T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE SONUÇ RAPORU

KANSER HÜCRE HATTINDA MESPİLUS GERMANİCA BİTKİSİNİN APOKTOTİK YOLAK VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ



Proje No: TYD-2021-9330

Proje Türü **: Kariyer geliştirme**

Proje Yürütücüsü:

Dr. Öğr. Ü. Gül GÖRMEZ — **Sağlık Bilimleri Fakültesi/Beslenme ve Diyetetik Bölümü**

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Veysel YÜKSEK — **Van YYÜ Özalp Meslek Yüksek Okulu**

Prof. Dr. Semiha DEDE — **Van YYÜ Veterinerlik Fakültesi/Veteriner Hekimliği Temel Bilimler Bölümü**

Prof. Dr. Selçuk GÜMÜŞ — **Bartın Üniversitesi Mühendislik, Mimarlık ve Tasarım Fakültesi/Temel Birimler Bölümü**

Ocak 2023
Van

ÖNSÖZ

Bitkiler binlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal ilaçlardır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal florada bulunan bitkilerin halk arasında tedavi amaçlı, gıda, çay, baharat, boya, insektisit, hayvan hastalıklarının tedavisi, reçine, zamk, meşrubat ve kozmetik sanayinde kullanımı uzun yıllardan beri süre gelen geleneksel kültürel zenginliğimizin bir parçası olmuştur. Binlerce yıldır, tedavi edilemeyen bir hastalık olan kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2020 yılında yaklaşık 10 milyon insanın ölüm nedeni olmuştur. Kanser tedavisinde kullanılan sentetik kemoterapi ilaçlarının neden olduğu yan etkiler nedeniyle bilim dünyası doğal ürünler üzerine yapılan çalışmalara yönelmiştir. *Mespilus germanica* bitkisi, yüz yıllardır Anadolu topraklarında meyve olarak tüketildiği gibi halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Literatürde *Mespilus germanica* bitkisinin kanser üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Başkanlığı' nın desteklediği bu çalışmayla *Mespilus germanica* bitkisinin yaprakları ve meyvelerinin akciğer ve meme kanseri hücre hatları üzerine etkileri araştırılmıştır. Kanserleşmenin en büyük nedenlerinden biri, hücrenin apoptoz ve nekroza gidemeyerek, kontrolsüzce çoğalması ve tümör oluşumudur. *Mespilus germanica* bitkisinin Temmuz ayında toplanan yapraklarından elde edilen fraksiyonlu ekstraktın, akciğer kanseri ve meme kanseri hücre serilerinde tümör oluşumunu engelleyen apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyonlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Hücrelerin apoptoz ve nekroza kontrollü şekilde gitmesi kanseri engelleyebilecek bir faaliyettir. Yapılan bu çalışmayla ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip bu ekstraktın, kanser tedavisinde kullanım ihtimali araştırılarak ilaç olarak kullanılabilmesi için birinci faz *in vitro* çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. Van YYÜ BAP birimi tarafından desteklenen bu proje sonucunda elde edilen olumlu sonuçların yapılacak olan makalelerle bilim dünyasına sunulması planlanmaktadır. Farklı büyüme dönemlerine ait yaprak ekstraktlarıyla yaptığımız bu detaylı çalışmadan elde ettiğimiz olumlu sonuçların, kanser üzerine çalışma yapan tüm bilim insanları için aydınlatıcı ve yol gösterici olacağı düşüncesindeyiz. Çalışmamızın gerçekleşmesi için maddi destekte bulunan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Dr. Öğr. Ü. Gül Görmez

Ocak 2023

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYD-2021-9330 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....
İÇİNDEKİLER .....
TABLOLAR LİSTESİ .....
ŞEKİLLER LİSTESİ .....
ÖZET .....
ABSTRACT .....
1. GİRİŞ .....
2. GENEL BİLGİLER .....
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....
3.1. Gereç .....
3.2. Yöntem .....
4. BULGULAR .....
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....
KAYNAKLAR .....
EKLER .....
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi .....

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. HPLC analiz şartları

Tablo 2. Hedef genlere ait primer sekans dizilimi

Tablo 3. Reaksiyon şartları

Tablo 4. HPLC analizinde tespit edilen fenolik asit miktarları

Tablo 5. Ekstrakt uygulaması sonucunda ATG3, ATG5, ve RPK1 genlerinin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

Tablo 6. Ekstrakt uygulaması sonucunda apoptotik genlerin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

Tablo 7. Ekstrakt uygulaması sonucunda DNA tamir genlerinin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. HPLC analizinde kullanılan standartların geliş 280 nm dalga boyunda pikleri

Şekil 2. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt uygulanması sonucu A549 hücresine ait MTT canlılık testi sonucu elde edilen Exel Eğim grafiği

Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt uygulanması sonucu MCF-7 hücrelerisine ait MTT canlılık testi sonucu elde edilen Exel Eğim grafiği

ÖZET

Bu çalışmada *Mespilus germanica* (muşmula) ekstraktının, MCF7 meme ve A549 akciğer kanseri hücre serileri kullanılarak, anti-kanser özelliği ve güvenirliğinin değerlendirilmesi amacıyla tedavi edici ajan veya ilaç etken maddesi olma potansiyeli *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Mespilus germanica bitkisinin yaprakları, haziran, temmuz ve ekim aylarında toplanarak farklı polaritelere sahip çeşitli solventlerle işlemlere tabi tutularak ekstre edilmiştir. Ekstrelerin HPLC analizleri yapılarak fenolik asitleri tespit edilmiştir. Elde edilen ekstreler, akciğer ve meme kanseri hücre serileri üzerinde farklı dozlarda uygulanarak etkileri araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan hücre serileri uygun besi yerinde çoğaltıldıktan sonra, hücreye uygulanan ekstraktın proliferasyonun yarısını inhibe eden (IC_{50}) konsantrasyonun belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır. Bütün gruplarda total RNA eldesi yapılmıştır. İzole edilen mRNA'lar cDNA'ya dönüştürüldükten sonra, RealTime-PCR'da gen ekspresyon paternleri saptanmıştır. Otofajik ve nekretotik ölüm yollaklarında majör genler olan ATG5, ATG3 ve RIPK1, apoptotik yolakda yer alan kaspaz enzim sistemlerine ait genlerden BCL2, BAX, Apaf1, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 ile DNA hasar belirteci TP53 ve PARP-1 geninin transkripsiyon düzeyleri belirlenmiştir. Ekpsresyon analizlerinde kontrol geni olarak Aktin Beta (ACTB) kullanılmıştır.

Temmuz ayına ait fraksiyonlu yaprak ekstraktının kanserli hücreler üzerinde en iyi IC_{50} konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. IC_{50} değeri, A549 hücresi için 800 µg/ml, MCF-7 hücre serisi için ise 770 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her iki hücre serisi için en düşük IC_{50} değerine ait bu ekstraktın, en yüksek proliferatif konsantrasyonu (PRO) ise, her iki hücre serisinde 100 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Buna göre kontrol grubuna göre IC_{50} uygulanan her iki hücre serinde de ATG3, ATG5 (otofaji yolak genleri) ve RIPK1(nekrozis yolak geni)'nde artış ($p < 0.05$) meydana gelmiştir. Ekstrakt, A549 hücre serisinde; Apaf-1, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeylerini kontrol grubuna göre önemli miktarda arttırmıştır ($p < 0.05$). MCF-7 hücre serisinde ise antiapoptotik bir enzim olan BLC2 geninde önemli bir artış meydana gelirken ($p<0.05$), apoptotik enzimler olan BAX, Apaf-1 ve kaspaz enzim sisteminin majör genleri olan kaspaz-8, 9 ve 3'de de önemli artış meydana getirmiştir ($p < 0.05$).

Kanserleşmenin en büyük nedenlerinden biri, hücrenin apoptoz ve nekroza gidemeyerek, kontrolsüzce çoğalması ve tümör oluşumudur. *Mespilus germanica* bitkisinin Temmuz

ayında toplanan yapraklarından elde edilen fraksiyonlu ekstraktın, akciğer kanseri ve meme kanseri hücre serilerinde tümör oluşumunu engelleyen apoptotik ve nekrotik genlerin ekspresyonlarını arttırdığı tespit edilmiştir. Hücrelerin apoptoz ve nekroza kontrollü şekilde gitmesi kanseri engelleyebilecek bir faaliyettir. Yapılan bu çalışmayla ilaç etken maddesi olma potansiyeline sahip bu formülasyonun kanser tedavisinde kullanım ihtimali *in vitro* şartlarda araştırılarak ilaç olarak kullanılabilmesi için birinci faz *in vitro* çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. Van YYÜ BAP birimi tarafından desteklenen bu proje sonucunda elde edilen olumlu sonuçların yapılacak olan makalelerle bilim dünyasına sunulması planlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Mespilus germanica, tıbbi bitki, kanser hücre hatları, hücre ölüm yolak genleri

ABSTRACT

In this study, the potential of Mespilus germanica (medlar) extract as a therapeutic agent or drug substance was investigated in vitro to evaluate its anti-cancer properties and safety by using MCF7 breast and A549 lung cancer cell lines.

