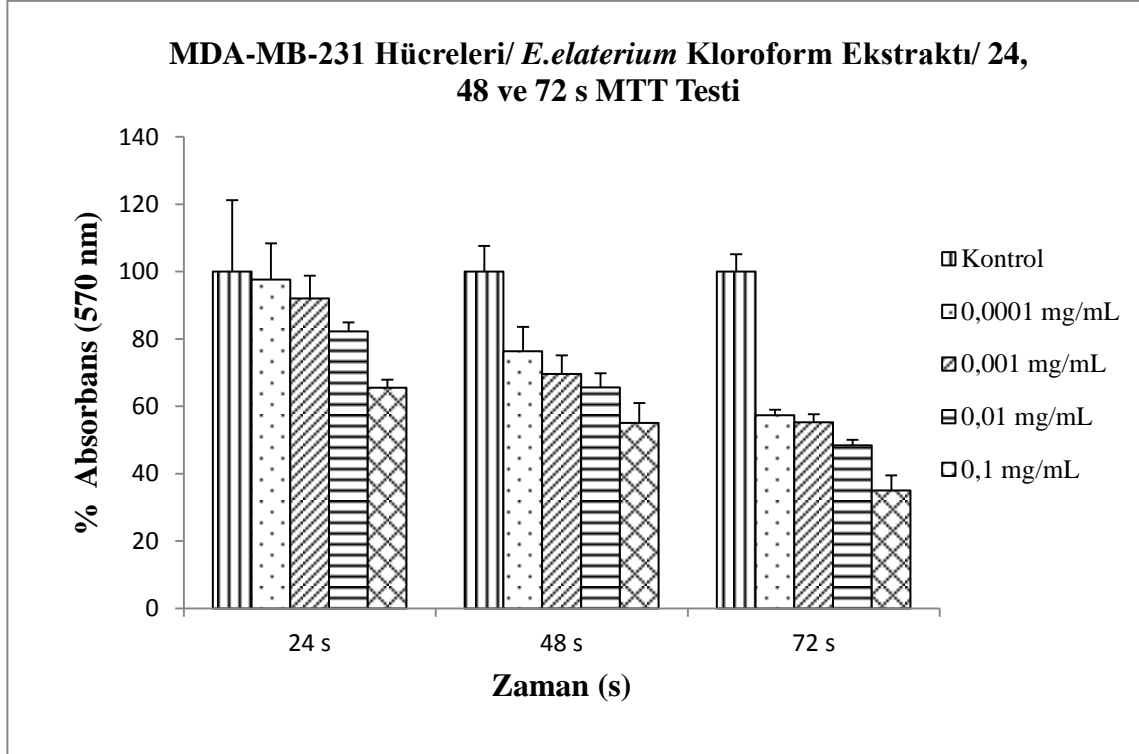


Şekil 4.8. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları

MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium* meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavisi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde 10 mg/mL'de 24. saatte %22,88, 48. saatte %26,42 ve 72. saatte ise %52,47'lik inhibisyonun gerçekleştiği görüldü. IC₅₀ değeri 72. saatte 4,21 mg/mL olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 24. saatte 10 mg/mL'de, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.4.6. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin MTT testi analizleri

MDA-MB-231 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde elde edilen bulgular Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat MTT test sonuçları

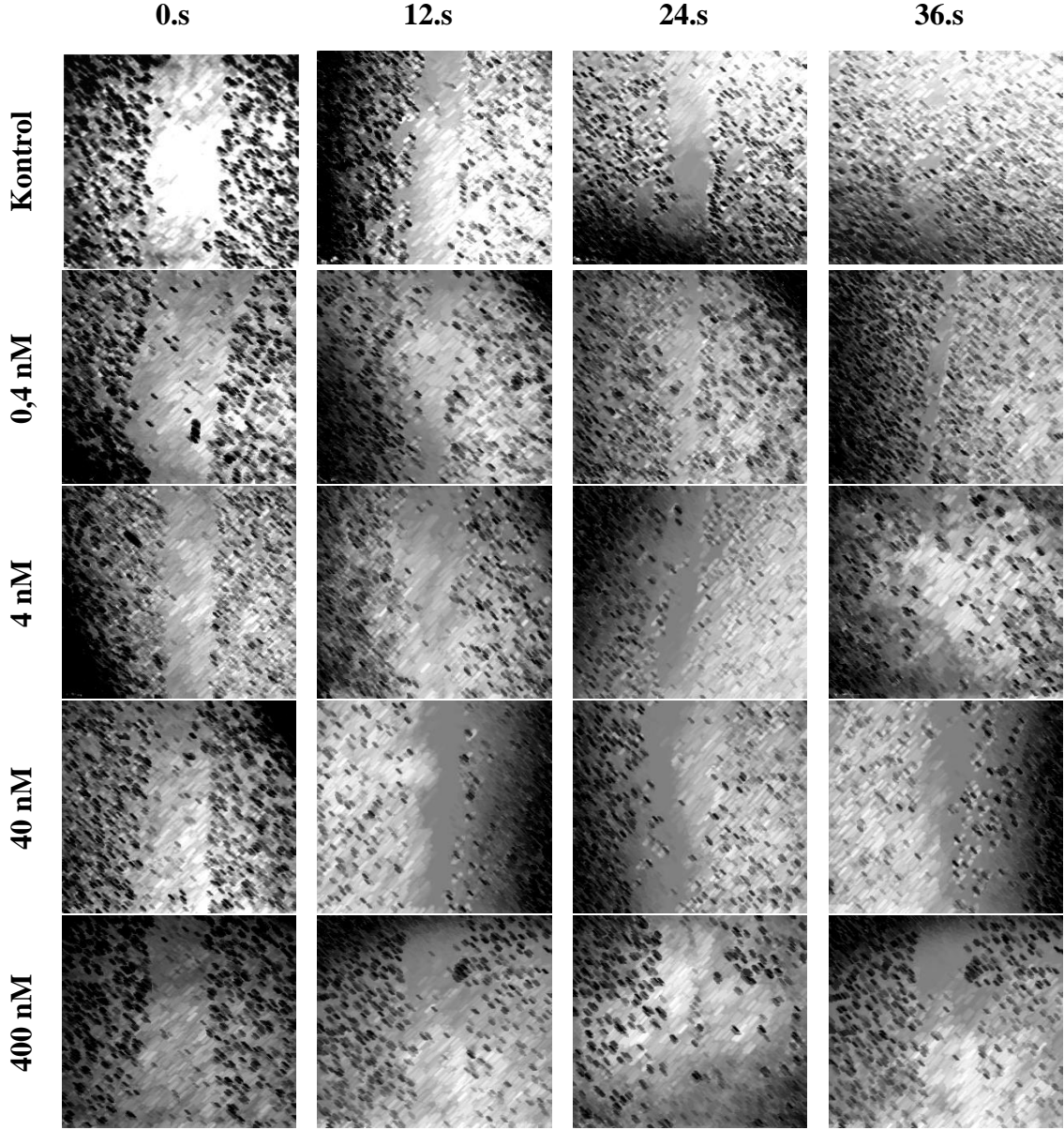
MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) ile tedavi sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde spektrofotometrik ölçümler alındı. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde 0,1 mg/mL'de 24. saatte %34,57, 48. saatte %44,88 ve 72. saatte ise %64,95'lik inhibisyonun gerçekleştiği görüldü. IC₅₀ değeri 72. saatte 0,0025 mg/mL olarak tespit edildi. Antiproliferatif etki; 24. saatte 0,1 mg/mL'de, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak anlamlı bulundu.

4.5. Wound Healing Test Sonuçları

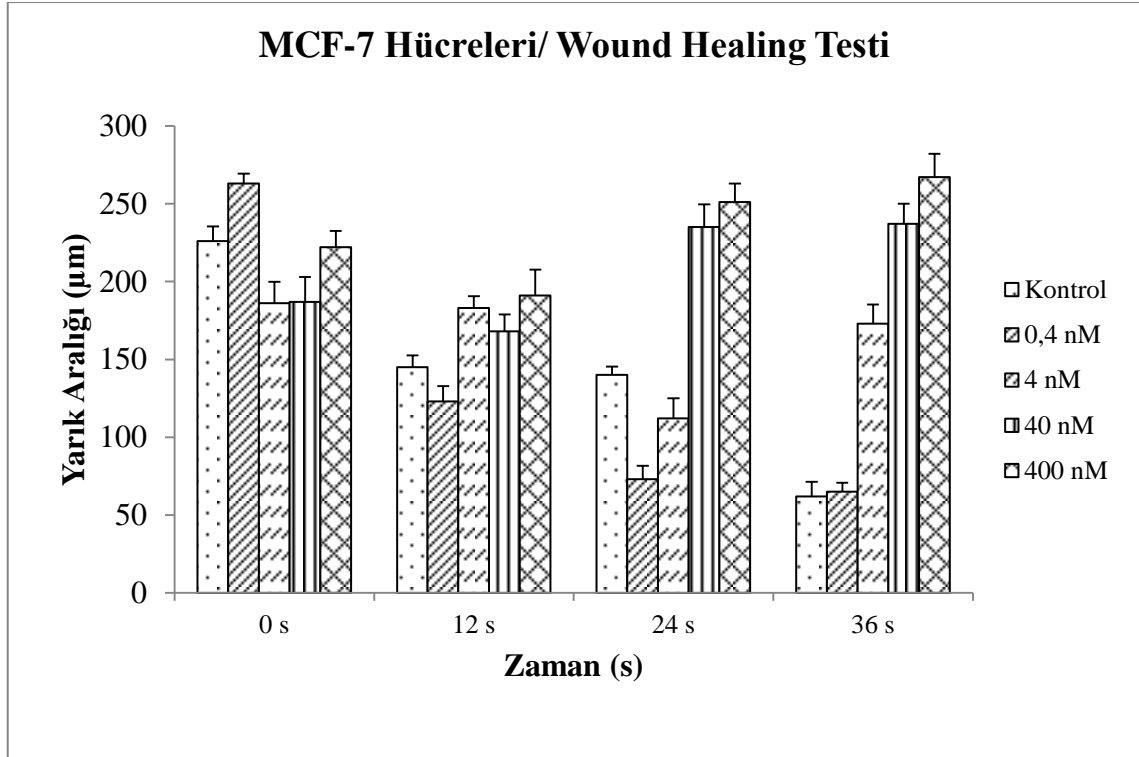
Meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) eşitli konsantrasyonlarda hazırlanan Kukurbitasin I, *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile tedavi edilip, 0., 12., 24. ve 36. saatlerde başlangıçta açılan yarıkların durumu (kapanıp-kapanmadığı) mikroskopla incelenip görüntüleri alındı ve imageJ 1.48 programı kullanılarak analizleri yapıldı.

4.5.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MCF-7 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki Kukurbitasin I ile tedavi sonrası 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 36. saat Wound Healing testi görüntüleri

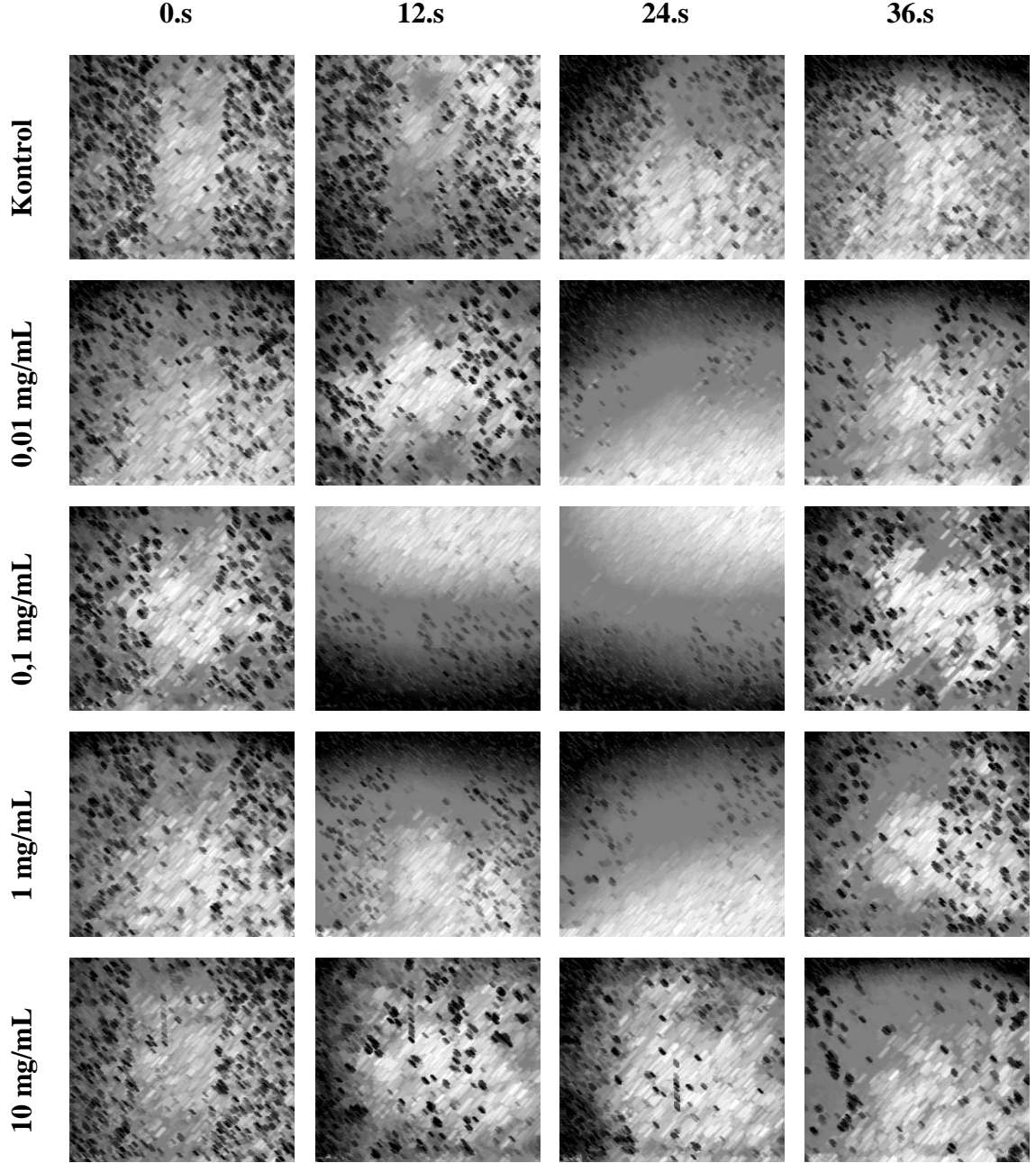


Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları

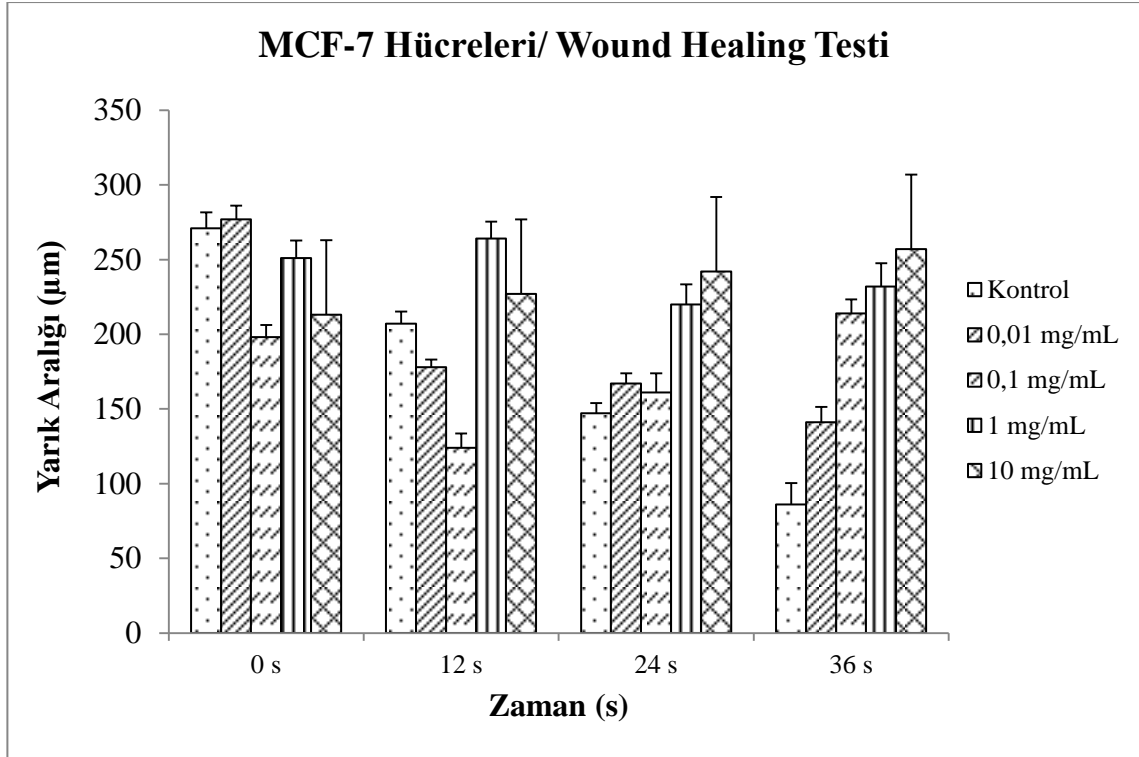
MCF-7 hücreleri Kukurbitasin I'nın 4 farklı konsantrasyonu (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile muamele edildikten sonra 0., 12., 24. ve 36. saat sonunda Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 226 μm iken 36. saatte yarık aralığı hücrelerin çoğalması ile kapanarak 62 μm olarak ölçüldü. Kukurbitasin I ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı başlangıçta 222 μm iken 36. saat sonunda hem hücre ölümleri nedeniyle hem de hücrelerin çoğalma hızı düştüğünden yarık aralığı açılarak 267 μm 'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığının 36. saatte %72,57 kapandığı, 400 nM konsantrasyon Kukurbitasin I tedavisi sonrası ise yarık aralığının %16,85 açıldığı tespit edildi.

4.5.2. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MCF-7 hücreleri, *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi sonrası 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 36. saat Wound Healing testi görüntüleri

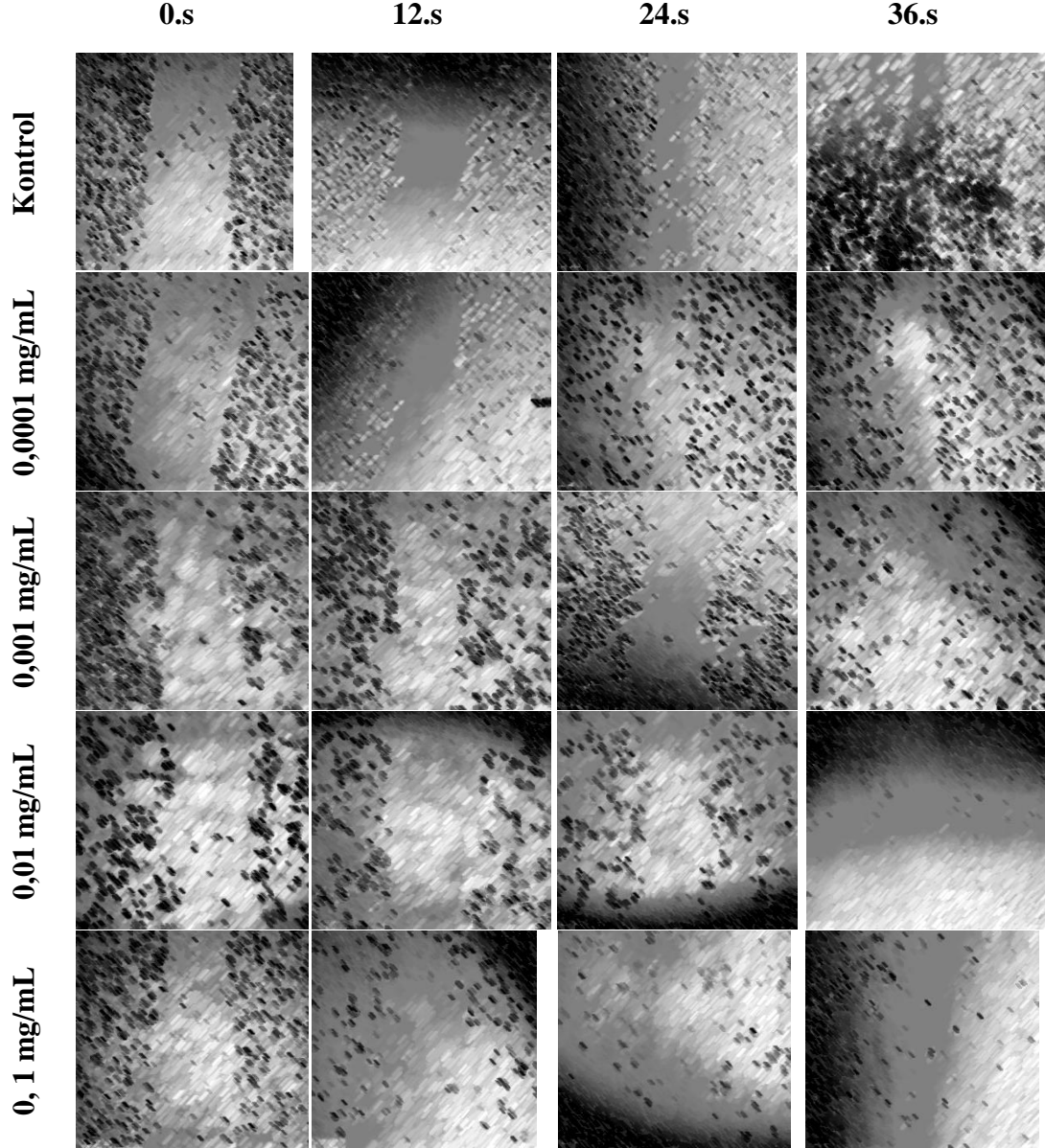


Şekil 4.13. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 36. saat Wound Healing testi analiz sonuçları

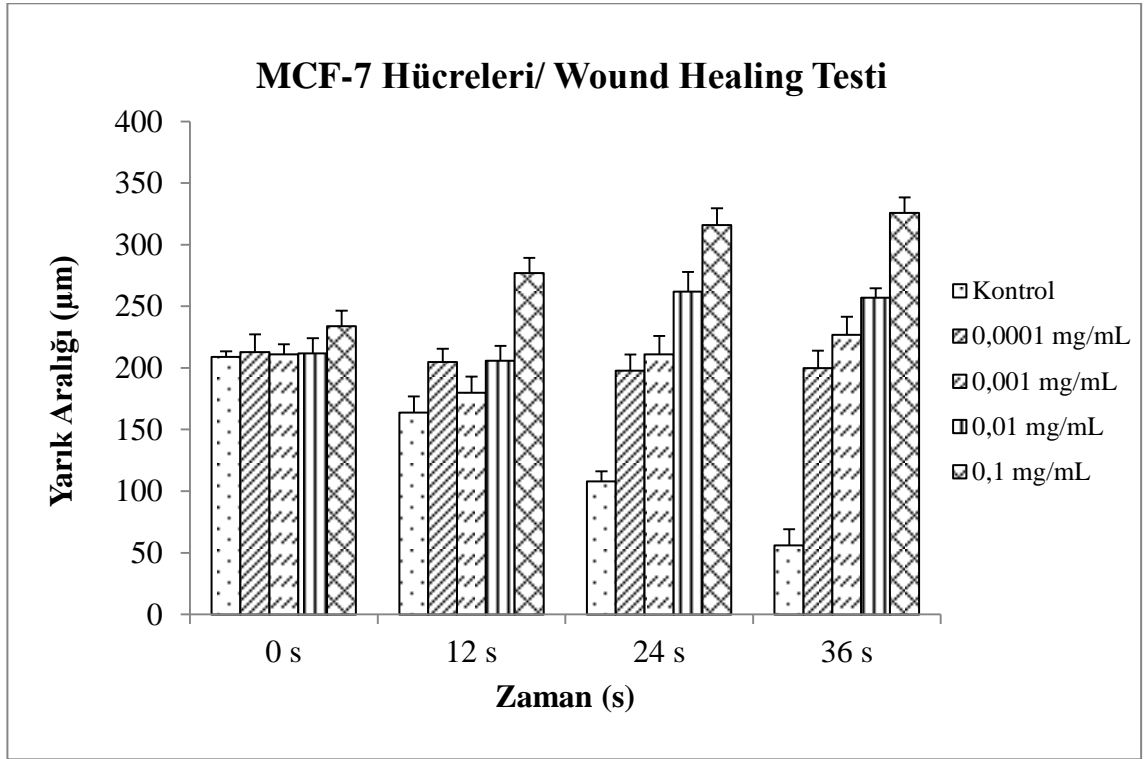
MCF-7 hücreleri *E.elaterium* meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavi edilip, 0., 12., 24. ve 36. saatlerde Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 271 µm iken 36. saatte 86 µm olarak ölçüldü. *E.elaterium*'un meyve suyu ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı 213 µm'den 36. saat sonunda 257 µm'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %68,27 kapanırken, *E.elaterium*'un meyve suyu ile (10 mg/mL) tedavi sonucu yarık aralığı %17,12 açıldı.

4.5.3. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MCF-7 hücreleri, *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edildi ve 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. *E.elaterium*'un farklı kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri

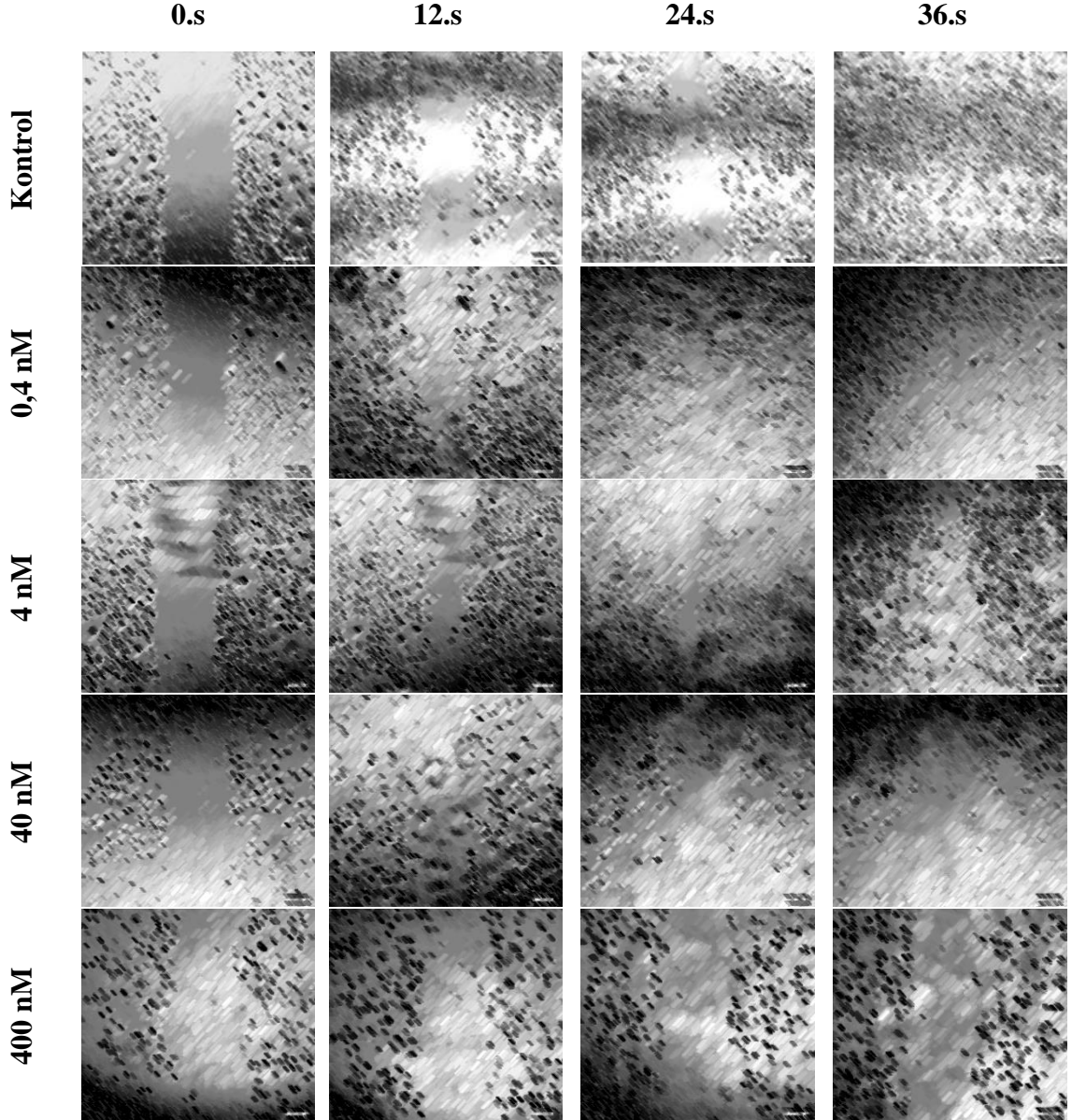


Şekil 4.15. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları

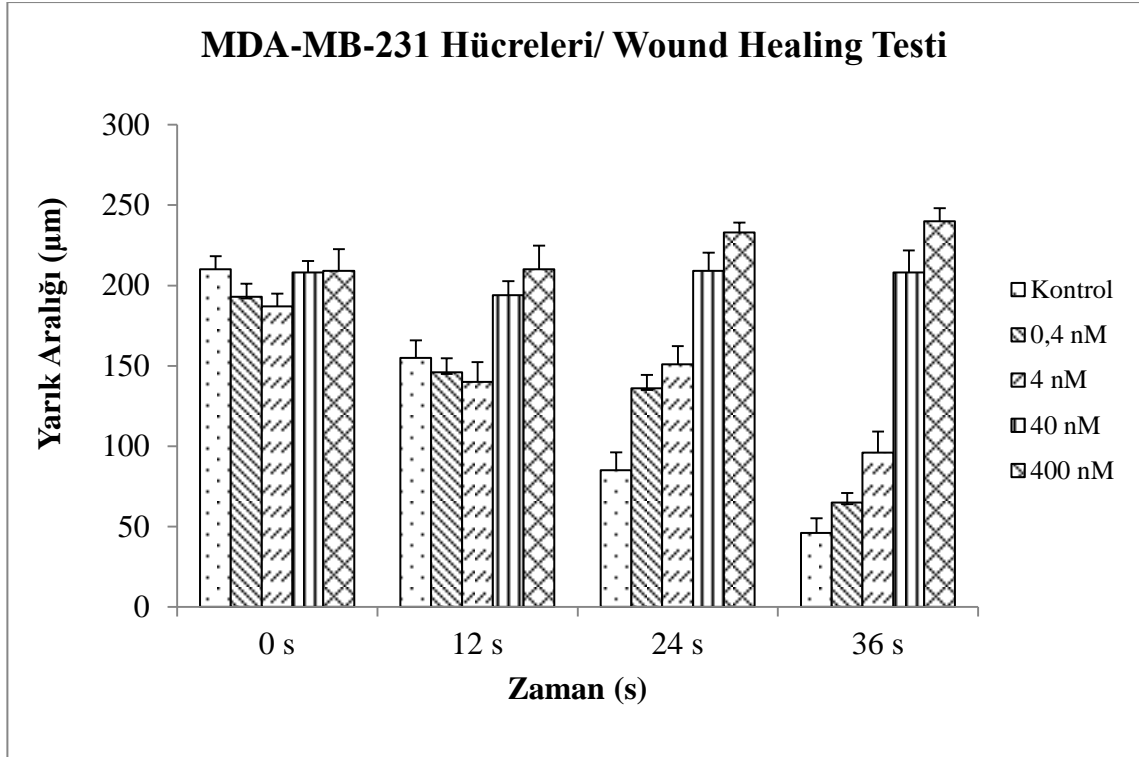
MCF-7 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) ile 0., 12., 24. ve 36. saatlerde Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 209 µm iken 36. saatte 56 µm olarak ölçüldü. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı 234 µm'den 36. saat sonunda 326 µm'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %73,21 kapanırken, *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının (0,1 mg/mL) tedavisi sonucu yarık aralığı %28,22 açıldı.