The leaves of the Mespilus germanica plant were collected in June, July and October and extracted by treating them with various solvents of different polarities. The phenolic acids of the extracts were determined by HPLC analysis. The obtained extracts were applied at different doses on lung and breast cancer cell lines and their effects were investigated. After the cell lines used in the study were propagated in the appropriate medium, the MTT test was applied to determine the concentration of the extract applied to the cell, which inhibited half of the proliferation (IC50). Total RNA was obtained in all groups. After the isolated mRNAs were converted to cDNA, gene expression patterns were determined in RealTime-PCR. Transcription levels of ATG5, ATG3 and RIPK1, which are major genes in autophagic and necrototic death pathways, BCL2, BAX, Apaf1, caspase-8, caspase-9, caspase-3 and caspase-7 genes belonging to caspase enzyme systems in apoptotic pathway and DNA damage marker TP53 and PARP1 genes were determined. Actin Beta (ACTB) was used as a control gene in expression analysis.

It was determined that the fractionated leaf extract of July had the best IC50 concentration on cancer cells. The IC50 value was determined as 800 µg/ml for the A549 cell and 770 µg/ml for the MCF-7 cell line. In addition, the highest proliferative concentration (PRO) of this extract, which belongs to the lowest IC50 value for both cell lines, was determined as 100 µg/ml in both cell lines. Accordingly, there was an increase ($p < 0.05$) in ATG3, ATG5 (autophagy pathway genes) and RIPK1 (necrosis pathway gene) in both cell lines that were applied IC50 compared to the control group.

The extract significantly increased the mRNA levels of Apaf-1, caspase-8 and caspase-9 genes in the A549 cell line compared to the control group ($p < 0.05$). In MCF-7 cell line, there was a significant increase in the antiapoptotic enzyme BLC2 gene ($p<0.05$), while there was a significant increase in the apoptotic enzymes BAX, Apaf-1 and caspase-8, 9 and 3, which are the major genes of the caspase enzyme system ($p < 0.05$).

One of the biggest causes of cancer is the uncontrolled proliferation of the cell and tumor formation by not being able to go to apoptosis and necrosis. It was determined that the fractionated extract obtained from the leaves of Mespilus germanica plant collected in July increased the expression of apoptotic and necrotic genes that prevent tumor formation in lung cancer and breast cancer cell lines. Controlled apoptosis and necrosis of cells is an activity that can prevent cancer. With this study, the possibility of using this formulation, which has the potential to be a drug active ingredient, in cancer treatment was investigated in vitro, and the first phase in vitro studies were successfully completed in order to use it as a drug. It is planned that the positive results obtained as a result of this project, supported by the Van YYU BAP unit, will be presented to the scientific world with the articles to be published.

Key words: : Mespilus germanica, medicinal plant, cancer cell lines, cell death pathway genes

1. GİRİŞ

Halk arasında bitkilerin gıda, tedavi veya destekleyici amaçlı kullanımı oldukça yaygındır. Zencefil, ekinezya, zerdeçal vb. bitkiler bu amaçla kullanılmaya yöresel bazda başlanmış ve daha sonra dünya çapında kullanımı yaygınlaşmış bitkilerden bazılarıdır. Bitkiler içermiş oldukları sekonder metabolitler sayesinde çeşitli hastalıkların tedavisinde etki göstermektedir. Fenolik bileşikler; antioksidan aktivite ve serbest radikalleri süpürme, kanser metabolizmasının modülasyonu; apoptozun indüksiyonu; immünomodülatör etki, antiaterosklerоz; nöroprotektif; antibakteriyel, antiviral ve daha birçok özellik gösteren önemli bir bitki sekonder metabolit grubudur. Bu çalışma; zengin mineral ve fenolik içeriği ile meyve olarak tüketildiği gibi, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan Mespilus *germanica* ekstraktının, anti-kanser özelliğinin ve güvenirliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla *Mespilus germanica* bitkisinin bir kısım fenolik asit kompozisyonu HPLC ile tespit edildikten sonra, iki farklı (akciğer, meme) kanserli hücre hatları kullanılarak, apoktotik yolak ve DNA hasarı üzerine etkisi ve bir tedavi edici ajan veya ilaç etken maddesi olma potansiyeli, *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Tıbbi bitkilerin tedavide kullanımları İnsanlık tarihi kadar eskidir. M.Ö.50.000 yıllarından kalan Yontma Taş devrine ait kitabeler ve arkeolojik materyaller bitkilerin tedavide kullanıldıklarına dair en eski kayıtlardır. Sümer, Akad ve Asur kitabelerinde Çin, Mısır, Hint ve Batı kaynaklı belgelerde de bitkilerden tedavi amaçlı faydalanıldığından bahsedilmektedir. M.Ö. 1500 yıllarında yazılmış Mısır Ebers Papiruslarında 450 kadar hastalığa rastlanmış, bitkisel ve hayvani kökenli ilaçların hastalıkların tedavisinde kullanıldıkları anlaşılmılştır. Mısırlılar, Mentha piperita L. (nane), Sinapis nigra L. (siyah hardal), Cassia acutifolia L. (sinameki), Papaver somniferum L. (haşhaş), Scilla maritima L. (ada soğanı), Datura stramonium L. (tatula) gibi tıbbi bitkileri kullanmışlardır. M.Ö. 1500 yıllarına ait Hitit tabletlerinde bulunan reçetelerde adamotu, alıç, arpa, buğday, safran, sarımsak gibi bitkilere rastlanmıştır (Alpınar,2010). Çin tıp tarihinde önemli bir yeri olan efsanevi Doktor Li-Shi-Chang, Pen-tsao adlı eserinde 365 bitkiyi tedavi edici özelliklerine göre oldukça etkili, kısmen etkili ve az etkili olarak sınıflandırmıştır. Hastalıkların doğa kaynaklı olduğunu düşünen Yunan hekim Hipokrat, Batı tıbbının esinlendiği Dioscorides, Galena ve Avicenna (İbn-i Sina) hastalıkları bitkilerle tedavi etmişlerdir. Özellikle Dioscorides'in (M.Ö.90-40) 600 den fazla bitki türü ile ilgili bilgileri derlediği kitabı De Materia Medica, Ortaçağ ve Rönesans boyunca Avrupa'nın en önemli referans medikal kitabı olarak kalmıştır. Günümüzde ise batı tıbbı, ürettiği birçok ilacın içine bitkisel kaynaklı hammaddeleri eklemeye devam etmektedir. Pek çok bitkisel ürün, doğal şifa kaynağı olarak organik asitler, antioksidan maddeler, polifenoller, vitaminler ve elementler gibi bazı temel bileşikleri içermektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal florada bulunan bitkilerin halk arasında tedavi amaçlı, gıda, çay, baharat, boya, insektisit, hayvan hastalıklarının tedavisi, reçine, zamk, meşrubat ve kozmetik sanayinde kullanımı uzun yıllardan beri süre gelen geleneksel kültürel zenginliğimizin bir parçası olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünya nüfusunun yaklaşık % 80'inin sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştığını bildirmektedir. Bunlardan 4.000 drog yaygın bir şekilde kullanılırken halen dünyada 2.000, Batı Avrupa'da ise 500 kadar tıbbi bitkinin ticareti yapılmaktadır. ABD'de halen ticareti yapılan bitkisel ilaçların %75'i halk arasında kullanılan bitkilerin araştırılması sonucunda elde edilmiştir (Kaya, 2011). Ayrıca, gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların yaklaşık % 25'ini bitkisel kökenli etken maddeler (vimbilastin, rezerpin, kinin, aspirin vb.) oluşturmaktadır. Bu durumda ilk çağlardan günümüze aktarılan etnobotanik bilgi ön plana çıkmakta ve şifalı bitkilerin kullanımı önem kazanmaktadır.

Özellikle 1990'lı yıllardan sonra, tıbbi bitkilerin yeni kullanım alanlarının bulunması, doğal ürünlere olan talebin artması; bu bitkilerin kullanım hacmini her geçen gün arttırmaktadır (Faydaloğlu ve Sürücüoğlu, 2011). İçinde bulunduğu coğrafik konum ve önemli gen merkezlerinin kesişme noktasında bulunması nedeniyle zengin bir bitki çeşitliliğini barındıran ülkemizde, üzerinde bilimsel çalışma yapılmamasına rağmen halk hekimliğinde kullanılan ve kimyasal içeriği gün yüzüne çıkarılmayı bekleyen onlarca bitki türü bulunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Çalışmamızda kullandığımız muşmula bitkisi (Mespilus germanica L)., ılıman bölgelerde ekonomik açıdan en önemli üçüncü bitki ailesi olan ve 100'den fazla cins ve 3.000 türden oluşan Rosaceae (Shulaev ve ark., 2008), familyasına ait olup, çoğunlukla kayalıklarda yetişen bir bitkidir. Rosacea (gülgiller) familyası yenilebilir meyveleri, L-askorbik asit, tanenler dahil fenolikler, flavonoidler ve sağlık için faydalı diğer fitokimyasallar gibi güçlü antioksidan aktivitelere sahip bileşikler açısından oldukça zengindir (Rop ve ark., 2011). Mespilus germenica, ülkemizde özellikle kuzey-batı Anadolu ve Marmara bölgesinde yetişmektedir. Halk arasında meyve olarak tüketildiği gibi, enterit (Glew ve ark., 2003), kabızlık tedavisinde, idrar söktürücü, böbrek ve mesane taşlarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Muşmulanın mineral ve iz elementleri (Al, Ba, Ca, Cu, Co, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mg, Na, Ni, P, Sr, Ti ve Zn) bol miktarda taşıdığı (Glew ve ark., 2003; Murcia, 2005), meyvelerinin organik asit, amino asit ve tanen miktarı açısından zengin olduğu (Rop ve ark., 2011) ve yüksek polifenol içeriği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Campanella ve ark., 2003; Serteser ve ark., 2008; Ayaz ve ark., 2008; Ercişli ve ark., 2012). Muşmula bitkisinin hastalık tedavi edici özelliği ve zengin içeriğine rağmen, literatürde kanserli hücre hatları üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkası içeren bileşikler grubuna fenolik bileşikler veya polifenoller denir (Nichenametla ve ark., 2006). Polifenoller, serbest radikallerin adsorbe edilmesi ve nötralize edilmesinde, reaktif oksijen türlerinin etkisiz hale getirilmesinde, demir ve bakır katyonlarının şelatlanmasında önemli rol oynayabilen redoks özellikleri nedeniyle önemli antioksidan kapasiteye sahip ikincil metabolitlerdendir (Trabelsi ve ark., 2012). Kardiyovasküler hastalıklar, kanser veya osteoporoz gibi oksidatif stres ile ilişkili hastalıklar ile yüksek fenol içerikli bitkilerle beslenme arasındaki ters ilişki önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Dai ve Mumper, 2010). Fenolik bileşiklerin, antioksidan aktivite ve serbest radikalleri süpürme, kanserojen metabolizmanın modülasyonu; hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında onkojenler ve tümör baskılayıcı genler üzerindeki gen ekspresyonunun düzenlenmesi; hücre döngüsü durması ve apoptozun indüksiyonu; immünomodülatör etki, mitojenle aktive sinyal transdüksiyon yollarının inhibisyonu; detoksifikasyon, oksidasyon ve indirgemede enzim aktivitelerinin modülasyonu; bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla anti-enflamatuar özellikler; hormon metabolizmasının düzenlenmesi; anjiyogenezin bastırılması; vasküler hücrelerin proliferasyonu ve göçünü inhibe ederek antiateroskleroz; yaşlanma-karşıtı nöroprotektif; antibakteriyel ve antiviral özellikler gösterdiği bildirilmiştir (Nichenametla ve ark., 2006; Huang ve ark., 2009; Tariq ve ark., 2017). Aseton, etanol, n-hekzan ve su gibi farklı polaritedeki çözücülerin ardışık veya tek ekstraksiyonlarının, bitkilerdeki farklı fenolik asitlerin açığa çıkmasına neden olduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Mokrani, A., ve Madani, K., 2016)

Kanser, görülme sıklığı ve ölüm oranı hızla artan bir hastalıktır. Yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar listesinde 7-8. sıralarda yer almasına rağmen günümüzde birçok ülkede kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir (Bozyel ve ark., 2019). Hastalık, insan vücudundaki hücrelerin sürekli olarak kontrol edilemeyerek çoğalmasıyla karakterizedir. Modern kemoterapinin toksisitesi ve kanser hücresinin antikanser ajanlara karşı direnci, bilim dünyasını bu sinsi hastalığın yeni tedavilerini ve önleme yöntemlerini aramaya yönlendirmiştir (Grigalius ve Petrikaite, 2017). Fenolik miktarı yüksek bitkilerle

yapılan bir diyetin, bazı kanser türlerinin başlangıcında kritik bir adım olabilecek DNA'daki oksidatif hasarı azalttığı da gösterilmiştir (Sailendra, 2006). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan paklitaksel gibi birçok ilacın etken maddesi bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Bitki kimyasalları antikanser etkilerini kanserojen inaktivasyon, antiproliferasyon, hücre döngüsü süspansiyonu, apoptozun indüksiyonu ve farklılaşması, anjiyogenezin baskılanması, antioksidasyon ve çoklu ilaç direncinin azaltılması gibi mekanizmalarla gösterir (Vauzour ve ark., 2010). Hastalığın en güncel tedavisi kemoterapi, radyoterapi ve kimyasal ilaçlarla yapılmaktadır. Ancak kemoterapinin hastalarda çok fazla yan etkiye neden olması ve sağlıklarına daha fazla zarar vermesi, bilim insanlarını kansere karşı alternatif tedaviler ve terapilere yönlendirmektedir (Greenwell ve Rahman, 2015). Dünya çapında 3000'den fazla bitkinin kanser önleyici özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Seca ve Pinto, 2018). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kansere karşı bitkisel droglarla yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Bozyel ve ark., 2019). Sambucus ebulus L.(Mürver otu) Koçyiğit ve Özhatay (2006) tarafından, Allium cepa L. (Soğan) Hayta ve ark., (2014) tarafından, Pistacia terebinthus L. (Menengiç) Tetik ve ark., (2013) tarafından, Artemisia absinthium L. (Acı pelin) Çömlekçioğlu ve Karaman (2008) tarafından, Melissa officinalis L. (Oğulotu) Tuzlacı, (2016) tarafından kansere karşı kullanımı bildirilen bazı bitkilerdir. Bitkisel drogların kanser hücre hatları üzerindeki etkisini belirlemek, tüm dünyada kansere karşı en etkili ön çalışmalar olarak kabul edilmektedir. Literatürde bu amaçla yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur.

Bir tür programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, fazlalık ve anormal hücreleri ortadan kaldırarak homeostazı düzenlemek için gerekli bir süreçtir. Apoptoz, karsinomda düzensizdir, bu nedenle, kanser tedavisinde en çok çalışılan süreçlerden biridir. Genel olarak, apoptoz, ölüm reseptör aracılı (dışsal) ve mitokondriyal bağımlı (içsel) yollar dahil olmak üzere iki ana yolla kontrol edilir. İkinci süreç, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri tarafından düzenlenen, sitokrom c'nin sitozole salınmasını tetikleyen ve böylelikle bir efektör olarak kaspaz-3'ü aktive eden membran bütünlüğü kaybı ve mitokondriyal depolarizasyonla başlatılır. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1), apoptoz, hücre proliferasyon kontrolü, replikasyon ve DNA hasarı onarımı dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik süreçte yer alan başka bir moleküldür. PARP, kaspaz proteaz aktivitesinin bir hedefidir ve ayrıca apoptoz ile ilişkilidir. PARP, DNA hasarını tespit ettiğinde, otomatik olarak değiştirilir ve onarım faktörlerini DNA hasar bölgelerine toplar. DNA onarımındaki kusurlar genomik dengesizliğe yol açar ve kanser gelişiminde kritik bir rol oynar. Anormal PARP-1 ekspresyonu, çeşitli kanser türlerinde; tümör ilerlemesi sergileyen çeşitli hücre dizilerinde kaydedilmiştir (Calaf ve ark., 2018).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma, MCF7 meme kanseri ve A549 akciğer kanseri hücre serileri kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Laminar kabin
2. İnkübatör (CO2'li)
3. İnverted (ters) mikroskop
4. ELISA cihazı
5. Distile su cihazı
6. Buzdolabı (+40C)
7. Derin dondurucu (-20^{0}C)
8. Derin dondurucu (-80 ^{0}C)
9. Hassas teraz
10. Soğutmalı santrifüj
11. Pipeptler (0.5-1000 µl arasında ölçüm yapılabilir)
12. L-glutamin
13. Serolojik pipet (5 ve10 ml)
14. Flask (25 ve 75 cm^2)
15. RT-qPCR cihazı
16. Minifuj
17. Master mix
18. Primerler
19. DMEM High Glukoz
20. Fetal Bovin Serum (FBS)
21. Penisillin/streptomisin
22. Tripsin EDTA
23. Filitre (0.22 mikrometre)
24. Liyofilizatör
25. HPLC cihazı

Kanserli hücre serileri

Bu çalışmada MCF7 (ATCC® HTB-22™) meme ve A549 (ATCC® CCL-185™) akciğer kanserli hücre serileri kullanılarak gerçekleştirildi.

Bitki materyali

Mespilus germanica L.'nin yaprakları, Türkiye'nin Van ilinden (enlem:K38°34'33"ve boylam: E43°16´10")) üç farklı dönemde (Haziran; tam çiçeklenme dönemi, Temmuz; genç meyve dönemi, Ekim; olgunlaşma dönemi başlangıcı) toplanmıştır. Bitki, Prof. Dr. Fevzi Özgökçe tarafından teşhis edilmiştir. Mespilus germanica ağaçları, iki meyve verme mevsimi boyunca insektisit veya herbisit kullanılmadan yetiştirildi. Yapraklar karanlıkta, oda sıcaklığında (22 ± 2°C) kurutuldu ve öğütme değirmeninde (IKA, A 11 basic) öğütüldü. Analitik değirmen) ve analizlere kadar -20°C'de saklandı. *Mespilus germanica* bitkisinin meyvelerinden elde edilen liyofilize ekstreler, farklı polaritelerdeki solventlerle ekstre edilerek kanserli hücre hatlarına uygulanmıştır.