4.5.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MDA-MB-231 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki Kukurbitasin I ile tedavi sonrası 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri

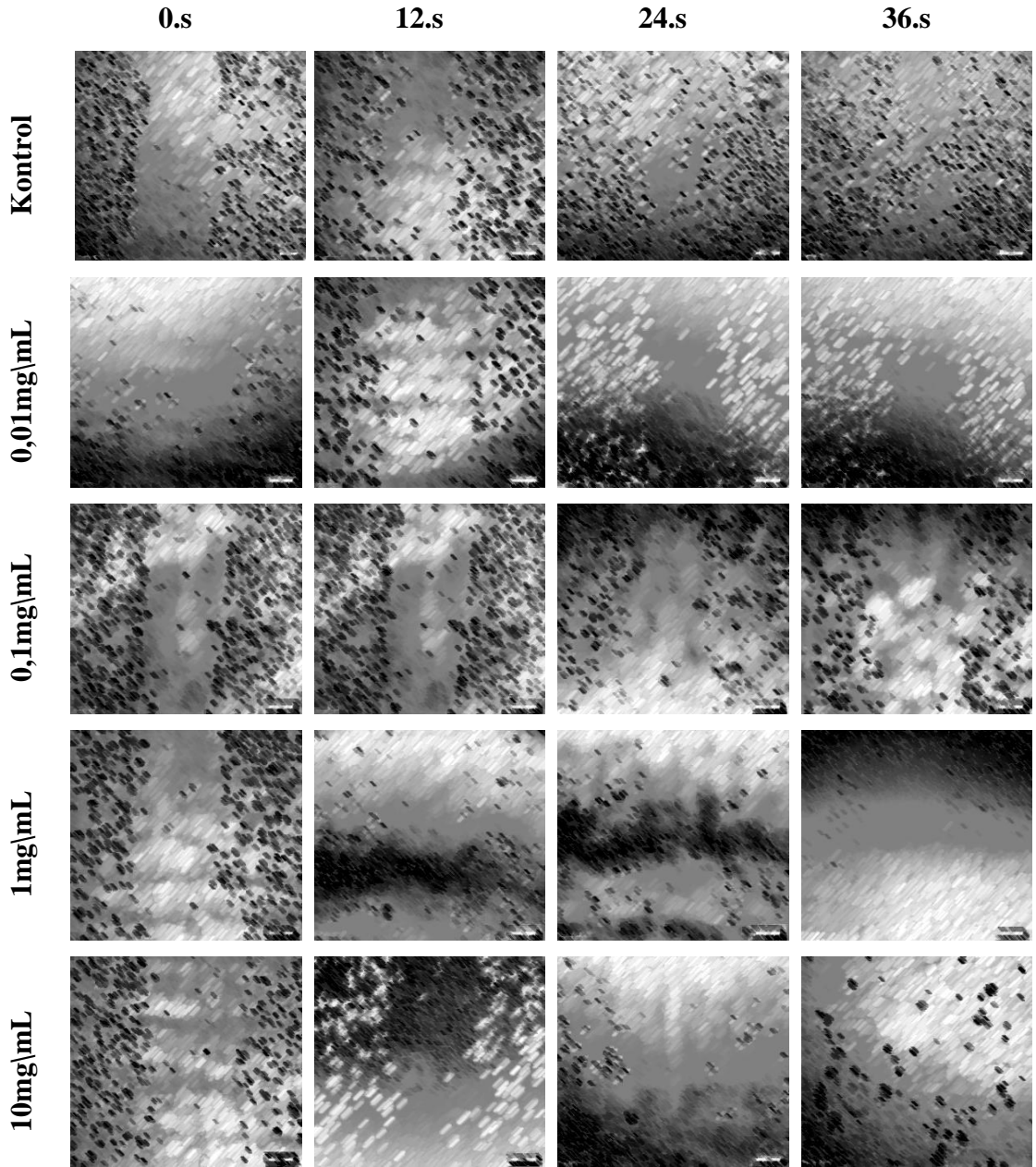


Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları

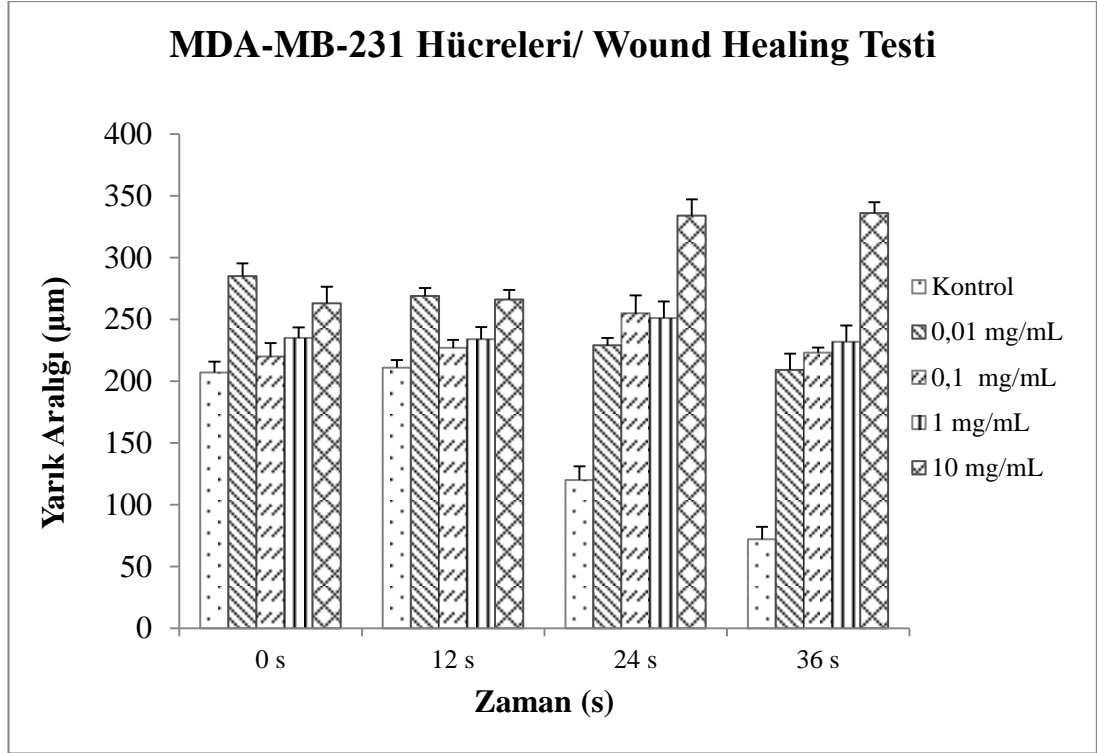
MDA-MB-231 hücreleri Kukurbitasin I'nın 4 farklı konsantrasyonu (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile muamele edildi ve 0., 12., 24. ve 36. saatlerde Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 210 µm iken 36. saatte 46 µm olarak ölçüldü. Kukurbitasin I ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 209 µm'den 36. saat sonunda 240 µm'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %78,10 kapanırken, Kukurbitasin I (400 nM) tedavisi sonucu yarık aralığı %12,92 açıldı.

4.5.5. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MDA-MB-231 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi sonrası 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri

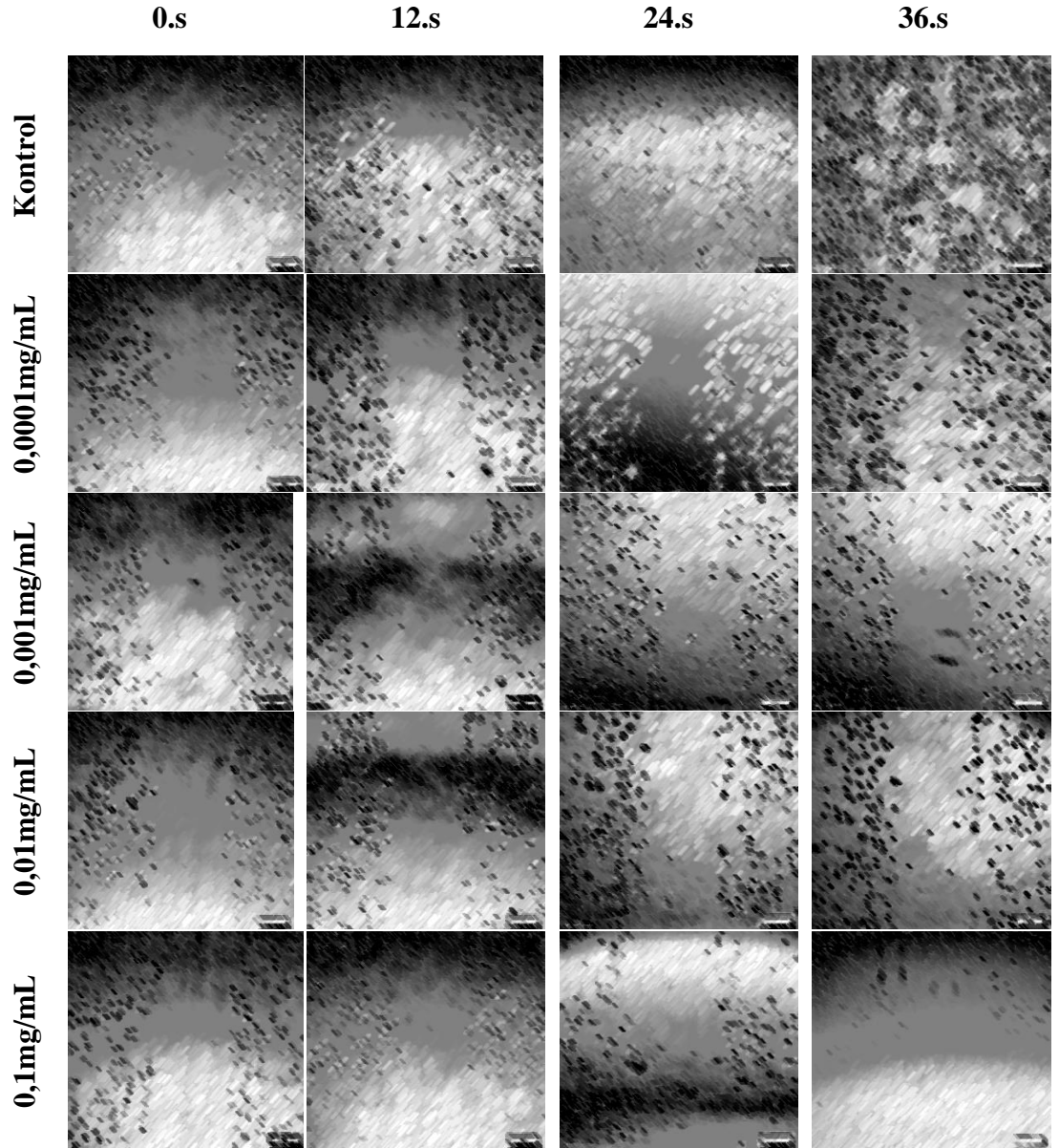


Şekil 4.19. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing testi sonuçları

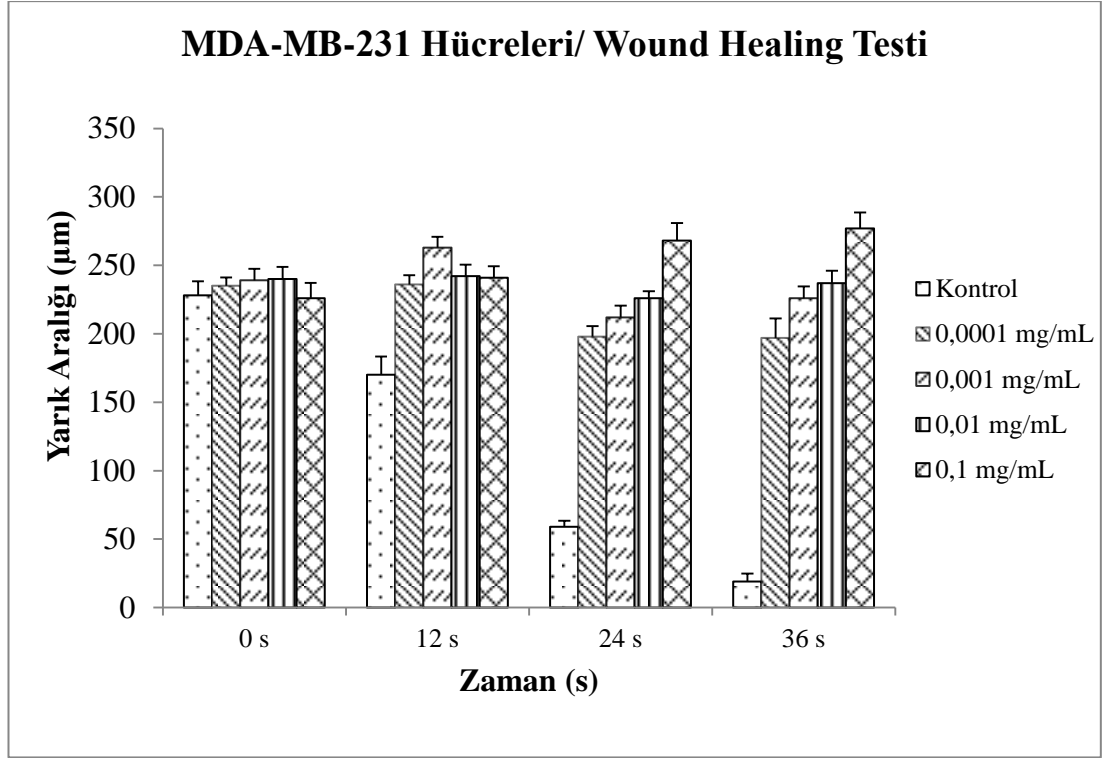
MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un meyve suyu 4 farklı konsantrasyonu (0.01 mg/mL, 0.1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile muamele edilip 0., 12., 24. ve 36. saatlerde Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 207 µm iken 36. saatte 72 µm olarak ölçüldü. *E.elaterium*'un meyve suyu (10 mg/mL) ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 263 µm'den 36. saat sonunda 336 µm'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %65,22 kapanırken, *E.elaterium*'un meyve suyu (10 mg/mL) ile tedavi sonucu yarık aralığı %21,73 açıldı.

4.5.6. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Wound Healing testi analizleri

MDA-MB-231 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi sonrası 0., 12., 24. ve 36. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing görüntüleri



Şekil 4.21. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24. ve 36. saat Wound Healing sonuçları

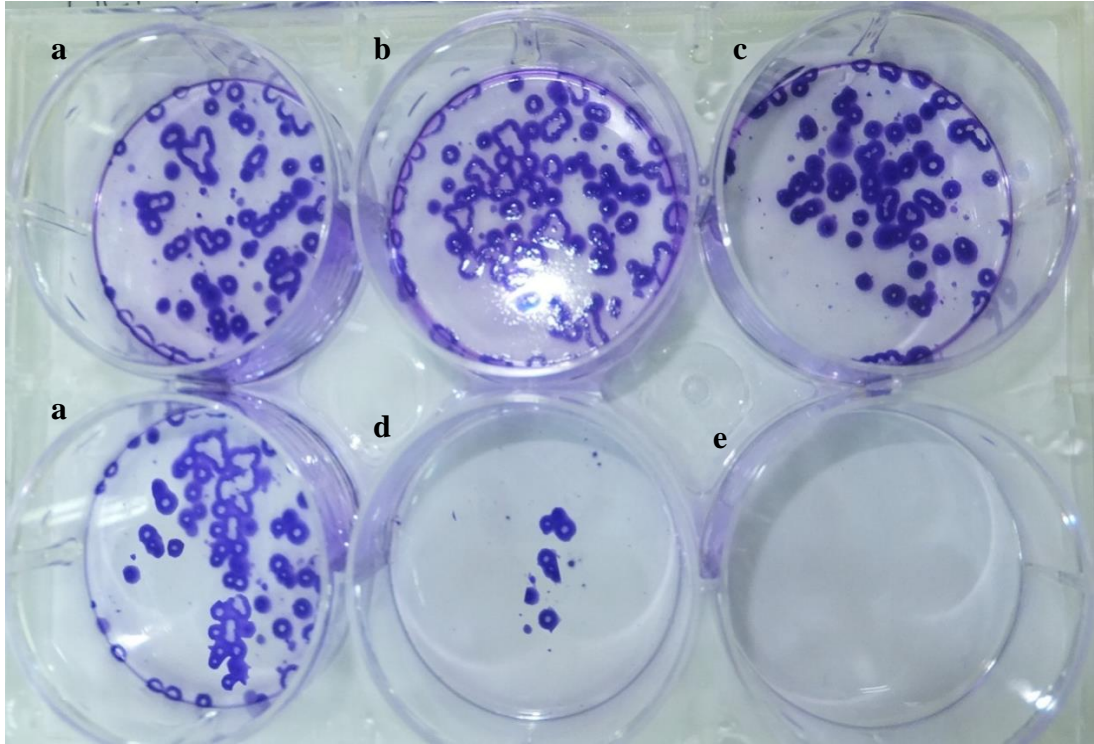
MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) ile 0., 12., 24. ve 36. saatlerde Wound Healing görüntüleri alındı. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 228 µm iken 36. saatte 19 µm olarak ölçülmüştür. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı (0,1 mg/mL) ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 226 µm'den 36. saat sonunda 277 µm'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36.saatte %91,67 kapanırken, *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı (0,1 mg/mL) ile tedavisi sonucu yarık aralığı %18,42 açıldı.

4.6. Koloni Formasyon Testi Sonuçları

Meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan Kukurbitasin I, *E.elaterium* meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile belirli konsantrasyonlarda tedavi edilip hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri analiz edildi.

4.6.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MCF-7 hücrelerinin Kukurbitasin I ile tedavi sonrası Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

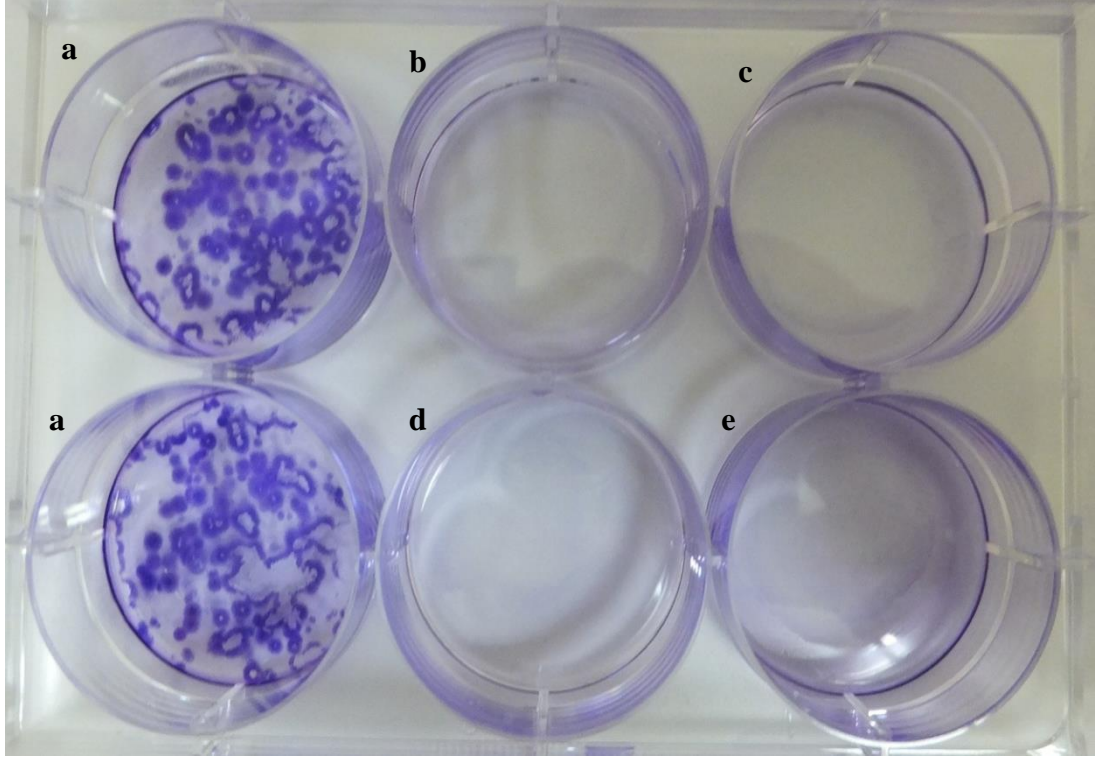


Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi görüntüsü (a. Kontrol, b. 0,4 nM, c. 4 nM, d. 40 nM, e. 400 nM)

MCF-7 hücreleri Kukurbitasin I'nın 4 farklı konsantrasyonu (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile tedavi edildi ve Koloni Formasyon testi görüntüleri alındı. Kontrol grubunda (tedavi yapılmayan) 113; 0,4 nM'da 102; 4 nM'da 85; 40 nM'da 11 koloni oluşurken, 400 nM'da ise koloni oluşmadığı görüldü.

4.6.2. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MCF-7 hücre hattının *E.elaterium* meyve suyu ile tedavisinin Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

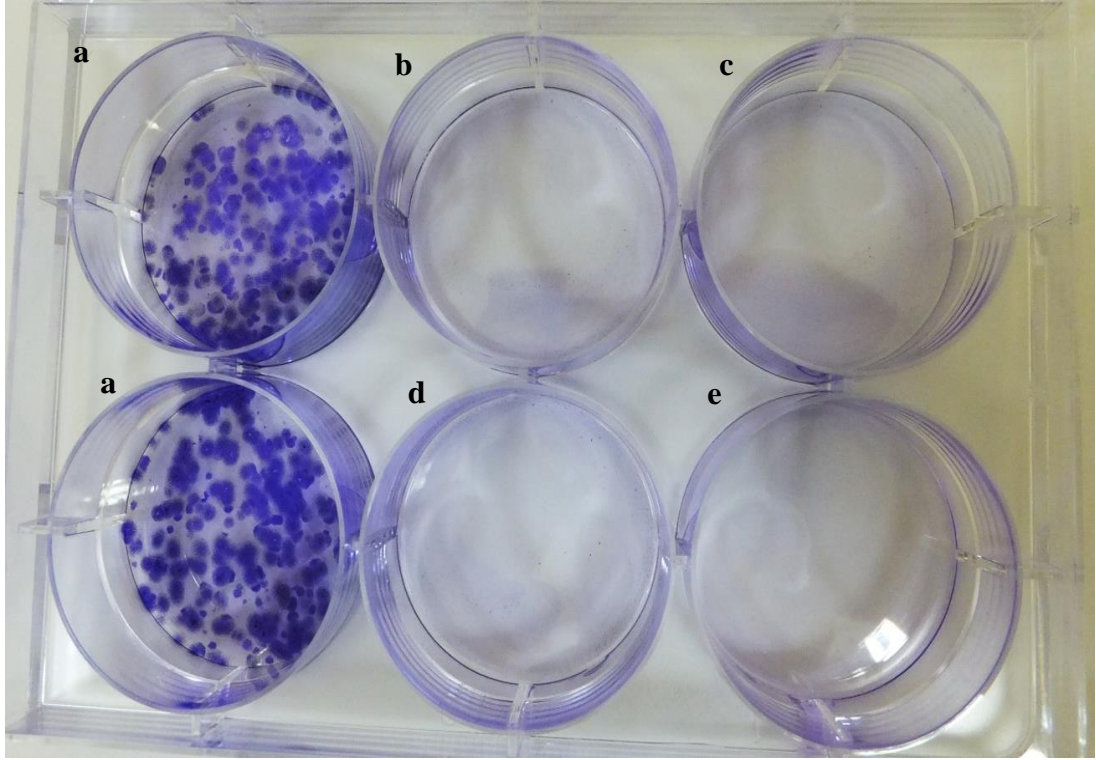


Şekil 4.23. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları (a. Kontrol, b. 0,01 mg/mL, c. 0,1 mg/mL, d. 1 mg/mL, e. 10 mg/mL)

MCF-7 hücreleri *E.elaterium* meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavi edildi ve kontrol grubunda ortalama 123 koloni oluşurken, tedavi uygulanan hücre hatlarında koloni oluşmadığı gözlemlendi.

4.6.3. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MCF-7 hücre hattının *E.elaterium* kloroform ekstraktı ile tedavisinin Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.24'de gösterilmiştir.

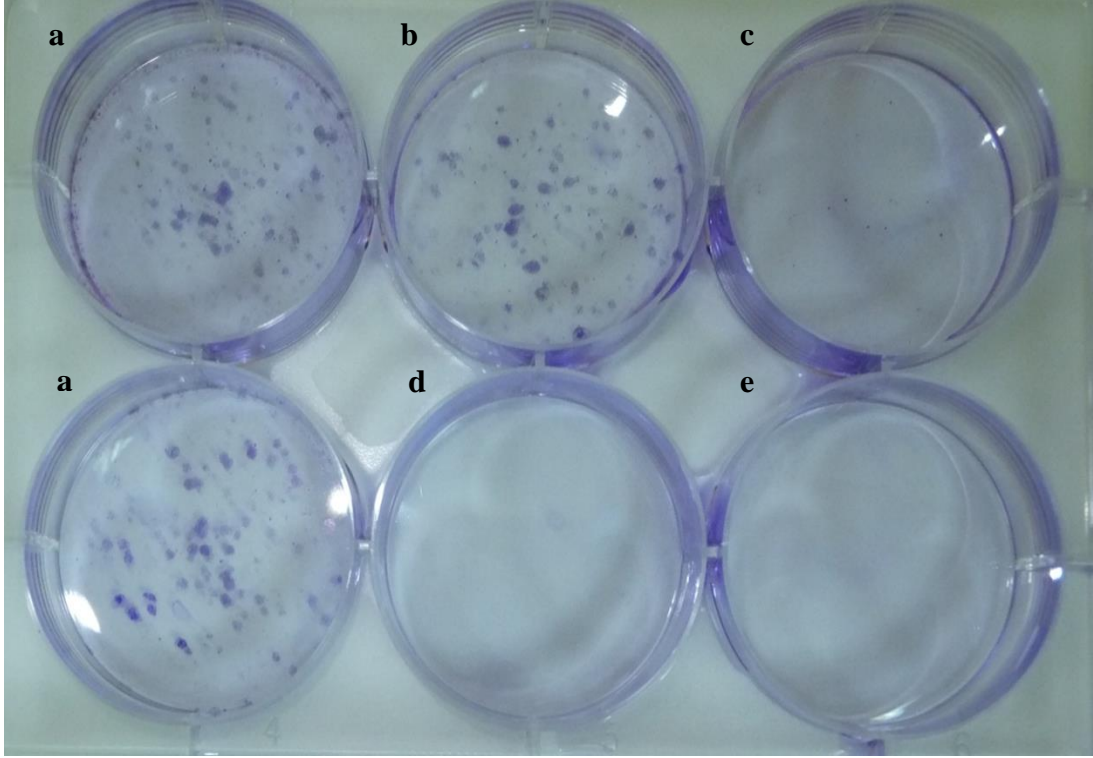


Şekil 4.24. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları (a. Kontrol, b. 0,0001 mg/mL, c. 0,001 mg/mL, d. 0,01 mg/mL, e. 0,1 mg/mL)

MCF-7 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL ve 0,1 mg/mL) ile tedavi edildi. Kontrol grubunda ortalama 186 koloni oluşurken, tedavi uygulanan hücre hatlarında koloni oluşmadığı tespit edildi.

4.6.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattının Kukurbitasin I ile tedavisinden sonra Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.25'te gösterilmiştir.

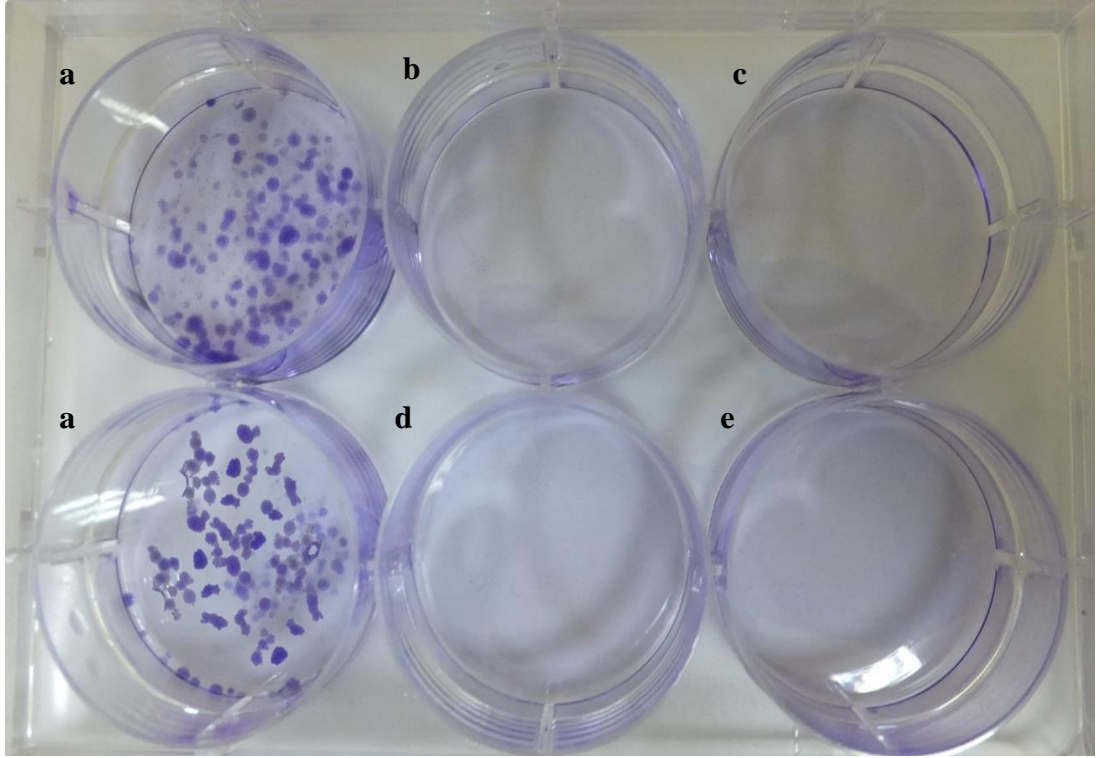


Şekil 4.25. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 0., 12., 24., ve 36. saat Koloni Formasyon testi sonuçları (**a.** Kontrol, **b.** 0,4 nM, **c.** 4 nM, **d.** 40 nM, **e.** 400 nM)

MDA-MB-231 hücreleri Kukurbitasin I'nın 4 farklı konsantrasyonu (0,4 nM, 4 nM, 40 nM ve 400 nM) ile tedavi edilerek Koloni Formasyon testi görüntüleri alındı. Kontrol grubunda 126; 0,4 nM'da 105; 4 nM'da 8; 40 nM ve 400 nM'da ise koloni oluşmadığı gözlemlendi.

4.6.5. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB 231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattının *E.elaterium* meyve suyu ile tedavi sonrası Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.26'da gösterilmiştir.

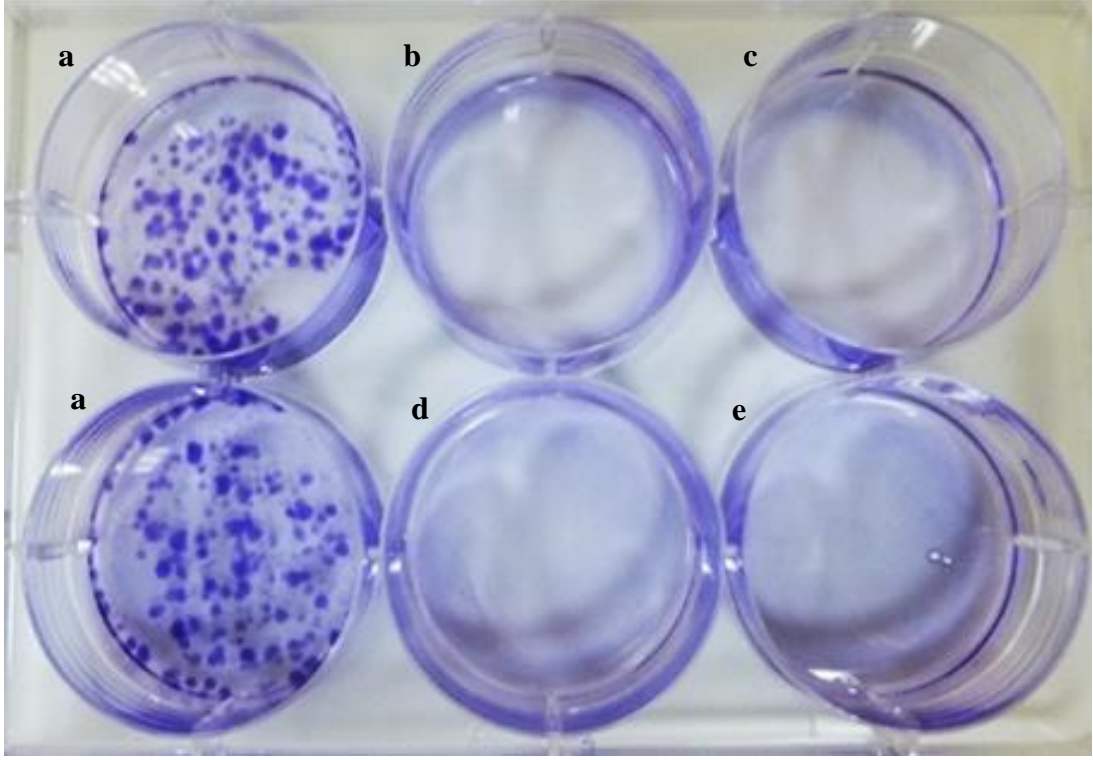


Şekil 4.26. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları (a. Kontrol, b. 0,01 mg/mL, c. 0,1 mg/mL, d. 1 mg/mL, e. 10 mg/mL)

MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium* meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavi edildi. Kontrol grubunda ortalama 153 koloni oluşurken, tedavi uygulanan hücre hatlarında ise koloni oluşmadığı görüldü.