3.2.Yöntem

Bu çalışmanın laboratuvar aşamaları, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü ve Moleküler Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bitki Ekstraktının hazırlanması

Mespilus germanica meyveleri, sıvı azot ile muamele edildikten sonra -51°C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında 96 saat bekletilerek liyofilize edildi. Dalar ve Konczak (2013)'ın ve Dai ve Mumper (2010)'in metodlarının modifiye edilmiş şekline göre ardışık liyofilize hidrofilik fraksiyonları hazırlandı. +40 °C lik sonikatörde yarım saat bekletilen karışım daha sonra +4 °C'de 24 saat bekletildikten sonra, homojenize karışım 30 dk. boyunca, santrifüj edildikten sonra filtreden geçirilerek falkon tüpünde muhafaza edildi. Elde edilen

süpernatant evaporatör yardımıyla çözücüden arındırıldıktan sonra, liyofilize edildi. Geriye kalan pelletin üzerine asidifik etanol eklenerek santrifüj edildi. Elde edilen etanol ekstresi -51 °C sıcaklık ve 50 millitor basınç altında liyofilizatör cihazında 3 gün süreyle bekletilerek, analiz işlemlerine başlanana kadar, –20 °C'de muhafaza edildi. Liyofilize ekstreler 0,45 µm lik filtreden süzülerek analizlere hazır hale getirildi.

Fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile analizi

Bitki ekstresinde bulunan fenolik bileşiklerin tanımlanması ve konsantrasyonlarının belirlenmesi işlemleri Dalar ve Konczak (2013)'a göre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Analitik yüksek basınçlı sıvı kromatografisi +30°C'de yürütülecek ve örnekler 254 nm, 280 nm, 326 nm, 370 nm boylarında kontrol edildi. Çalışmada HPLC'ye özgü fenolik bileşik standartları kullanılmıştır. Analiz işlemi için HPLC'ye yüklenen tüm bitki ekstreleri ve standartlar enjektör yardımı ile 0.22 µm'lik hidrofilik filtreden geçirilerek filtre edildi. Kantitatif analizler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bitki ekstraktında fenolik asitlerin tespiti için kullanılan HPLC cihazının analiz şartları Tablo 1.de verilmiştir.

Tablo 1. HPLC analiz şartları

Sistem	Özellikleri
Cihaz	Thermo- Finnigan Surveyor
Detektör	DAD (250-370 nm dalga boyu aralığında okuma yapıldı)
Oto enjektör	Surveyor (Thermo)
Sistem kontrolcüsü	SCL-10A
Pompa	LC-10ADVP
Degaze	DGU-12A
Kolon fırını	CTO-1-ADVP
Kolon	Waters Atlantis ODS-2, (4mm×250 mm), 5 µm
Mobil faz	280 ml meOH +20 ml asetik asit+700 ml
Akış hızı	1,25 ml/da (1ml/dk ile başlandı, 12.dk da 1,25 ml/dk, 15.dk da 1,5 ml/dk)
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Mobil faz	1 lt. için 280 ml meOH +20 ml asetik asit+700 ml
Kolon sıcaklığı	40 °C

Hücre kültürü

Hücre serileri; 37ºC, % 5 CO_2 ve %95 nem içeren ortamında kendi özgü besi ortamında çoğaltılarak kullanıldı. MTT için pleytlere (96'lık) kuyucuk başına 10^5 hücre ekildi. Çalışma grupları için ise, flask başına (25 cm^2'lik) 10^6 hücre ekildi. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda hücrelere MTT sonucunda ve çalışma gruplarında yer alan konsantrasyonlara göre bitki ekstraktları uygulandı.

Hücre kültürüne uygulanan bitki ekstrakt solüsyonlarının hazırlanması

Ekstraksiyon solvent içinde hazırlandığı için stok solüsyon DMSO içinde çözdürüldü. Final konsantrasyonlar (100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml) medyum ile dillüsyon edilerek hazırlandı. Bu dillüsyonda DMSO oranı nontoksik (≤0,005) etkiye sahip olacak şekilde hazırlandı.

Sitotoksisite (MTT hücre canlılık) testi

Hücre kültürü çalışmalarında, en iyi potansiyele sahip etken maddeyi veya ekstratı tespit etmek için IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) yani, hücrelerin %50'sinin çoğalmasını inhibe eden sitotoksik konsantrasyon kullanılır. Bu etki potansiyeline sahip tüm ilaç adayları içinde en düşük IC_{50} değerine sahip etken madde tercih edilir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml) hazırlanan ekstraktlar, 48 saat boyunca kanserli hücrelere uygulanarak sitotoksik etkileri tespit edildi. Uygulama sonunda MTT canlılık testi gerçekleştirildi. En düşük IC_{50} değerine sahip olan bitki ekstraktının, en iyi proliferatif konsantrasyonu da tespit edildi. Tespit edilen IC_{50} ve proliferatif konsantrasyonlar 48 saat boyunca hücre serilerine uygulandı. Çalışma, her hücre serisinde; kontrol grubu (kontrol), IC_{5O} grubu (IC_{50}) ve Proliferatif Grup (PRO) grup olmak üzere 3 grup halinde gerçekleştirildi.

RNA eldesi ve cDNA izolasyonu

Oluşturulan grupların uygulama süreleri sonunda hücreleri tripsinizasyon yöntemi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Toplanan hücreler santrifüj edilerek üstündeki medyum atıldı, hücreler steril PBS ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edilerek üstü atıldı.

Elde edilen hücrelerden Trizol Reagent-kloroform yöntemi (Chomczynski ve Mackey, 1995; https://medicine.yale.edu) kullanılarak total mRNA elde edildi. Elde edilen mRNA'ların miktar ve saflığı spektrometrede ölçüldü. Uygun ölçüm sonucunda Total mRNA'dan High-Capacity cDNA Reverse Transcription izolasyon kiti (Applied Biosystems™ Cat: 4368814, Lithuania) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Real Time-qPCR

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak tablo 2'de primer sekans dizilimleri verilen hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeyleri belirlendi. Her bir gene ait primerlerin uygun optimizasyon şartları belirlendi. örnek RT-qPCR reaksiyon şartları Tablo 3 de verilmiştir. RT-qPC Rreaksiyonu ROTOR-GENE Q (Qiagen, Germany) cihazında gerçekleştirildi. Gen ekspresyon paternlerinin saptanması amacıyla; Otofajik ve nekretotik ölüm yollaklarında majör genler olan ATG5, ATG3 ve RIPK1, apoptotik yolakta yer alan kaspaz enzim sistemlerine ait genlerden BCL2, BAX, Apaf1, kaspaz-8,kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 ile DNA hasar belirteci TP53 geninin transkripsiyon düzeyleri belirlendi. Ekpsresyon analizlerinde kontrol geni olarak Aktin Beta (ACTB) kullanıldı. Çalışmada amplikasyon tespiti için SYBR Green master mix (ENZO Life Science cat: ENZ-NUC104-0200) kullanıldı. Her bir örnek 3 bağımsız tekrar ile tekrarlandı, bir ct (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibariyle belirlendi. Ekspresyon analizlerinde genlerin ürünleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık

kontrol grubununekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

Tablo 2: Hedef genlere ait primer sekans dizilimi

Gen ismi	Primer sekans dizilimi	
	F. 5'-3'	R: 5'-3'
Aktin Beta (ACTB)	ACTCTTCCAGCCTTCCTTC	ATCTCCTTCTGCATCCTGTC
ATG3	GAGATCACCTAGTCCACCAC	GCTTCCGTTATTCCTGTAATACC
ATG5	GAGACAAGAAGACATTAGTGAG	GATATTCCATGAGTTTCCGA
RIPK1	TGAGCTTCCGCTAGACA	CTGAAGCTCAACGCCCA
Caspase-8	GATGTTATTCCAGAGACTCCAG	GGTAGGTAATCAGCAAATCCA
Caspase-3	ATGGAAGCGAATCAATGGAC	AAACATCACGCATCAATTCC
BCL2	GTGGTGGAGGAACTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
Caspase-9	GGCTCTTCCTTTGTTCATCTCC	TCACCAAATCCTCCAGAACCA
BAX	AGCAAACTGGTGCTCAAGGC	CCACAAAGATGGTCACTGTC
Kaspaz-7	GGCTTGTATTGAAGAGCAGGG	CTGATCTTGTATCGAGGATTAGCA
Apaf-1	CCCTTTGTGTCCAGTAGTGGG	CTCTGTCTCGCCACATACCC
Caspase-3	CCATGCAGGTGAGCTTCGT	GAATCTGCGAGAGACACCATC
PARP-1	CACCAAAAAGGAGGTGGAAA	CAACTCCTGAAGGCTCTTGG
P53	CCCAGGTCCAGATGAAGCTC	CATGTAGTTGTAGTGGATGGTGGT

Tablo 3. Reaksiyon şartları

Reaksiyon içeriği	**Bir örnek için**	**Reaksiyon Döngüsü**
Tampon (2X)	10 µl	95°C 2' denatürasyon
Primerler	Forward : 0,5 µl Reverse : 0,5µl	95°C 5" *58°C -60°C — 40 döngü
dH_2O	8,4 µl	*Bağlanma sıcaklığı primerlere göre değişkenlik göstermiştir.
cDNA	0,6 µl	***Melting Curve*** Ramp: 50-99 (1'er derece artış) 90ºC 5 saniye
Toplam	20 µl	

İstatistik Analiz

Tüm istatistiksel analizler için SPSS 22.0 versiyon paket programı kullanıldıı. Gruplar arası variyans analizi için Kruskal–Wallis testi kullanıldı. Tanımlayıcı istastistikler için one-way ANOVA ve post-hoc Bonferroni testi kullanıldı. Tüm parametreler ortalama± standart sapma olarak sunulmuştur. Tüm gruplar arası analizler için, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

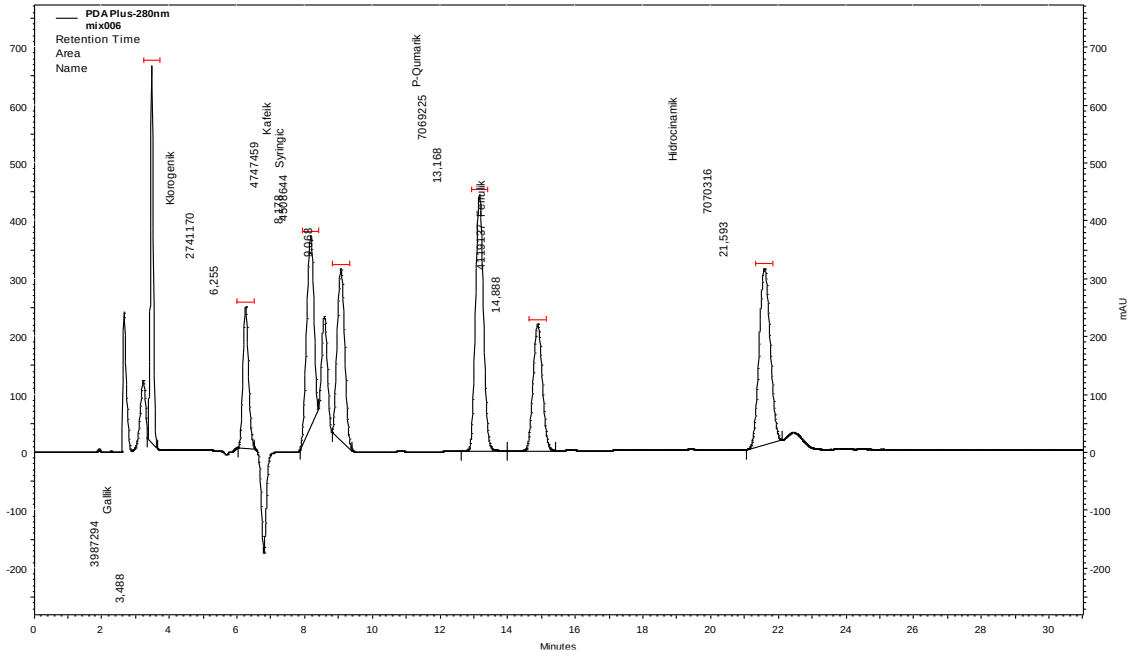
Bitki ekstraktının HPLC sonuçları

Kanser hücre serilerinde etkili sonuçlar elde ettiğimiz Temmuz ayında toplanan Mespilus germanica yapraklarının Fraksiyonlu ekstraksiyonlarda kafeik, kumarik, syringic, gallik, ferulik ve hidroksi ferulik asitler tespit edilmiştir. Kafeik, kumarik, gallik ve hidroksinamik asit miktarları syringic ve ferulik asit miktarlarına göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde yüksek tespit edilmiştir. HPLC analizleri sonucunda tespit edilen fenolik asitler arasında gallik asit miktarı diğer fenolik asitlere göre yaklaşık 25 kat yüksek tespit edilmiştir. Syringic ve ferrrulik asit miktarları ise diğer fenolik asit miktarlarına göre en düşük tespit edilen fenolik asitler olmuştur.

Tablo 4. HPLC analizinde tespit edilen fenolik asit miktarları

fenolik asit adı	n	mean	std.deviation	p
kafeik asit	3	0.8960	0.01735	0.001
kumarik asit	3	0.8960	0.01735	0.001
gallik asit	3	25.037	130490	0.004
syringic asit	3	0.5943	0.18802	0.051
ferrulik asit	3	0.0607	0.01102	0.827
Hidroksinamik asit	3	1.208	0.0166	0.002

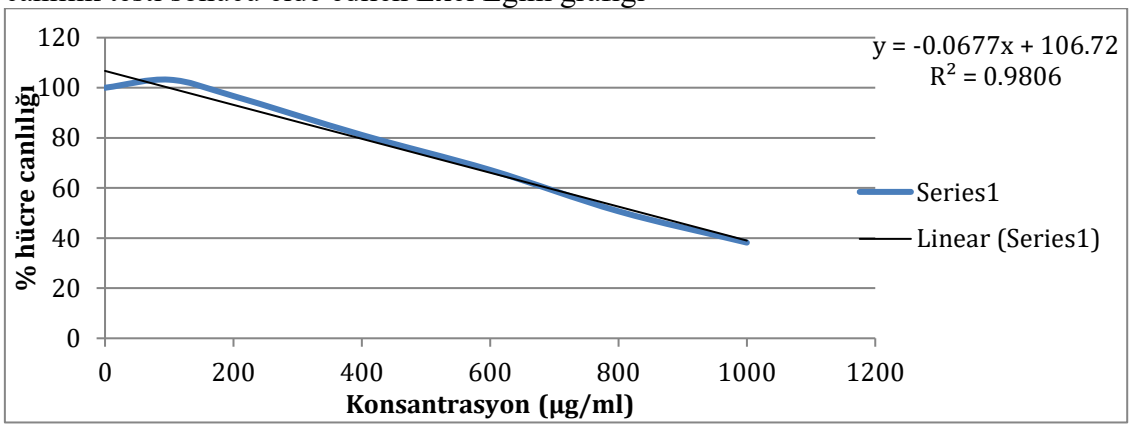
Şekil 1. HPLC analizinde kullanılan standartların geliş 280 nm dalga boyunda pikleri



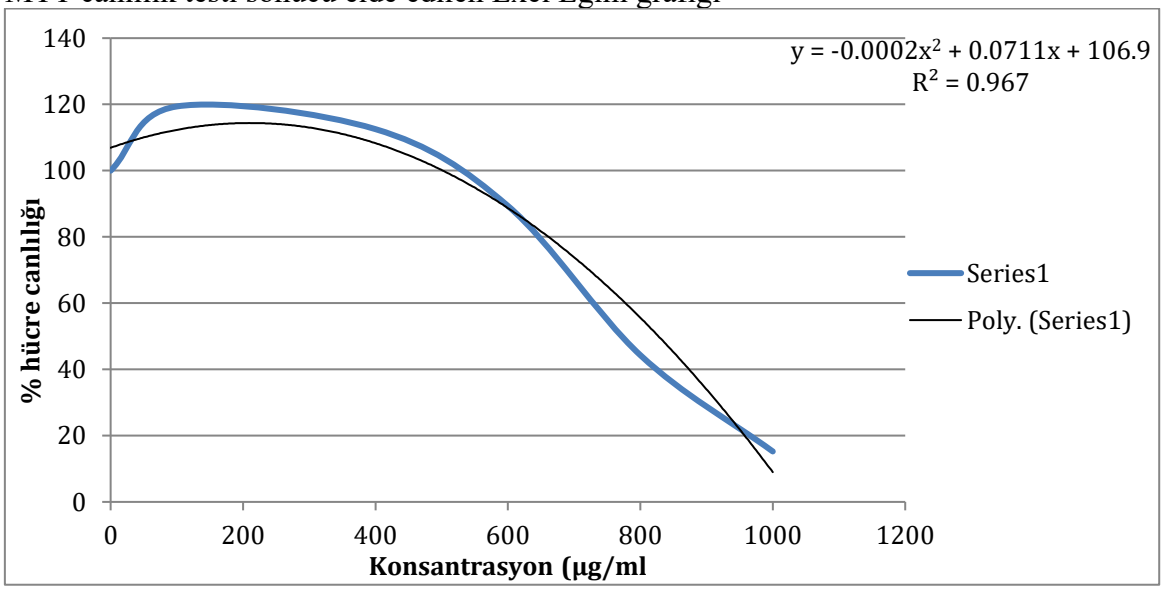
MTT sonucu

Mespilus germanica (muşmula) bitkisinin çeşitli mevsimsel dönemlerinde toplanan meyve ve yapraklarından farklı polaritelere sahip solventlerle elde edilen ekstraktların A549 ve MCF-7 kanseri hücre hatları üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, Mespilus germanica (muşmula) temmuz ayına ait yaprağının fraksiyon ekstraktının kanserli hücreler üzerine en iyi ve en düşük IC_{50} konsantrasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen Sonuçlar şekil-2 ve şekil-3 grafiklerinde verildiği gibidir. IC_{50} A549 hücresinde 800 µg/ml, MCF-7 hücre serisinde ise 770 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her iki hücre serisi için en düşük IC_{50} değerine ait bu ekstraktın da en yüksek proliferatif konsantrasyonlarıda (PRO) tespit edildi. Bu konsantrasyon her iki hücre serisinde de 100 µg/ml olarak tespit edildi.

Şekil 2: Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt uygulanması sonucu A549 hücresine ait MTT canlılık testi sonucu elde edilen Exel Eğim grafiği



Şekil 3: Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt uygulanması sonucu MCF-7 hücrelerisine ait MTT canlılık testi sonucu elde edilen Exel Eğim grafiği



Mespilus germanica ekstraktının A549 ve MCF-7 hücre serilerine uygulamasının otofajik ATG3 ve ATG5 ve nekrotik RIPK1 genler üzerine etkisi

Farklı hücre serilerine hem IC_{50} hem de proliferatif konsantrasyonlarda ekstrakt uygulamasının ATG3 ve ATG5 (otofajik) ve RIPK1 (nekrotik) yollaklardaki majör genlere olan etkisini gösteren değerler Tablo 3'de verilmiştir. Buna göre kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında IC_{50} uygulanan her iki hücre serinde de ATG3, ATG5 ve RIPK1'de de artış ($p < 0.05$) meydana gelmiştir.