4.6.6. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattının *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi sonrası Koloni Formasyon testi görüntüleri Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



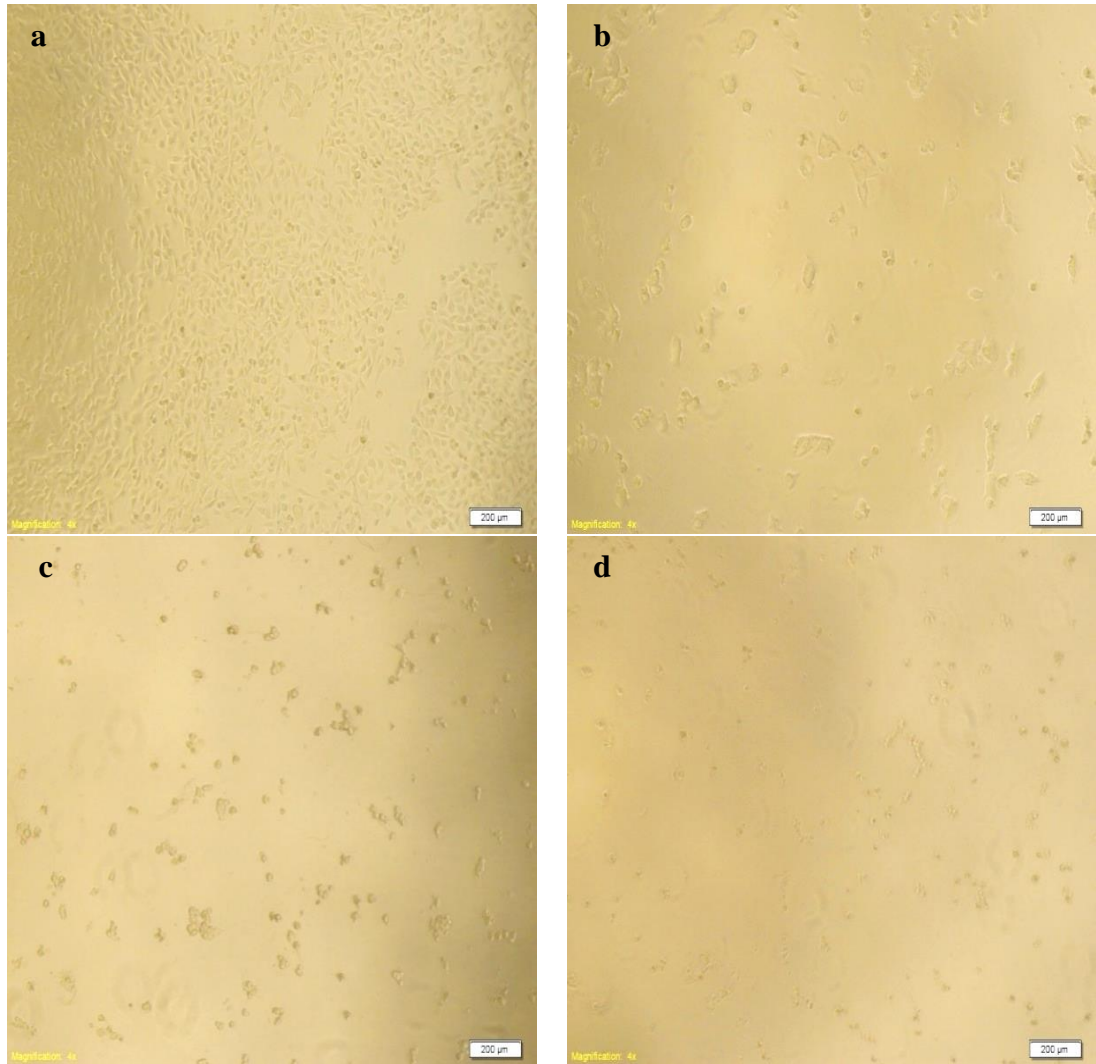
Şekil 4.27. *E.elaterium*'un farklı konsantrasyonlardaki kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin Koloni Formasyon testi sonuçları (**a.** Kontrol, **b.** 0,0001 mg/mL, **c.** 0,001 mg/mL, **d.** 0,01 mg/mL, **e.** 0,1 mg/mL)

MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu (0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL, 1 mg/mL ve 10 mg/mL) ile tedavi edildi. Kontrol grubunda ortalama 186 koloni oluşurken, tedavi uygulanan hücre hatlarında ise koloni oluşmadığı tespit edildi.

4.7. Hücre Morfolojisi Görüntü Analizleri

4.7.1. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

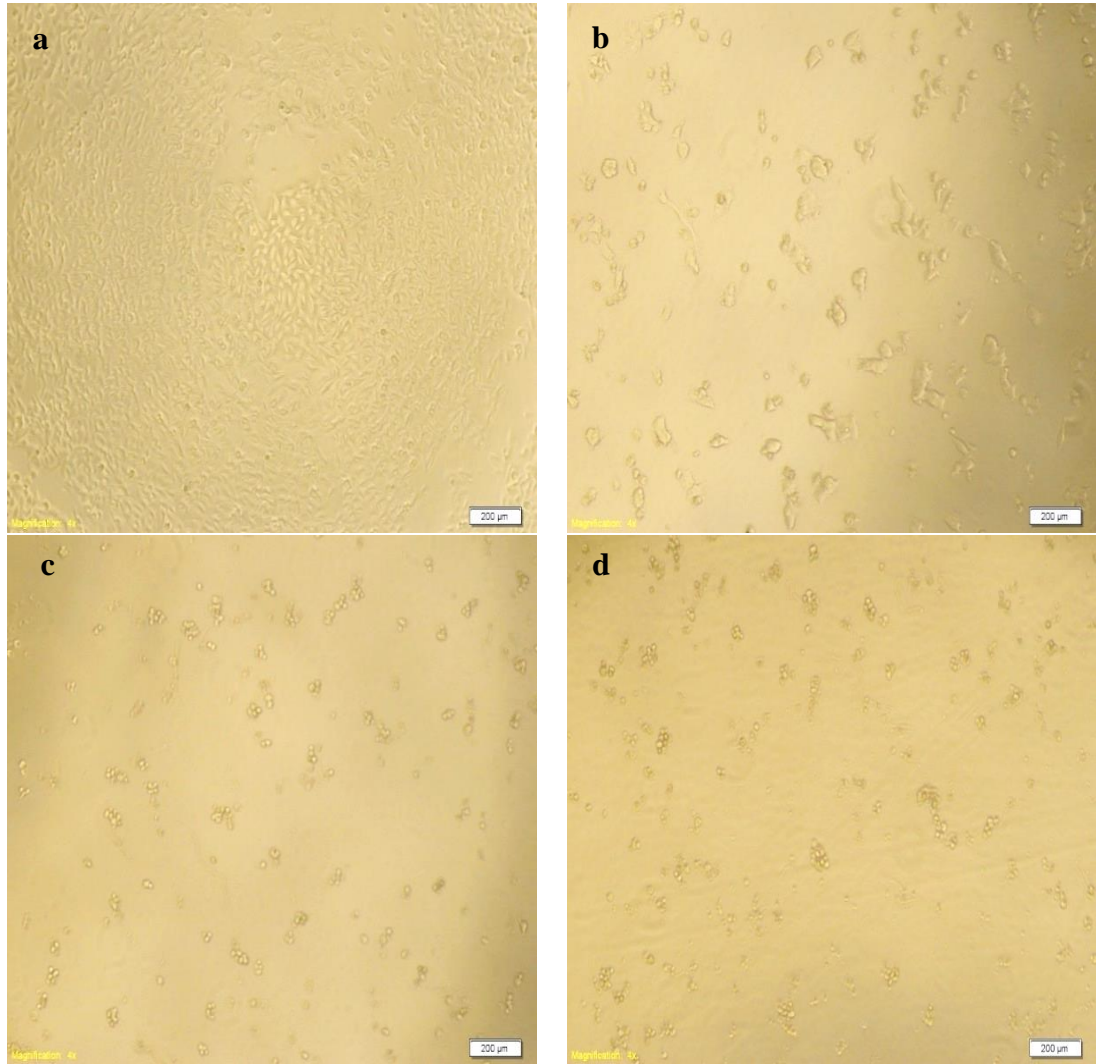
Kukurbitasin I (Kontrol, 0,4 nM, 40 nM, 400 nM) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonra morfolojik görüntüleri Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Kukurbitasin I'nın MCF-7 hücrelerinin morfolojileride değişime sebep olup hücrelerin bölünüp çoğalmasını engellediği, özellikle 400 nM konsantrasyonda apoptoza yönlendirip yok ettiği görülmektedir.



Şekil 4.28. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (**a.** Kontrol, **b.** 0,4 nM, **c.** 40 nM, **d.** 400 nM)

4.7.2. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

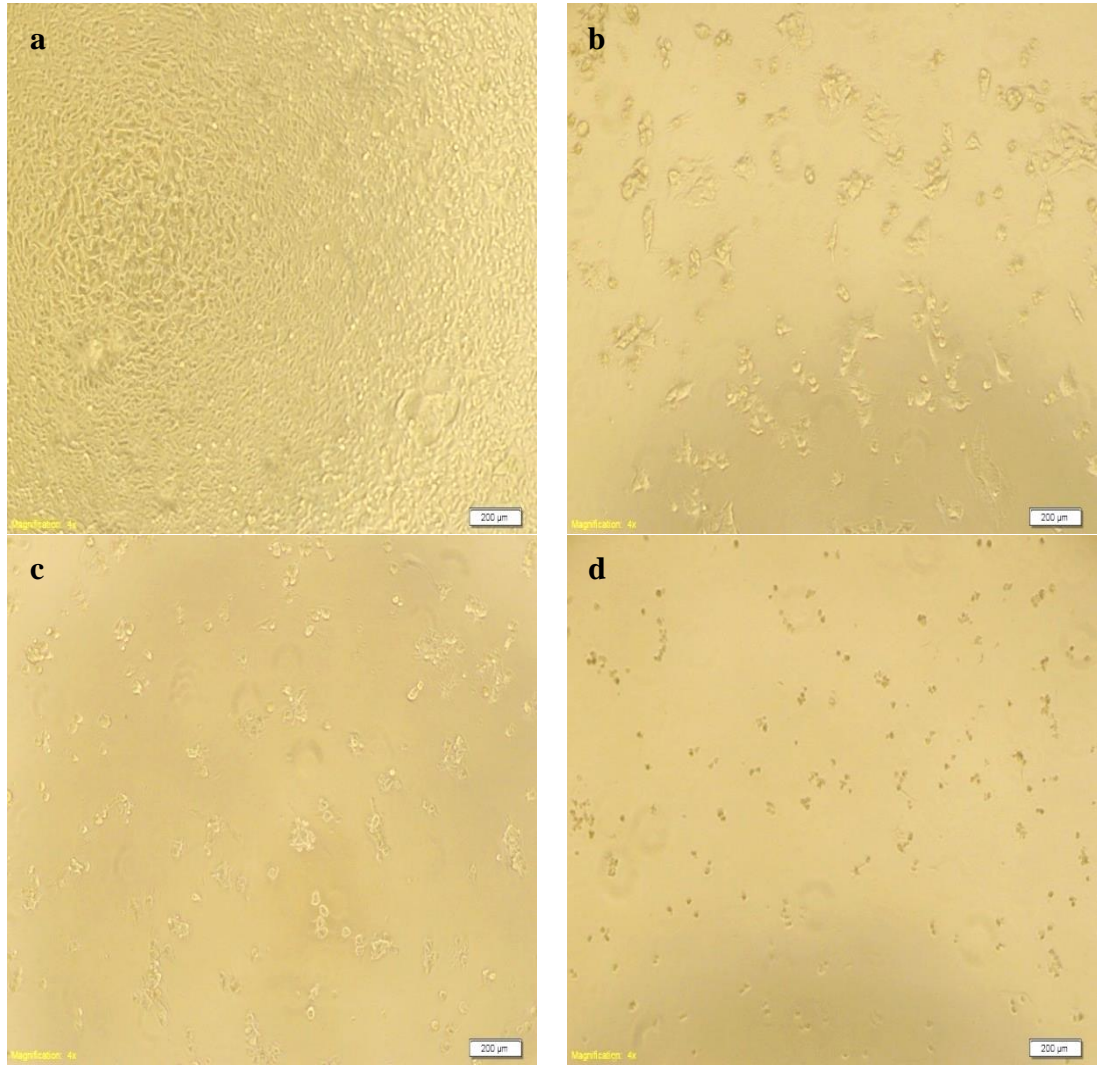
E.elaterium'un meyve suyu (Kontrol, 0,01 mg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonra morfolojik görüntüleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir. Meyve suyu ekstraktının 0,01 mg/mL konsantrasyonda MCF-7 hücrelerinin mobilite yeteneğini azalttığı; 1 mg/mL ve 10 mg/mL'de ise çoğunluğunu apoptosize yönlendirip yok ettiği görülmektedir.



Şekil 4.29. Farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (a. Kontrol, b. 0,01 mg/mL, c. 1 mg/mL, d. 10 mg/mL)

4.7.3. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

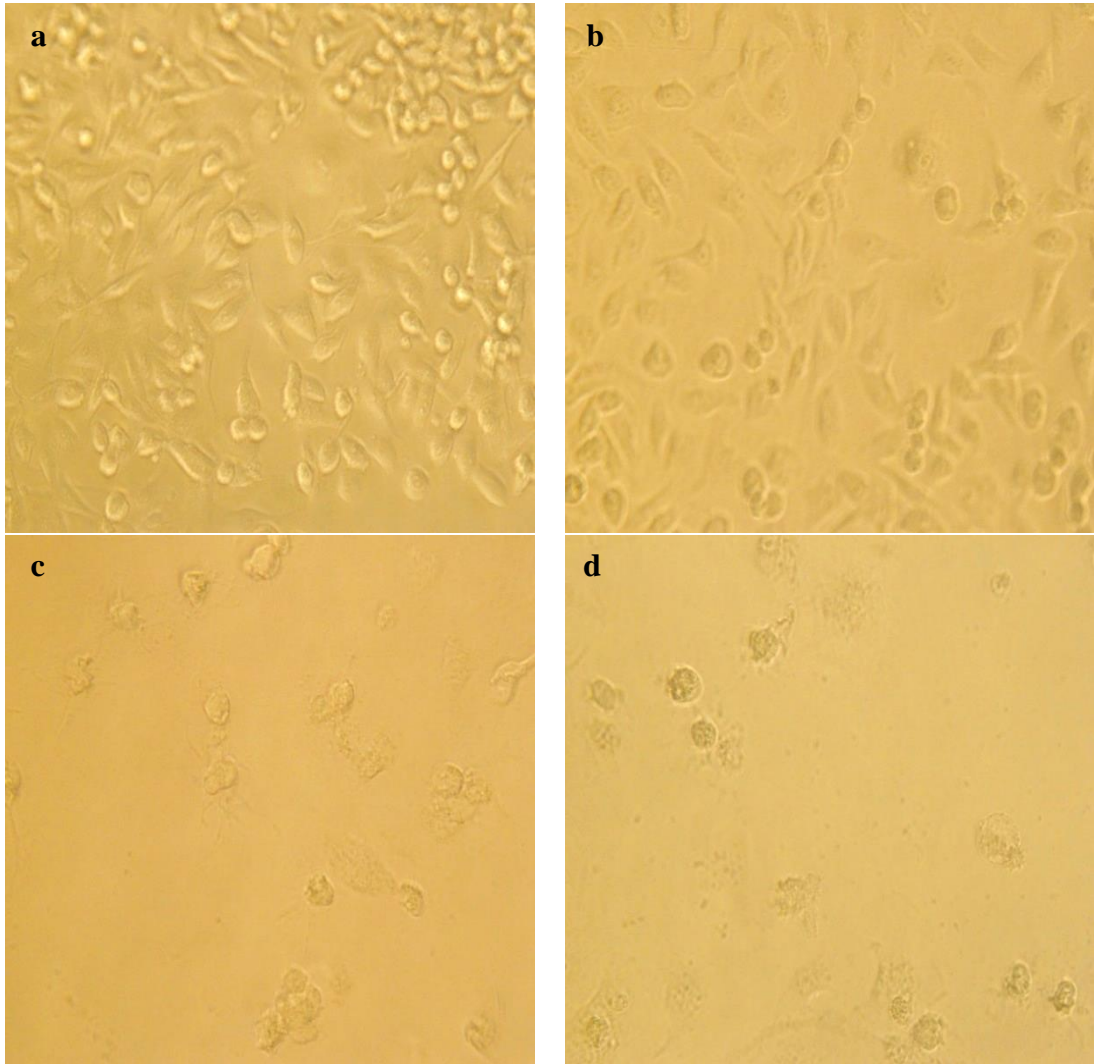
E.elaterium'un kloroform ekstraktı (Kontrol, 0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,1 mg/mL) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonra morfolojik görüntüleri Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Kloroform ekstraktı 0,0001 mg/mL ve 0,001 mg/mL konsantrasyonlarda MCF-7 hücrelerinin hareketini azaltıp, bölünüp çoğalmasını engellediği; 0,1 mg/mL'de ise önemli bölümünü yok ettiğini görülmektedir.



Şekil 4.30. Farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (**a.** Kontrol, **b.** 0,0001 mg/mL, **c.** 0,001 mg/mL, **d.** 0,1 mg/mL)

4.7.4. Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

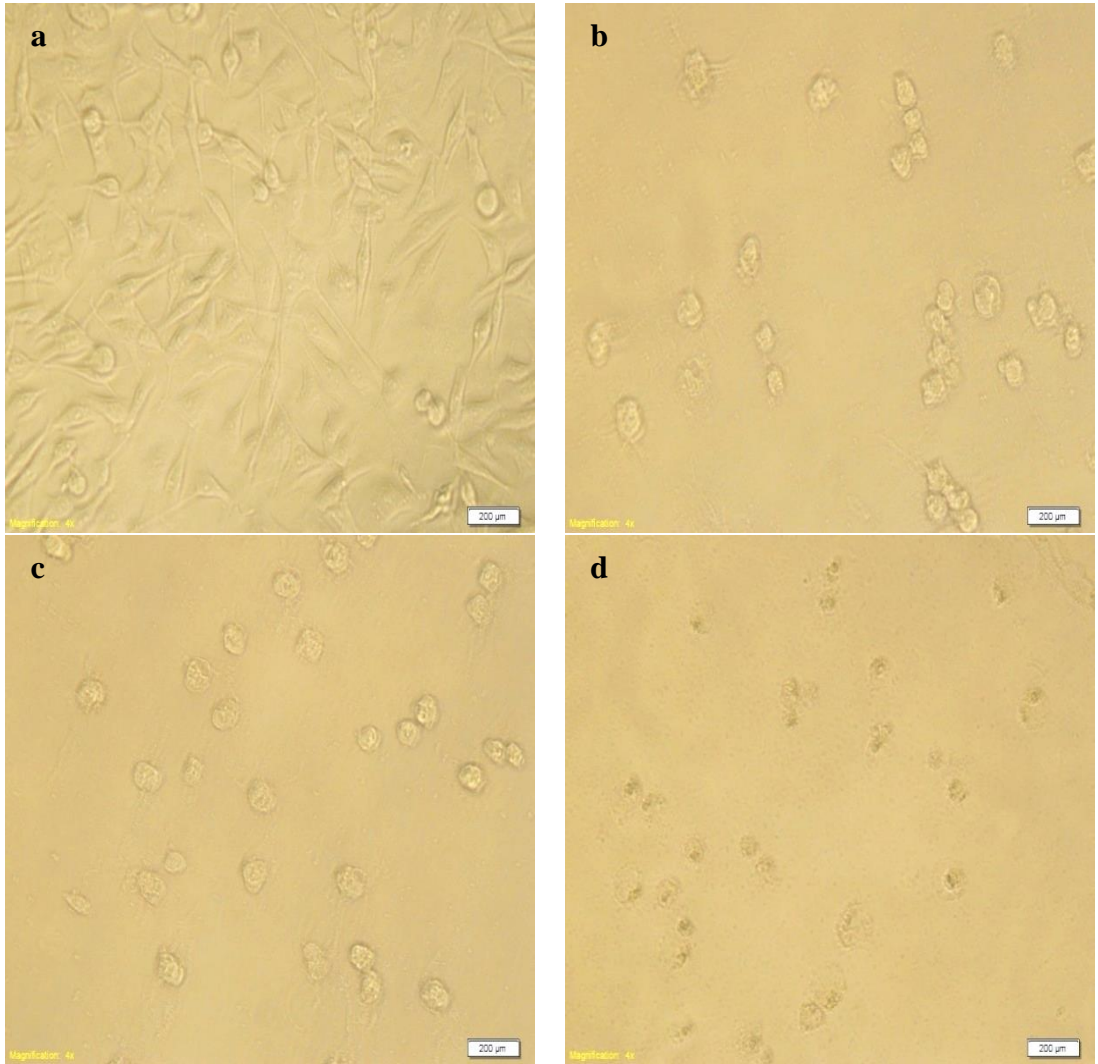
Kukurbitasin I (Kontrol, 0,4 nM, 40 nM, 400 nM) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonra morfolojik görüntüleri Şekil 4.31'de gösterilmiştir. Kukurbitasin I'nın MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojilerinde değişime sebep olup hücrelerin çoğalmasını engellediği; 40 nM ve 400 nM konsantrasyonlarda ise hücrelerin önemli bir kısmını yok ettiği görülmektedir.



Şekil 4.31. Farklı konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (a. Kontrol, b. 0,4 nM, c. 40 nM, d. 400 nM)

4.7.5. *Ecballium elaterium* meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

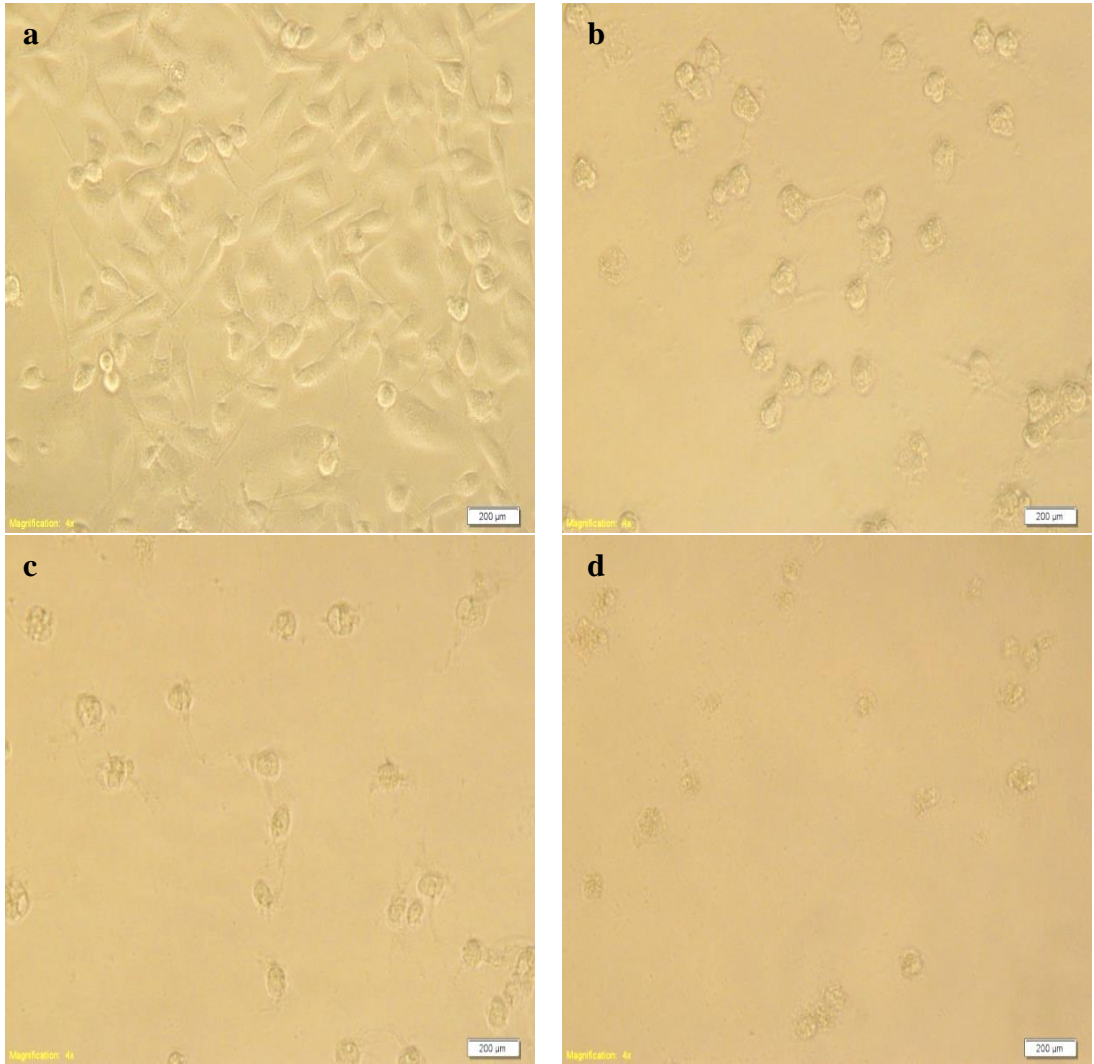
E.elaterium'un meyve suyu (Kontrol, 0,01 mg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonra morfoloji görüntüleri Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Meyve suyunun 0,01 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerinin mobilite yeteneğini azaltıp apoptoze yönlendirirken; 10 mg/mL'de ise önemli bir kısmını yok ettiği görülmektedir.



Şekil 4.32. Farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un meyve suyu ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (**a.** Kontrol, **b.** 0,01 mg/mL, **c.** 1 mg/mL, **d.** 10 mg/mL)

4.7.6. *Ecballium elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüleri

E.elaterium'un kloroform ekstraktı (Kontrol, 0,0001 mg/mL, 0,001 mg/mL, 0,1 mg/mL) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonra morfolojik görüntüleri Şekil 4.33'te gösterilmiştir. Kloroform ekstraktı 0,0001 mg/mL ve 0,001 mg/mL konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerinin bölünüp çoğalmasını engellediği; 0,001 mg/mL ve 0,1 mg/mL konsantrasyonlarda ise önemli bölümünü yok ettiği görülmektedir.



Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlarda *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinin 72 saat sonraki hücre morfolojileri görüntüleri (4x büyütme) (a. Kontrol, b. 0,0001 mg/mL, c. 0,001 mg/mL, d. 0,1 mg/mL)

5. TARTIŞMA

Çağımızın en büyük sorunlarından biri olan kanser, bugün birçok ülkede yüksek ölüm oranlarıyla sonuçlanan bir hastalıktır. Kanser üzerine yapılan araştırmalar bu oranın giderek arttığı ve yakın gelecekte 17 milyon kişiye kanser teşhisi konulabileceğini öngörmektedir. Kanser farklı türleri mevcut olup kadınlar arasında en sık görülen türünün %23 gibi yüksek bir orana sahip olan meme kanseri olduğu ifade edilmektedir (Inzucchi vd., 2005).

Günümüzde meme kanseri üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen bazı tedavilerin çok kısıtlı olduğu ya da mümkün olmadığı durumlar da mevcuttur. Meme kanseri tedavisinde çoğu zaman tedaviye yanıt alamama veya tedavi sonrası kanserin tekrar nüksetmesi ile karşılaşılmaktadır. Ayrıca meme kanserinin tedavi sırasında ilaca direnç kazanan bir kanser türü olduğu da ifade edilmektedir (Özmen, 2008).

Mevcut tedavilerin yeterli olmayışı, bilim insanlarını daha etkili alternatif metotlar kullanarak yeni tedavi yöntemleri bulmaya teşvik etmektedir. Bu bağlamda kanser üzerine yapılan çalışmaların moleküler seviyede daha da artması ve genomik düzeydeki araştırmaların çoğalması oldukça önemlidir. Tüm bu yaklaşımlar neticesinde kanser tedavisindeki araştırmalarda ciddi gelişmeler olmakla beraber ek tedavi yöntemlerinin uygulanmasının da hastalığa farklı bir bakış açısı kazandıracağı düşünülmektedir. Ek tedavilerin başında alternatif tedavi yöntemi olarak bitkisel tedaviler oldukça dikkat çekmektedir.

Yüzyıllardır halk arasında hastalıkların tedavisinde bir çok bitki kullanılmakla birlikte, Cucurbitaceae familyasından olan *Ecballium elaterium* L. (*E.elaterium*) bitkisinin de alternatif tedavi yönünden birçok özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bu bitki Türkiye'nin Akdeniz bölgesinde yetişmektedir (Baytop, 1984). Bitkinin birçok kullanım alanı olduğu gibi antikanserojen etkisinin de mevcut olduğuna dair yapılmış çalışmalar mevcuttur (Yeşilada vd., 1989; Bohlooli vd., 2012; Sayed vd., 2012; İmen vd., 2015).

Çalışmamızda; ülkemizde sık görülen ve yeni tedavi yolları aranan bir kanser olan meme kanserinin tedavisine yönelik *in vitro* araştırmalar yapılmıştır. Literatürde antikanser ajan olarak belirtilen Kukurbitasin I ve yine kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi araştırılan *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktının meme kanseri hücre hatlarına (MCF-7 ve MDA-MB-231) belirli konsantrasyonlarda ve sürelerde uygulanması sonucunda, inhibisyon etkileri MTT

testi ile araştırıldı. Meme kanseri hücre hatlarının; migrasyonu Wound Healing testi ile, koloni oluşturma kabiliyetleri ise Koloni Formasyon testiyle analiz edildi. Ayrıca, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin Kukurbitasin I ve *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktı ile etkileşimini takiben hücre morfolojilerindeki değişim incelendi.

Kromatografik koşulların belirlenmesinde öncelikli olarak Kukurbitasin I standardı kullanılarak çeşitli analizler yapıldı. Bu analizler sonucunda en uygun mobil fazın asetonitril ve %1'lik asetik asit olduğu tespit edildi. Yine yapılan analizlerde gradiyent elüsyonla daha net piklerin olduğu görüldü. Hem mobil faz hem de elüsyon çalışmalarında kolon sabit tutuldu. Bu kromatografik koşullarda Kukurbitasin I'nın alıkonma zamanı 33.586 dakika olarak bulundu. Dolayısıyla *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktlarında yaklaşık 33.586 dakikadaki pik Kukurbitasin I'ya ait olup böylelikle ekstraktlarda Kukurbitasin I varlığı tespit edildi. Kukurbitasin I'nın *E.elaterium*'un meyve suyu ve kloroform ekstraktındaki konsantrasyonları sırasıyla 175,7 µM ve 102,8 µM olarak bulundu.