Tablo 5. Ekstrakt uygulaması sonucunda ATG3, ATG5, ve RPK1 genlerinin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

		A549	MCF-7
	Grup	ort±SD	Ort±SD
ATG3	Control	1,03±0,29	1,01±0,23
	PRO	0,52±0,18	2,77±1,02
	IC50	2,07±004*	38,33±9,81*
ATG5	Control	1,06±0,7	0,98±0,39
	PRO	1,17±0,77	0,54±0,12
	IC50	3,61±0,67*	3,84±0,20*
RIPK1	Control	1,04±35	1,04±0,40
	PRO	2,86±1,26	2,64±0,25
	IC50	6,58±2,32*	20,03±3,77*

* istatistiki olarak kontrol ve proliferasyon gruplarına göre anlamlı $P < 0.05$ bir farklılık göstermiştir.

Mespilus germanica ekstraktının A549 ve MCF-7 hücre serilerine uygulamasının apoptozis üzerine etkisi

549 akciğer kanser hücre serine ve MCF-7 meme kanseri hücre serilerine 48 saat uygulan Mespilus germanica ekstraktının apoptotik genlerin mRNA ekspresyonlarına olan etkisi Tablo 6 da verildiği gibidir.

Ekstraktın A549 hücre serisindeki etkisi; Apaf-1, kaspaz-8 ve kaspaz-9 genlerinin mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermiştir ($p<0.05$).

Ekstraktın MCF-7 hücre serisindeki etkisi; antiapoptotik bir enzim olan BLC2 geninde önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0.05$). Bunu yanında apoptotik enzimler olan BAX, Apaf-1 ve kaspaz enzim sisteminin majör genleri olan kaspaz-8 ve9'daönemli artış meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Tablo 6 Ekstrakt uygulaması sonucunda apoptotik genlerin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

		A549	MCF-7
	Grup	ort±SD	Ort±SD
BAX	Control	1,02±0,26	1,12±0,63
	PRO	2,348±0, 10	2,06±0,50
	IC50	5,97±3,59	16,78±4,01*
BCL2	Control	1,11±0,64	1,00±0,06
	PRO	2,50±1,73	1,20±0,12
	IC50	2,53±0,46	18,83±1,23*
Caspase-8	Control	1,10±0,51	1,01±0,20
	PRO	2,46±0,97	1,63±0,35
	IC50	14,52±5,62*	10,72±3,73*
Caspase-9	Control	1,21±0,86	1,06±0,42
	PRO	1,21±0,78	1,21±0,71
	IC50	6,35±2,14*	19,53±2,01*
Caspase-7	Control	1,95±2,60	1,02±0,26
	PRO	1,55±0,72	3,57±1,18
	IC50	1,33±0,66	13,84±3,93*
Caspase-3	Control	0,90±0,08	1,00±0,10
	PRO	0,91±0,71	1,29±0,17
	IC50	0,73±0,93	0,53±0,14
Apaf-1	Control	1,50±1,65	1,17±0,68
	PRO	1,86±0,19	2,87±1,32
	IC50	4,48±0,98*	9,79±2,86*

*istatistiki olarak kontrol ve proliferasyon gruplarına göre anlamlı $P < 0.05$ bir farklılık göstermiştir

Mespilus germanica ekstraktının A549 ve MCF-7 hücre serilerine uygulamasının P53 ve PARP1 DNA tamir geni üzerine etkisi

549 akciğer kanser hücre serine ve MCF-7 meme kanseri hücre serilerine 48 saat uygulan Mespilus germanica ekstraktının DNA tamir genlerinin mRNA ekspreiyonyonlarına olan etkisi tablo 4 te verildiği gibidir.

Ekstraktın A549 hücre serisindeki etkisi; PARP1 ve P53 genlerinin mRNA düzeyleri kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermemiştir ($p<0.05$).

Ekstraktın MCF-7 hücre serisindeki etkisi; PARP1 ve P53 genlerinin mRNA düzeyleri IC_{50} uygulanan grupta kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$).

Tablo 7 Ekstrakt uygulaması sonucunda DNA tamir genlerinin A549 ve MCF-7 hücre serilerinde 48 saat sonundaki mRNA transkripsiyon seviyesi

		A549	MCF-7
	Grup	ort±SD	Ort±SD
PARP1	Control	1,15±0,31	1,09±0,07
	PRO	2,97±0,57	1,73±0,01
	IC50	0,77±0,43	13,22±2,65*
P53	Control	1,13±0,69	1,00±0,07
	PRO	1,96±1,73	2,46±0,39
	IC50	1,83±0,61	26,65±3,02*

*istatistiki olarak kontrol ve proliferasyon gruplarına göre anlamlı $P < 0.05$ bir farklılık göstermiştir

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kimyasal reaksiyonlar, reaksiyona girecek maddelerin çok rahat birbirleriyle çarpışma olanağı bulabildiği bir çözücünün kullanıldığı homojen bir ortamda gerçekleşebilir (Kolancılar, 2010). Su, analitik kimyada en fazla kullanılan polar bir çözücüdür. İki hidrojen atomunun bir oksijen atomuna V şeklinde bağlanmasıyla oluşur. Bir molekül farklı atomlardan oluşmuşsa her bir atomun elektronlara karşı ilgisi farklı olmaktadır. Bu nedenle molekülün bir tarafında elektron fazlalığından dolayı kısmi negatif yük, diğer kısmında da elektron azlığından dolayı kısmi pozitif yük oluşmaktadır. Bu tür çözücüler polar olarak adlandırılırken, aynı tür atomlara sahip çözücüler ise apolar çözücüler olarak sınıflandırılmaktadır (örnek, H2). Polar bileşiklerde moleküller arası çekim kuvveti oldukça güçlü olduğu için polar çözücünün negatif kısmı çözünenin pozitif kısmı tarafından çekilir (Morgil, 2007). Böylece çözünen maddenin çözücü içindeki çözünürlüğü artarak ekstraksiyon verimini arttırır. Çalışmamızda kullandığımız fraksiyonlu ekstraksiyonda farklı polaritelerde çözücüler (su, aseton, etanol, metanol) kullanılarak farklı etken maddelerin açığa çıkması hedeflenmiştir. Ekstraksiyonun fraksiyonlu olarak yapılması sonucu suyla çözünemeyen etken maddenin, asetonla, asetonla çözünemeyen maddenin etanol ve metanolle çözünmesi hedeflenmiştir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktar tayininde kullanılan en yaygın ve güvenilir yöntemdir. Özgün standartlar mevcudiyetinde, bitkisel kaynaklardaki fenolik bileşikler HPLC-DAD kullanılarak, alıkonulma zamanı ve UV spektrum bilgisi yardımıyla tanımlanabilmektedirler (Pereira ve ark., 2009). Bitki fenolikleri genel olarak DAD dedektörleri kullanılarak tanımlanırlar. DAD dedektörleri, kromatografik doruk noktasının elüsyonu boyunca, fenolik bileşiklere ait tüm UV spektrumunu toplanmasını sağlamaktadır. Bu sayede, fenolik bileşikler spektrum bilgilerine dayanarak kolaylıkla tanımlanabilmektedirler (Andrés-Lacueva ve ark., 2009).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekil fenolik bileşiklerin ayırışmasına, geçici olarak tanımlanmasına ve miktar tayinine olanak sağladığından dolayı, fenolik bileşiklerin tanımlanmasında standart pratik yöntem olarak kabul edilmektedir (Becker ve ark., 2004). HPLC-DAD ise, fenolik bileşiklerin tanımlanmasında en doğru ve en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir (Naczk ve Shahidi, 2004; Robbins, 2003). Çalışmamızda HPLC analizi sonucunda tespit edilen kafeik ve gallik asitlerin in vitro ve in vivo antioksidan etkileri daha önceki çalışmalarda (Sato ve ark., 2011; Gonthier ve ark., 2003) bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız *Mespilus germanica* bitkisine ait Temmuz fraksiyonlu ekstraktının, kanserli hücreler üzerinde etkili olması; Dudonné ve ark., (2009) bildirdiği antioksidan kapasite ile toplam fenolik madde arasında anlamlı bir ilişki olduğu; Katalinić ve ark., (2004)'nın bildirdiği; bitkilerin içerdiği toplam fenoliklerin, antioksidan aktiviteyi etkilemesi ve Kono ve ark. (1995)'nın bildirdiği fenolik maddelerin antimutagenik ve antitümör etkiye sahip olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca çalışmamızla uyumlu olarak farklı solventlerle yapılan bitki ekstrelerinin kanserli hücreler üzerinde etkisinin farklı olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Aarthi ve Babu (2017), tropik bir bitki olan Phyllanthus reticulatus su ve etanol ekstrelerinin, kolon kanseri hücre hattı-HT29 üzerine olan etkisini inceledikleri çalışmalarında Phyllanthus reticulates'in su ile ekstraksiyonunun kanser hücre hatlarında etanole göre daha yüksek öldürücü etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Meme kanseri, geleneksel kemoterapötik ilaçlarla tedavisi sınırlı olan kadınların karşılaştığı en önemli sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde *Taxus brevifolia* ağacından elde edilen paklitaksel, birçok kanser hücre tipinde antitümör aktivite gösteren terapötik bir klinik ajan olarak kullanılmaktadır. Aynı şekilde, Zerdeçaldan (*Curcuma longa*) elde edilen bir