Deneysel çalışmalarımızdaki MTT test sonuçlarına göre; Kukurbitasin I ile yapılan tedavide MCF-7 hücre hattında 400 nM konsantrasyonda 24. saatte %16,67, 48. saatte %52,96 ve 72. saatte ise %68,76'lık inhibisyon gerçekleşirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise aynı konsantrasyonda 24. saatte %42,27, 48. saatte %57,94 ve 72. saatte ise %82,48'lik inhibisyon gerçekleştiği gözlemlendi. MCF-7 hücreleri için IC₅₀ değeri 48. saatte 330,12 nM, 72. saatte ise 35,12 nM olarak tespit edildi. MDA-MB-231 hücreleri için ise IC₅₀ değeri 48. saatte 183,47 nM, 72. saatte ise 17,69 nM olarak belirlendi. Elde edilen MTT test sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 48. ve 72. saatlerde MCF-7 hücre hattı için ≥40 nM konsantrasyonlarda, MDA-MB-231 hücre hattı için ise 48. ve 72. saatte tüm konsantrasyonlarda Kukurbitasin I ile tedavinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, sonucuna varıldı (p<0,05). Bu sonuçlara göre Kukurbitasin I daha düşük konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücrelerine etki etmektedir.

Jayaprakasam ve arkadaşları 2003'de yaptıkları çalışmada, *Cucurbitacea andreana*'dan izole ettikleri Kukurbitasin I'nın, meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkisini SRB testi ile incelemişlerdir. Kukurbitasin I'nın MCF-7 hücrelerinde 48. saatte 0,4 µM'da %12 inhibitör etki gösterdiğini ifade etmişlerdir (Jayaprakasam vd., 2003). Ayrıca Suwit ve arkadaşları Kukurbitasin B ile

MCF-7 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, 48. saatte IC₅₀ değerini 158,76 µM olarak tespit etmişlerdir (Suwit vd.; 2010).

Bu bağlamda, Kukurbitasin I'nın meme kanseri üzerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda kullanılan test yöntemine bağlı olarak literatürde yer alan inhibisyon etkisinden daha yüksek bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular Kukurbitasin I'nın meme kanseri tedavisi üzerine antitümör ajan olarak kullanılabileceği fikrini kuvvetlendirmekle birlikte, gelecekte kanser tedavilerine yön vereceği de aşikardır.

E.elaterium'un meyve suyu ile tedavi edilen (10 mg/mL) MCF-7 hücrelerinde (Şekil 4.5), 24. saatte %52,46, 48. saatte %75,02 ve 72. saatte ise %85,16'lık inhibisyon gerçekleşirken, MDA-MB-231 hücrelerinde (Şekil 4.8) ise aynı konsantrasyonda 24. saatte %22,88, 48. saatte %26,42 ve 72. saatte ise %52,47'lik inhibisyonun gerçekleştiği belirlendi. MCF-7 hücreleri için IC₅₀ değeri 24. saatte 5,19 mg/mL, 48. saatte 0,038 mg/mL, 72. saatte ise 0,00088 mg/mL olarak tespit edildi. MDA-MB-231 hücreleri için ise 24. ve 48. saatlerde IC₅₀ değerine ulaşamazken 72. saatte 4,21 mg/mL olarak bulundu.

MTT test sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde MCF-7 hücreleri için *E.elaterium* meyve suyu 24. saatte sadece 1 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,05). MDA-MB-231 hücreleri için ise *E.elaterium* meyve suyu ile yapılan tedavilerde 24. saatte sadece 10 mg/mL'de, 48. ve 72. saatlerde ise tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varıldı (p<0,05). Bu sonuçlara göre; *E.elaterium* meyve suyu MCF-7 hücrelerine doz ve zamana bağımlı olarak daha fazla etki ettiği açıkça görülmektedir.

E.elaterium'un kloroform ekstraktı ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde (Şekil 4.6) 0,1 mg/mL konsantrasyonda, 24. saatte %48,22, 48. saatte %73,25 ve 72. saatte ise %87,51'lik inhibisyon gerçekleşirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ise aynı konsantrasyonda (Şekil 4.9) 24. saatte %34,57, 48. saatte %44,88 ve 72. saatte ise %64,95'lik inhibisyon gerçekleştiği belirlendi. MCF-7 hücreleri için IC₅₀ değeri 48. saatte 0,0049 mg/mL, 72. saatte ise 0,000025 mg/mL olarak tespit edildi. MDA-MB-231 hücreleri için ise IC₅₀ değeri 72. saatte 0,0025 mg/mL olarak belirlendi.

E.elaterium kloroform ekstraktı ile yapılan tedavilerde MCF-7 hücreleri için MTT testi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; 24., 48. ve 72. saatlerde tüm

konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ($p<0,05$). MDA-MB-231 hücreleri için *E.elaterium* kloroform ekstraktı ile yapılan tedavide ise 24. saatte 0,1 mg/mL’de, 48. ve 72. saatlerde tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi ($p<0,05$). Bu sonuçlara göre; kloroform ekstraktının MCF-7 hücrelerine doz ve zamana bağımlı olarak daha fazla etki ettiği açıkça görülmektedir.

Ayrıca, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında yapılan MTT testlerinden elde edilen tüm sonuçlara göre 24. saatte meyve suyu ve kloroform ekstraktı arasında anlamlı bir fark yokken, 48. ve 72. saatlerde ise tüm etken maddelerde anlamlı bir fark elde edildiği görüldü ($p<0,05$).

E.elaterium ekstraktlarının ve Kukurbitasin I’nın uygulandığı meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) MTT testlerimizdeki sonuçlarımıza göre (Şekil 4.4-9); bu maddelerin kanser hücrelerinde antiproliferatif etki göstererek hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği görüldü. Tedavi olarak kullandığımız *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I her iki hücre hattını da doza ve zamana bağımlı inhibisyon yönünden etki etmesi, bu maddelerin meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliğini güçlü kılmaktadır. Güncel literatürdeki çalışmalar, *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I’nın antiproliferatif etkisinin varlığını destekler niteliktedir (Jayaprakasam vd., 2003; Sayed vd., 2012; Bohlooli vd., 2012; Imen vd., 2015).

Kukurbitasin I, *E.elaterium* meyve suyu ve kloroform ekstraktının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre göç yeteneğine etkisini gözlemleyebilmek için Wound Healing testi analizleri yapıldı. MCF-7 hücreleri Kukurbitasin I’nın 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi (Şekil 4.10-11). Kontrol grubunun (tedavi edilmeyen) yarık aralığı 0. saatte 226 μm iken 36. saatte 62 μm olarak ölçüldü. Kukurbitasin I’nın 400 nM konsantrasyonu ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı 222 μm ’den 36. saatte 267 μm ’ye yükseldi. Kontrol grubumuzun yarık aralığı 36. saatte %72,57 kapanırken, 400 nM konsantrasyon Kukurbitasin I tedavisi sonucu yarık aralığı %16,85 açıldı.

MDA-MB-231 hücreleri Kukurbitasin I’nın 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi (Şekil 4.16-17). Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 210 μm iken 36. saatte 46 μm olarak ölçüldü. Kukurbitasin I (400 nM) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 209 μm ’den 36. saatte 240 μm ’ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %78,10 kapanırken, Kukurbitasin I tedavisi sonucu yarık aralığı %12,92 açıldı.

MCF-7 hücreleri *E.elaterium* meyve suyunun 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi. Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 271 μm iken 36. saatte 86 μm olarak ölçüldü (Şekil 4.12-13). *E.elaterium* meyve suyu (10 mg/mL) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı 213 μm 'den 36. saatte 257 μm 'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %68,27 kapanırken, *E.elaterium* meyve suyu (10 mg/mL) ile tedavisi sonucu yarık aralığı %17,12 açıldı.

MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un meyve suyu 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi (Şekil 4.18-19). Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 207 μm iken 36. saatte 72 μm olarak ölçüldü. *E.elaterium* meyve suyu (10 mg/mL) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 263 μm 'den 36. saatte 336 μm 'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %65,22 kapanırken, *E.elaterium* meyve suyu (10 mg/mL) tedavisi sonucu yarık aralığı %21,73 açıldı.

MCF-7 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi (Şekil 4.14-15). Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 209 μm iken 36. saatte 56 μm olarak ölçüldü. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı (0,1 mg/mL) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde ise yarık aralığı 234 μm 'den 36. saatte 326 μm 'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %73,21 kapanırken, *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı ile tedavisi sonucu yarık aralığı %28,22 açıldı.

MDA-MB-231 hücreleri *E.elaterium*'un kloroform ekstraktının 4 farklı konsantrasyonu ile tedavi edildi (Şekil 4.20-21). Kontrol grubunun yarık aralığı 0. saatte 228 μm iken 36. saatte 19 μm olarak ölçüldü. *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı (0,1 mg/mL) ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde ise yarık aralığı 226 μm 'den 36. saatte 277 μm 'ye yükseldi. Kontrol grubunun yarık aralığı 36. saatte %91,67 kapanırken, *E.elaterium*'un kloroform ekstraktı (0,1 mg/mL) tedavisi sonucu yarık aralığı %18,42 açıldı.

Her iki kanser hücre hattı ile yapılan Wound Healing testlerinden elde edilen sonuçlara göre 36. saat verilerine göre (Şekil 4.10-21) kontrol gruplarında hücre göçü devam ederken, *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I ile tedavi sonucu hücre göçü yeteneğinin belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Kanser hücrelerinde yeni damar oluşumu sürecindeki basamaklardan biri de hücrelerin aktivasyonu, profilasyonu ve göçüdür. Kullandığımız maddelerin antiproliferatif etkisi MTT testiyle gösterilmiştir. Wound Healing testlerinden de hücre göçünü önemli ölçüde engellediği görülmektedir. Bu durum hem anjiyogenezi

hem de anjiyogenezin neden olduğu metastazı engellemesi aynı zamanda bu maddelerin anti-metastatik etkiye sahip olduklarını da göstermektedir.

Koloni Formasyon testinden elde edilen veriler (Şekil 4.22-27), MTT test sonuçlarını doğrulamaktadır. *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I ile tedavilerde belli bir dozdan sonra her iki kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneklerinin tamamen yok olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde, koloni oluşturma yeteneği de metastaz yapma kabiliyeti olarak ifade edilmektedir (pamukkale.edu.tr, 2015). Bu ifadeye göre; *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I ile tedavi metastazı da engellediği açıkça söylenebilir.

Kanser hücreleri kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine ulaşıp söz konusu bölgelerde hücre kolonileri oluşturup ve büyümeye devam etmektedirler. *E.elaterium* meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I ile koloni oluşturma yeteneklerinin yok edilmesi, bu maddelerin hücre kolonilerinin oluşumunu engellediğini, oluşan tümörlerin büyümesini yavaşlattığını ve durdurduğunu (antitümör etki) göstermektedir.

Her iki hücre hattında da (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücre morfolojilerinin görüntüleri alınarak analizi yapıldı (Şekil 4.28-33). Kontrol gruplarında hücreler normal büyümelerine devam edip bölünüp çoğalırken yani hücre morfolojilerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, tedavi uygulanan hücrelerde ise hücre morfolojilerinde bozulma, hücrelerin küçülmesi ve hücre ölümlerinin gerçekleştiği belirgin bir şekilde görüldü.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kukurbitasin I ve *E.elaterium* ekstraktıyla kanser üzerine yapılan çalışmaların kısıtlı olması nedeniyle başlatılan bu çalışmadan elde edilen anlamlı sonuçlar bu bitki ekstraktı üzerine yapılacak çalışmaların genişletilebileceğini göstermiştir. Meme kanserinin ülkemizde sık görülmesi ve tedavi sürecinde yeni yolların aranması nedeni ile bu kanser üzerinde durulan çalışmada, meme kanseri hücrelerinde *E.elaterium* ekstraktının belli dozlarının hücreleri ölüme götürdüğü belirlenmiştir.

E.elaterium meyve suyunun çok zehirli (terapötik doz aralığı dar olduğundan) olabileceği bilinmektedir. Tabiki yapılacak çalışmalarda terapötik doz aralığının tespiti gerekecektir. Burada daha çok Kukurbitasinler üzerinde durularak tek molekül yapının hücre içine girmesini kolaylaştıracak yollar aranmalıdır. Bilinen bir gerçek Kukurbitasin I doğal bir STAT3 inhibitörüdür. Bu şekilde bundan faydalanmak amacı ile hangi taşıyıcı maddenin hücre içine girişi kolaylaştırarak etkiyi ne düzeyde artıracığı çalışmalarına yoğunlaşılabilir. Birkaç çalışmada bu molekülün liposom ile çevrilmesi hücre içine girişi kolaylaştırarak sitotoksisiteyi artırdığı belirtilmiştir. Daha değişik taşıyıcılar tespit edilerek optimal düzeyde etkiye bu doğal STAT3 inhibitörü ile ulaşılabilir. Sonrasında *in vivo* çalışmalarla taşıyıcının etkisi daha belirgin olarak tespit edilebilir.

Bu *in vitro* çalışmadan elde edilen Kukurbitasin I'nın veya *E.elaterium* meyve suyu ve kloroform ekstraktında bulunan fakat isimlendirilemeyen moleküllerin meme kanseri tedavisinde daha etkili olabilme ihtimali mevcut bulunmaktadır. Bununla ilgili yapılacak çalışmalardan büyük bir oranda pozitif sonuçlar elde edilmesi mümkün görünmektedir. Kukurbitasin I'nın ilerleyen çalışmalarda kemoterapötiklerle birlikte kullanılmasıyla kemoterapi dozunun azalmasına yol açacağına dair çalışmalar yapılabilir ve böylece hastalarda kemoterapi yan etkisi azaltılarak yaşam kalitesi artırılabilir.

E.elaterium meyve suyu, kloroform ekstraktı ve Kukurbitasin I'nın MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına farklı oranlarda etki etmesinin sebebi araştırılarak etki mekanizması aydınlatılabilir.

Bu çalışmanın meme kanseri tedavisinde ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesinde yol gösterici ve diğer kanser türleri için de benzer araştırmaların yapılmasına vesile olarak, etkin tedavi protokollerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağını ümit ediyoruz.

7. KAYNAKLAR

- Akdemir N., Birol L. (2003). *İç hastalıkları ve hemşirelik bakımı*, 1. Baskı, Vehbi Koç Vakfı, İstanbul, 170 p.
- Alghasham, A.A. (2013). Cucurbitacins a promising target for cancer therapy. *Int J of Health Sci.* **7(11)**, 68-79.
- Almeida, F.R.C., Rao, V.S.N., Matos, M.E.O. (1992). Anti-inflammatory, antitumour and antifertility effects in rodents of two nor-cucurbitacin glucosides from *Wilbrandia* species. *Phytother Res*, **6**, 189-93.
- American Cancer Society of Clinical Oncology, *Cancer Facts & Figures* (2015). <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>, (Erişim Tarihi: 22 Kasım 2015).
- American Cancer Society of Clinical Oncology, *Breast Cancer Facts & Figures* (2012). <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@acspc-044552.pdf>, (Erişim Tarihi: 08 Aralık 2015).
- Anait, S.L., Craig, J. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* **57**, 3071-78.
- Atasü, E., Cihangir, V. (1985). *Ecballium elaterium* L. bitkisinin farmakognozide yeri. *Pharm.- JTPA*, **25:55**, 391-95.
- Atay S. (2014). *İnvaziv meme kanseri hücresi tayini için kuvarskristal mikroterazi sensörlerin hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Baba, Al., Cătoi, C. (2007). *Principles of Anticancer Therapy in Comparative Oncology*. Romania: The Publishing House of the Romanian Academy, Chapter 19.
- Baytop, T. (1984). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi*. İst. Üni. yayını No. 3255. İstanbul, 173 p.
- Biglia, N., Defabiani, E., Ponzzone, R., Mariani, L., Marengo, D., Sismondi, P. (2004). Management of risk of breast carcinoma in postmenopausal women. *Endocr Relat Cancer.* **11**, 69-83.
- Bilge Z. (2010). *Kanserli hastaların tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerini kullanımı*. Uzmanlık tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Bisognin, D. (2002). *Origin and Evolution of Cultivated Cucurbits*. *Ciência Rural*, Santa Maria, **32(4)**, 715-23 p.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebtı, S.M. (2003). Discovery of JSI-124 (Cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* **63**, 1270-79.
- Bohlooli, S., Jafari, N., Jahed, S. (2012). Cytotoxic effect of freeze-dried extract of *Ecballium elaterium* fruit on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *J. Gastrointest Cancer.* **43(4)**, 579-83.

- Can, G. (2012). *Kronik Hastalıklar ve Bakım*. 1. Baskı. Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, 539-43 p.
- Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R.L. Cordell, G.A., Qiu, S.X., (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep.* **22**, 386-99.
- Cho-Rong, S., Dong, K.Y., No-Joon, S., Ui, J.Y., A-Ryeong, G., Dong-Gyu, J., Jae, Y.C., Keejung, Y., Jee-Yin, A., Chu, W.N., Woo, J.P., Seung, Y.Y., Kye, W.P. (2014). Cucurbitacin B and cucurbitacin I suppress adipocyte differentiation through inhibition of STAT3 signaling. *Food Chem Toxicol.* **64**, 217-24.
- Clericuzio, M., Mella M., Vita-Finzi P., Zem M., Vidari G. (2004). Cucurbitane triterpenoids from *Leucopaxillus gentianeus*. **67**, 1823-28.
- Cooper, M.G., Hausman, R.E. (2006). *Hücre moleküler yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 633-67 p.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med.* **358**, 502-11.
- Dedeoğlu B. (2014). *Kanserli hastaların tamamlayıcı ve alternatif tedavileri kullanım durumları ve etkileyen faktörler*. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Dhannikula, A.B, Panchagnula, R., (1999). Localized Paclitaxel Delivery. *Int J Pharm.* **183**, 85-100.
- Dinan, L., Whiting, P., Girault, J.P., Lafont, R., Mugat, B. (1997). Cucurbitane-type compounds from *Hemsleya carnosiflora* antagonize ecdysteroid action in the *Drosophila melanogaster* BII cell line. *Biochem J.* **53** (3), 271-74.
- Duursma, A.M. and Agami, R. (2003). Ras interference as cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, **13**, 267-73.
- Eisen, A., Lubinski, J., Klijn, J., Moller, P., Lynch, H. T., Offit, K., Weber, B.,Rebbeck, T., Neuhausen, S. L., Ghadirian, P., Foulkes, W. D., Gershoni-Baruch, R., Friedman, E, Rennert, G, Wagner T, Isaacs C, Kim-Sing C, Ainsworth P, Sun P, Narod SA. (2005). Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol.* **30**, 7491-96.
- Ekici, M., Satılmış, A., Ay, Y.D., Dülger, B., Yer, H.M. (1998). *Ecballium elaterium* L. Meyvelerinin Sinüzite Karşı Kullanımı. *Çev. Kor.* **727**, 24-25.
- Eyol E. (2014). Kukurbitasin I'nın anti kanserojen etkisinin karaciğere metastaz yapmış CC531 rat modelinde araştırılması. Proje no: 112S327, Ankara, TÜBİTAK.
- Eyol, E., Murtaga, A., Zhivkova, G.M., Georges, R., Zepp, M., Djandji, D., Kleeff, J., Berger, M.R., Adwan, H. (2012). Few genes are associated with the capability of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to grow in the liver of nude rats. *Oncol Rep.* **28**(6), 2177-87.
- Farber, E. (1984). The multi-step nature of cancer development. *Cancer Res.* **44**, 4217-23.

- Feng, H., Zang, L., Zhao, Z.X., Kan Q.C. (2014). Cucurbitacin-E inhibits multiple cancer cells proliferation through attenuation of Wnt/ β -catenin signaling. *Cancer Biother Radiopharm.* **29**, 210-14.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.H., Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* **347(16)**, 1233-41.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Seminars in Oncology.* **29**, 15–18.
- Gao, Y, Islam, M.S., Tian, J., Lui, V.W., Xiao, D. (2014). Inactivation of ATP citrate lyase by Cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer in A549 lung cancer cells. *Mol Med Rep.* **10**, 2905-11.
- Geçici N. (2013). *Kemoterapi alan opere meme kanseri hastalarında karakter ve mizaç özelliklerinin semptomlar ve yaşam kalitesi ile ilişkisi.* Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Globocan 2012 Estimated Cancer. Incidence Mortality and Prevalence Worldwide (2012). <http://globocan.iarc.fr>. (Erişim Tarihi: 13 Haziran 2015).
- Guang, Y., Shao-Feng, Y., Hao, X., Ping, Z., Jin-Tang, S., Gang, L. (2014). Cucurbitacin I induces protective autophagy in glioblastoma *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1-24.
- Gültekin H. (2012). *Türkiye’de alternatif tedavi yaklaşımında kullanılan bitkisel ürünlerin toksikolojik açıdan değerlendirilmesi.* Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Hsu, H.S., Pin-I, H., Yuh-Lih, C., Ching, T., Yi-Wei, C., Hsin-Chin, S., Shih-Chieh, H., Yu-Chih, C., Ling-Ming, T. and Shih-Hwa, C. (2011). Cucurbitacin I inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in non-small cell lung cancer-derived CD133-positive cells. *Cancer.* 2970-85.
- <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/dundar-okan-yillar/KanserKemoterapisi.pdf>, (Erişim Tarihi: 22 Ekim 2015).
- <http://kutuphane.pamukkale.edu.tr/katalog/0057978.pdf>, (Erişim Tarihi: 15 Eylül 2015).
- <http://nccam.nih.gov/health/whatiscaam>, (Erişim Tarihi: 12 Nisan 2015).
- <http://saglik.zararlari.com/kanser-turleri-ve-zararlari.html>, (Erişim Tarihi: 15 Haziran 2015).
- <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/index?ssSourceSiteId=null>, (Erişim Tarihi: 08 Nisan 2015).
- <http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/AKR-201-gfp-mda-231-cell-line.pdf>, (Erişim Tarihi: 22 Temmuz 2015).
- http://www.drozon.com/meme_kanseri.html, (Erişim Tarihi: 04 Nisan 2015).
- <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/kanser-istatistikleri.html>, (Erişim Tarihi: 08 Nisan 2015).
- <http://www.tocris.com/dispprod.php>, (Erişim Tarihi: 17 Haziran 2015).

- Inzucchi, S.E. and Kinder, B.K. (2005). Endocrine Emergencies: Hypoglycemic and Hyperglycemic Crises. (pp: 789-799) In: Kebebew O.H. C.-Y.D., *Textbook of Endocrine Surgery*, Second Edition, Philadelphia.
- Imen, T., Olfa, K., Boulila, A., Saloua, F., Naziha, M., José, L., Belgacem, H. (2015). *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. seed oil: chemical composition and antiproliferative effect on human colonic adenocarcinoma and fibrosarcoma cancer cell lines. *Arab. J. of Chem.* article in press.
- Ishdorj, G., Johnston, J.B., Gibson, S.B. (2010). Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcubitacin-I (JSI-124) sensitized human b-leukemia cells to apoptosis. *Mol Cancer Ther.* **9**, 3302-14.
- Ishdorj, G., Johnston, J.B., Gibson, S.B. (2011). Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B Leukemic Cells. *BMC Cancer.* **11**, 268.
- Ismail-Khan, R., Bui, M.M. (2010). A review of triple-negative breast cancer, *Cancer Control.* **17**, 173-76.
- Jayaprakasam, B., Navindra, P.S., Muraleedharan, G.N. (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett.* **189**, 11–16.
- Jin, K.H., Park, J.H.Y, Jin-Kyung, K. (2014). Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. *Chem-Biol Interact.* **219**, 1–8.
- Jung, S.H., Youn-Kyung, L., Hyun-Ju, L., Nu-Ri, C., Manh-Cuong, V., My-Dung, H., Mi-Seon, L., Nguyen, P., Hyeoung-Joon, K., and Je-Jung, L. (2014). Dendritic cells loaded with myeloma cells pretreated with a combination of JSI-124 and bortezomib generate potent myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes *in vitro*. *Exp Hematol.* **42**, 274–81.
- Kaleağasıoğlu, F., Berger, M.R. (2014). Differential effects of erufosine on proliferation, wound healing and apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Oncol Rep.* **31(3)**, 1407-16.
- Kelsey, J. L., Gammon, M. D., John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev.* **15**, 36-47.
- Kılıçaslan M.(2012). *Akciğer kanseri hastalarında tamamlayıcı-alternatif tedavi kullanımı*. Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Kim, H.J. and Kim J.K. (2015). Antiangiogenic effects of Cucurbitacin-I. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 290-98.
- Kim, S.R., Seo, H.S., Choi, H.S., Cho, S.G., Kim, Y.K., Hong, E.H. (2013). *Trichosanthes kirilowii* ethanol extract and Cucurbitacin D inhibit cell growth and induce apoptosis through inhibition of STAT3 activity in breast cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1-9.
- Knecht, D.A., LaFleur R.A., Alem W.K., Christian, E.A., Beshir, B.A, Fenteany, G. (2010). Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. *Plos One.* **5(11)**, 1-11.

- Kong, Y., Chen, J., Zhou, Z., Xia, H., Qiu, M.H., Chen, C. (2014). Cucurbitacin E induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer. *Plos One*. **9**, 1-8.
- Lee, D.H., Iwanski, G.B., Thoennissen, N.H. (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *The Scencitifc Would J*. **10**, 413-418.
- Liu, T., Zhang, M, Zhang, H, Sun, C, Deng, Y. (2008). Inhibitory effects of cucurbitacin B onlaryngeal squamous cell carcinoma. *J Nat Pro*. **265 (10)**, 1225-32.
- Lodish, H., Berk A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*. W.H Freeman and Company, New York, 5th Edition, 935-941 p.
- Ma, J, Zi, J.Y, Shi, H., Mi, C., Li, J., Xing N.J. (2014). Cucurbitacin B inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *Eur J Pharmacol*. **723**, 46-54.
- MacMahon, B., Trichopoulos, D., Brown, J., Andersen, A.P., Aoki, K., Cole, P., Waard, F., Kauraniemi, T., Morgan, R.W., Purde, M., Ravnihar, B., Stromby, N., Westlund, K., Woo, N.C. (1982). Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer*. **29**, 13-16.
- Martin, A.M., Weber, B.L. (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J. of the National Cncr Insti*. **92**, 1126-1135.
- McTiernan, A. (2000). Physical activity and the prevention of breast cancer. *Medscape Womens Health*. **5**, 5.
- Memişoğlu M. (2005). *Ecballium elaterium bitkisinde hücre süspansiyon kültürü tekniği ile sekonder metabolit (Kukurbitasin B) üretimi*. Gazi Üniversitesi, Doktora tezi, Ankara.
- Newcomb, P.A., Storer, B.E., Longnecker, M.P., Mittendorf, R., Greenberg, E.R., Clapp, R.W., Burke, K.P., Willett, W.C., MacMahon B. (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. **330**, 81-87.
- Ogden, J. (2004). *Health psychology: A Textbook*. Open University Press, Bershire.
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L.F.P., Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An Acad Bras Cienc*. **79(4)**, 593-616.
- Özmen, V. (2008). Dünyada ve Türkiye’de Meme Kanseri. *Meme Sağlığı Dergisi*. **4**, 6–12.
- Pitot, H.C., Goldsworthy, T.L., Moran, S. (1981). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J Supramol Str Cell*. **17 (2)**, 133-46.
- Ren, Y., Kun, Y., Su'an, S., Zhi, L., Jin, Y., Xue, D.H., Jianhua, S. ve Linyin, Z. (2014). JSI124 inhibits breast cancer cell growth by suppressing the function of B cells via the downregulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Oncology Lett*. **8**, 928-32.
- Robinson M., Zhang X. (2011). *The world medicines situation traditional medicines: global situation*. WHO Press, Issues and Challenge, Geneva.

- Rohan, T.E., Howe, G.R., Friedenreich, C.M., Jain, M., Miller, A.B. (1993). Dietary fiber, vitamins A, C, and E, and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control*. **4**, 29-37.
- Sayed, Z.I.E., Badr, W.H. (2012). Cucurbitacin glucosides and biological activities of the ethyl acetate fraction from ethanolic extract of egyptian *Ecballium elaterium*. *J. of App. Sci. Res.* **8(2)**, 1252-1258.
- Sayhan E.S., (2013). *Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne 2007-2011 yılları arasında başvuran meme kanseri tanılı hastaların değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Schindler, C., Darnell J.E.J. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.
- Scholzova, E., Malik, R., Sevcik, J., Kleibl, Z. (2007). RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett.* **246**, 12-23.
- Sledge, G.W. (1996). Adjuvant therapy for early stage breast cancer. *Semin Oncol.* **23**, 51-54.
- Somunoğlu, S. (2009). Meme kanseri belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi.* **6**, 69-73.
- Suwit, D., Sumana, D., Weena, J., Apichar, S., Duncan, R.S., Pimpicha, P. (2010). Antiproliferative Effects of Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Down-Regulation of the c-Myc/hTERT/Telomerase Pathway and Obstruction of the Cell Cycle. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 5323-38.
- Tankışı D., (2007). *Kanserli hastalarda hastalığa bağlı atıflar ve alternatif tedaviler*. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Tekedereli, I, Alpay, S.N., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, H.D., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G., Ozpolat, B. (2013). Therapeutic silencing of Bcl-2 by systemically administered siRNA nanotherapeutics inhibits tum or growth by autophagy and apoptosis and enhances the efficacy of chemotherapy in orthotopic Xenograft models of ER (-) and ER (+) breast cancer. *Mol Ter Nucleic Acids.* **2 (6)**
- Trosko, J.E., Chang, C.C., Madhukar B.V., Dupont E. (1996). Intercellular communication: A paradigm for the interpretation of the initiation/promotion/progress model of carcinogenesis, In: Arcos, J. C. Editor, "Chemical Induction of Cancer: Modulation and Combination Effects", Birkhauser, Boston, Massachusetts.
- Tseng, L., Pin-I, H., Yu-Rung, C., Yu-Chih, C., Yueh-Ching, C., Yi-Wei, C., Yuh-Lih, C., Han-Shui, H., Yuan-Tzu, L., Kuan-Hsuan, C., Chin-Wen, C., Shih-Hwa, C., De-Ming, Y., Chen-Hsen, L. (2012). Targeting STAT3 pathway by cucurbitacin I diminishes self-renewaling and radiochemoresistant abilities in thyroid cancer-derived CD133+ cells. *JPET.* 1-45.
- Vatansev H. (2014). *Timokinon'un Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi*. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., Aguilar, M., Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med.* **347(16)**, 1227-32.

- Wakimoto, N., Yin, D., O'Kelly, J., Haritunians, T., Karlan, B., Said, J., Xing, H., Koeffler, H. (2008). Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci.* **99(9)**, 1793-97.
- Wong, C.M., Ng, I.O. (2007). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 160-74.
- Yeşilada, E., Tanaka, S., Tabata, M., Sezik E. (1989). Antiinflammatory effects of the fruit juice of *Ecballium elaterium* on Edem as in mice. *Phytotherapy Res.* **3(2)**, 75-76.
- Zhang, M., Bian, Z.G., Zhang, Y., Wang, J.H., Kan, L., Wang, X. (2014). Cucurbitacin B inhibits proliferation and induces apoptosis via STAT3 pathway inhibition growth. *Cancer Lett.* **349**, 15-25.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Kadir YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Akçadağ/ 01.01.1979

Adres: İnönü Üniversitesi, Kimya Bölümü 44280, Malatya

E-Posta: kadir3399@gmail.com

Lisans: Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü (1997-2001)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
(2007-2010)

Katıldığı Seminerler, Eğitimler ve Çalıştaylar:

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası”, T.C. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Deney Hayvanları Etik Kurulu, 21-29 Ocak 2015, Malatya.

Kongre, Sempozyum ve Konferanslar

1- Kadir Yılmaz, Fuat Karakuş, Emir Tosun and Ergül Eyol. 1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, “Growth inhibitory effects of Cucurbitacin I on breast cancer cells”, PP12, İstanbul, 2015.

2- Fuat Karakuş, Emir Tosun, **Kadir Yılmaz**, Ergül Eyol. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD2015), “Effect Of Acetazolamide On Colon Cancer Cells”, P51, Eskişehir, 2015.

3- Fuat Karakuş, Emir Tosun, **Kadir Yılmaz** and Ergül Eyol. 1st International Gazi Pharma Symposium Series, “Cytotoxic Effect of Cape on Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells”, P65, Antalya, 2015.

4- Sina İçen, Fuat Karakuş, Emir Tosun, **Kadir Yılmaz**. 1st International Gazi Pharma Symposium Series, “Antiproliferative Potential of *Pistacia terebinthus* L. on Breast Cancer Cell Lines”, P111, Antalya, 2015.