polifenol olan curcumin (diferuloylmethane), bazı antikanser özellikler göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu olarak Calaf ve ark. (2018), insan meme kanseri hücre hatlarında, tek başına ve kombinasyon halinde kurkumin ve paklitaksel tarafından indüklenen hücre ölümünü değerlendirdikleri çalışmalarında; MCF7, östrojen ve progesteron reseptörü için üçlü pozitif epitel ve lümen benzeri adenokarsinom hücre hattı, MDA -MB-234, metastatik bir insan meme kanseri hücre hattı ve normal bir meme hücre hattı olarak MCF-10F kullanmışlardır. Sonuçlar, kurkumin ve paklitakselin, ayrı ayrı kullanımında kaspaz-3/7 aktivitesi, Annexin V, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 aktivasyonu ve kaspaz-3'ün protein ekspresyonu testleri dahil olmak üzere birçok yöntemle gösterilen apoptoz ve nekrozu indüklediğini göstermiştir. Kurkumin ve paklitakselin, kanser hücre hatlarında birlikte kullanımının her iki maddenin tek tek kullanımına kıyasla daha yüksek seviyede apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız Mespilus germanica ekstrelerinin, kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisiyle paralel sonuçlar Olsson ve ark. (2004)'nın 10 farklı meyve ekstraktının kolon kanseri hücreleri HT29 ve meme kanseri hücreleri MCF-7'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileriyle uyımludur. Ekstrelerin konsantrasyonuna bağlı olarak hem akciğer kanseri hücreleri A549 hem de meme kanseri hücreleri MCF-7'nin proliferasyonunu azalttığını tespit etmiş bulunuyoruz.

Çalışmamızda Mespilus germanica bitki ekstraktı, anti-apoptotik bir gen olan BCL2 geninde ve apoptotik enzimler olan BAX, Apaf-1 ve kaspaz enzim sisteminin majör genleri olan kaspaz-8, 9 ve 3'de önemli artış meydana getirmiştir ($p<0.05$). Sonuçlarımız, Mazewski ve ark.(2018)'nın üzüm, patates, havuç, siyah ve mor fasulyenin de içinde bulunduğu on bir farklı bitki ekstraktıyla yaptıkları ve antosiyaninlerin, anti-apoptotik proteinlerin (survivin, cIAP-2, XIAP) ekspresyonunu azalttığını, G1'de apoptozu indüklediğini, siliko ve biyokimyasal olarak tirozin kinaz inhibe edici potansiyel sergilediğini bildirdikleri çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur.

Mespilus germanica bitkisinin Temmuz ayında toplanan yapraklarının fraksiyonlu ekstraktlarıyla yaptığımız bu çalışmanın sonuçları aynı zamanda Şigva ve ark. (2019)'nın, Türkiye'den birkaç endemik bitki türünün (Phlomis leucophracta, Rubia davisiana, Alkanna tinctoria) ve bilinen iki bitki aktif bileşiğinin (sülforafan (SFN) ve silimarin (SILY)) ve kanser ilacı olarak kullanılan Paklitaksel in, androjenden bağımsız PC3 ve DU145 ve androjene bağımlı VCaP prostat kanseri hücre hatları üzerinde antikarsinojenik sinerjik etkisini araştırdıkları çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Endemik bitki özlerinin (Alkanna tinctoria, Phlomis leucophracta ve Rubia davisiana, IC50 <220µg / ml) ve bitkisel maddeler (SILY ve SFN IC50 <130µM), prostat kanseri hücre hatlarında antiproliferatif ve apoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir. Paklitaksel endemik bitki özleri ile sinerjik etki göstererek (Kombinasyon İndeksi CI, ED50 <0.41) prostat kanseri hücre hatlarında Bcl - 2 gen ekspresyonunu baskılamış, ayrıca TNFRSF10A, TNFRSF1A, CHEK1, CDKN1A, CDKN2B, CDK8, CDKN3 ve CASP14 ekspresyonunu artırmış ve BAD, CDK5RAP1, CDC20, cyclin H, CDK5RAP1, CDC20'yi ise azaltmıştır.

Çalışmamızla uyumlu olarak, Santos ve ark. (2020), E. pisocarpus'tan EtOH ekstresi ve fraksiyonlarının UVA radyasyonuna karşı orta düzeyde bir ışık koruyucu etkiye (FPS 3.0-5.0) sahip olduğunu, diklorometan fraksiyonunun ise, B16-F10 (IC50 = 46.8 µg / ml) ve SK-MEL-28 hücrelerine (IC50 = 40.1 µg / ml) karşı daha yüksek anti-melanom aktivite ve normal hücreler üzerinde de daha az toksisite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, Mespilus germanica bitkisinin farklı solventlerle yapılan fraksiyonlu ekstraktlarının, A549 akciğer kanserli hücreler ve MCF7 meme kanserli hücreler üzerine

etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, dünya bilim literatürüne önemli sonuçların kazandırıldığı düşünülmektedir. *Mespilus germanica* ekstraktının A549 ve MCF-7 hücre serilerine uygulamasının P53 ve PARP1gibi DNA tamir genlerini kontrole göre önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. DNA'da meydana gelen mutasyonlar tamir edilmediği takdirde kansere neden olmaktadır. *M.germanica*'nın tamir genlerini arttırmış olması kanseri önleme açısından oldukça önemlidir. Aynı şekilde kanserleşmenin en önemli nedenlerinden biri olan inaktif apoptoz genlerini, *M.germanica* aktifleştirmiştir. Apoptoz genleri olan kaspaz 3, 8 ve 9 genlerini kontrole göre önemli ölçüde arttırmış olması, bitkinin apoptozu indüklediğinin ve tümörleşmeyi engellediğinin önemli bir kanıtı olarak düşünülmektedir. Nekroz ve otofaji gibi kontrollü hücre ölümlerinin gerçekleşmediği durumlar, kanser gelişimi için zemin hazırlamaktadır. Bu çalışmada farklı hücre serilerine hem IC50 hem de proliferatif konsantrasyonlarda ekstrakt uygulamasının ATG3 ve ATG5 (otofajik) ve RIPK1 (nekrotik) yollaklardaki majör genlerde önemli artışlar tespit edilmiştir. Daha önce, dünya çapında *Mespilus germanica* yapraklarıyla böyle bir çalışma yapılmamış olması nedeniyle elde edilen sonuçlar kanser çalışmaları açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmadan elde ettiğimiz olumlu sonuçlar ışığında, kanser tedavisinde etkili bir ilaç olma potansiyeline sahip *M.germanica* bitkisi ile kanserli ratlar üzerinde ikinci faz çalışmaları içeren yeni bir çalışma planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y., & Colak, A.(2008). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (Mespilus germanica L.) fruit during ripening and over ripening. Food Chemistry, 106(1), 291-298.

Aarthi, C., Babu, P. B. (2017). Anti-cancer activity of Phyllanthus reticulatus on colon cancer cell line. Int J Civil Eng Technol, 8, 943-7.

Baytop, T., 1999: Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). Capa-Istanbul, Nobel Tıp Press (2nd ed.).

Bozyel, M. E., Bozyel, E. M., Canlı, K., & Altuner, E. M. (2019). Anticancer Uses of Medicinal Plants in Turkish Traditional Medicine. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 22, 465-484.

Calaf, G. M., Ponce-Cusi, R., Carrión, F. (2018). Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines. Oncology reports, 40(4), 2381-2388.

Campanella, L., Bonanni, A., Favero, G., & Tomassetti, M. (2003). Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. Analytical and bioanalytical chemistry, 375(8), 1011-1016.

Chomczynski, P., & Mackey, K. (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. Biotechniques, 19(6), 942-945.

Çömlekçioğlu N, Karaman Ş 2008. The Medicinal Plants Found in the local Herbal Markets in The City of Kahramanmaraş in Turkey. KSU Journal of Science and Engineering, 11(1): 23-32.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352.

Dalar, A., Konczak, I., 2013. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia, Industrial Crops and Products, 44: 383-390.

Dalar, A., Türker, M., Konczak, I., 2012. Antioxidant capacity and phenolic constituents of Malva Neglecta Wallr. and Plantago lanceolata L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. Journal of Herbal Medicine, 2 (2): 42-51.

Ercisli, S., Sengul, M., Yildiz, H., Sener, D., Duralija, B., Voća, S., & Purgar, D. D. (2012). Phytochemical and antioxidant characteristics of medlar fruits (Mespilus germanica L.). Journal of Applied Botany and Food Quality, 85(1), 86.

Glew, R. H., Ayaz, F. A., Sanz, C., VanderJagt, D. J., Huang, H. S., Chuang, L. T., & Strnad, M. (2003). Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (Mespilus germanica L.) during fruit development and maturation. Food chemistry, 83(3), 363-369.

Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal plants: their use in anticancer treatment. International journal of pharmaceutical sciences and research, 6(10), 4103.

Grigalius, I., & Petrikaite, V. (2017). Relationship between antioxidant and anticancer activity of trihydroxyflavones. Molecules, 22(12), 2169.

Güleşci, N., Aygül, İ. (2016). Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler. Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(1), 109-129.

Hayta S, Polat R, Selvi S 2014. Traditional Uses of Medicinal Plants in Elazığ (Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 154(3): 613-623.

Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. 2009. Natural phenolic compoundsfrom medicinal herbs and dietry plants: Potential use forcancer prevention. Nutr Cancer 62:1–20

Kaya, A. (2011). Tıbbi bitkiler ve etnobotanik çalışmalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu Kitabı, İklim Ofset Matbaacılık Ltd. Şti., İstanbul, 11-18.

Koçyiğit M, Özhatay N 2006. Wild Plants Used as Medicinal Purpose in Yalova (Northwest Turkey). Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(2): 91-103.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, 25(4), 402-408.

Mazewski, C., Liang, K., & de Mejia, E. G. (2018). Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. Food chemistry, 242, 378-388.

Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (Prunus persica L.) fruit. Separation and Purification Technology, 162, 68-76.

Murcia, M.A.; Martinez-Tome, M.; Jimenez-Monreal, A.M. (2005) Evaluation of antioxidant activity of tomato treated with an ethylene inhibitor. FEBS J. , 272, 417–417

Najmuddin, S. U. F. S., Romli, M. F., Hamid, M., Alitheen, N. B., & Abd Rahman, N. M. A. N. (2016). Anti-cancer effect of Annona muricata Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 311.

Nichenametla SN, Taruscio TG, Barney DL, Exon JH. A Review Of The Effects And Mechanisms Of Polyphenolics In Cancer. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2006; 46: 161-183.

Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, Å., & Duan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. Journal of agricultural and food chemistry, 52(24), 7264-7271.

Ramalho, A. S., Beck, S., Farinha, C. M., Clarke, L. A., Heda, G. D., Steiner, B., ... & Tzetis, M. (2004). Methods for RNA extraction, cDNA preparation and analysis of CFTR transcripts. Journal of Cystic Fibrosis, 3, 11-15.

Rop, O., Sochor, J., Jurikova, T., Zitka, O., Skutkova, H., Mlcek, J., ... & Kramarova, D. (2011). Effect of five different stages of ripening on chemical compounds in medlar (Mespilus germanica L.). Molecules, 16(1), 74-91.

Salomons, G. S., Smets, L. A., Verwijs-Janssen, M., Hart, A. A. M., Haarman, E. G., Kaspers, G. J. L., & Kamps, W. A. (1999). Bcl-2 family members in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationships with features at presentation, in vitro and in vivo drug response and long-term clinical outcome. Leukemia, 13(10), 1574-1580.

Santos, L. K. B., Veras, M. D. A., Marques, K. K. G., Alves, M. M. D. M., Mendes, A. N., Carvalho, F. A. D. A., ... & GonÇalves, J. C. R. (2020). Assessment of In Vitro Anti-

melanoma Potential of Ephedranthus pisocarpus RE Fr. Anticancer Research, 40(9), 5015-5024.

Sailendra N. Nichenametla, Todd G. Taruscio, Danny L. Barney & Jerry H. Exon (2006) A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46:2, 161-183, DOI: 10.1080/10408390591000541

Seca, A. M., & Pinto, D. C. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. International journal of molecular sciences, 19(1), 263.

Serteser, A., Kargioğlu, M., Gök, V., Bağci, Y., Özcan, M. M., & Arslan, D. (2008). Determination of antioxidant effects of some plant species wild growing in Turkey. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 59(7-8), 643-651.

Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., ... & Lewers, K. (2008). Multiple models for Rosaceae genomics. Plant physiology, 147(3), 985-1003.

Şiğva, Z. Ö. D., Okcanoğlu, T. B., Avci, Ç. B., Süslüer, S. Y., Kayabaşi, Ç., Turna, B., ... & Gündüz, C. (2019). Investigation of the synergistic effects of paclitaxel and herbal substances and endemic plant extracts on cell cycle and apoptosis signal pathways in prostate cancer cell lines. Gene, 687, 261-271.

Tariq, A.; Sadia, S.; Pan, K.; Ullah, I.; Mussarat, S.; Sun, F.; Abiodun, O.O.; Batbaatar, A.; Li, Z.; Song, D.; et al. A systematic review on ethnomedicines of anticancer plants. Phytother. Res. 2017, 31, 202–264.

Taylor, J. M., Keller, G. H., Shapiro, D., Burr, H., & Scholes, J. (1977). Synthesis and applications of complementary DNA. Advances in pathobiology, (6), 235-257.

Tetik F, Civelek S, Cakilcioglu, U 2013. Traditional Uses of Some Medicinal Plants in Malatya (Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 146(1): 331-346.

Trabelsi, N., Falleh, H., Jallali, I., Daly, A. B., Hajlaoui, H., Smaoui, A., Ksouri, R. (2012). Variation of phenolic composition and biological activities in Limoniastrum monopetalum L. organs. Acta physiologiae plantarum, 34(1), 87-96.

TRIZOL RNA Isolation Protocol - Yale School of Medicine [İnternet]. [Erişim Tarihi 13 şubat 2019]. https://medicine.yale.edu/.../TRIZOLRNAIsolation

Tuzlacı E 2016. Türkiye Bitkileri Geleneksel İlaç Rehberi. İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul

Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, OrunaConcha MJ, Spencer JPE 2010. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. Nutrients, 2(11): 1106- 1131.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Onay Belgesi gerekmemektedir.

PROJE SONUÇ RAPORU YAZIMINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

Tez Projeleri Sonuç Raporu Yazımında Dikkat Edilecek Hususlar

- Araştırmacılar ilgili Enstitü veya uzmanlık eğitiminin yapıldığı Fakültenin belirlediği kurallara göre yazılmış ve jüri tarafından onaylanmış tezlerini PDF formatında sistem üzerinden birime sunmalıdır.
- Hazırlanan tezlerde çalışmanın Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklendiğine dair bir ibareye yer verilmesi zorunludur.
- Proje çalışmasından elde edilen veriler veya sonuçlar kullanılarak üretilmiş yayınlar var ise, rapor sonunda listelenmeli ve yayınlar sistem üzerinden ayrıca yüklenmelidir.
- Sonuç raporu sisteme yüklenirken Türkçe ve İngilizce kısa özetin girilmesi sisteme zorunludur.

Güdümlü Projeler İçin Sonuç Raporu Yazımında Dikkat Edilecek Hususlar

Kapak sayfası formatı aynı olmak üzere desteğin nasıl kullanıldığını, gerçekleştirilen çalışmaları ve beklenen sonuçları açıklayan bir sonuç raporu hazırlanır ve BAP Koordinasyon Birimi'ne sunulur.

Diğer Projeler İçin (Proje Türüne Özel Sonuç Raporu Formu Düzenlenmemiş Projeler) Sonuç Raporu Yazımında Uyulması Gereken Kurallar

Proje sonuç raporu yazımında A4 ebadında kağıt alanı kullanılmalı, sayfalardaki sağ, üst ve alt boşluk 2.5 cm, sol boşluk ise 3 cm olmalıdır.

Proje sonuç raporunun tam metni, **tek bir PDF dosyası** olarak elektronik ortamda Yüzüncü Yıl Üniversitesi Proje Süreçleri Yönetim Sistemi üzerinden Birime sunulmalıdır. Dosya isimleri aşağıdaki formata uygun olmalı ve isim verilirken Türkçe karakter kullanılmamalıdır:

projeno.pdf
(örnek: 2015_SBE_YL041.pdf)
(örnek: 2015_VF_B176.pdf)

Sunulan Sonuç Raporunun bir nüsha çıktısı da BAP birimine elde teslim edilmelidir.

Proje sonuç raporu içeriği aşağıda belirlenen düzende olmalıdır:

Kapak: Yukarıda verilen formata uygun olarak hazırlanmalıdır.

Boş Sayfa: Kapaktan sonra boş bir sayfa bırakılmalıdır.

Önsöz: Proje hakkında çok kısa ve olağan bilgiler verilip projenin BAP Birimince desteklendiği belirtilmelidir.

İçindekiler: Rapor içindeki başlıkları, alt başlıkları ve bunların sayfa numaralarını verecek şekilde hazırlanmalıdır.

Tablo ve Şekil listeleri: İçindekiler bölümünün arkasına eklenmelidir.

Özet / Abstract: Projenin ana hatlarını (Amaç, Yöntem, Bulgular, Sonuç) gösterecek olan bir metindir ve hem Türkçe hem de İngilizce hazırlanmalıdır. Proje özetinin 150-250 kelime arasında olması beklenir. Özet'in bitiminde anahtar kelimelerin mutlaka yazılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Proje ana metni: Giriş, Genel Bilgiler, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Tartışma / Sonuç bölümlerinden oluşur. Tartışma ve Sonuç bölümünde, projenin öneri aşamasında ortaya konulan hedeflere ne ölçüde ulaşıldığı açıkça ortaya konulmalı, ulaşılamayan hedefler var ise bunların gerekçeleri de tartışılmalıdır. Sonuç bölümünün önerileri de kapsaması gerekmektedir.

Kaynaklar: Yararlanılan kaynaklar bilim alanına uygun kaynak gösterme standartlardan birisinde ve birörnek hazırlanmalıdır. Referanslar konu içerisinde geçtikleri yerlerde de parantez içinde belirtilmelidir.

Ekler: Sonuç Raporu ana metni içinde geçmeyip rapora eklenmesi gereken tablo, Etik Kurul, diğer bilgi, düzenlenmiş anket gibi kısımlar varsa, bu bölümde verilmelidir.