3T3 VE 5RP7 HÜCRE HATTINDA SİNNAMALDEHİT'İN APOPTOTİK MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Kübra URAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Temmuz 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1709F509 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kübra URAL'ın "3T3 ve 5RP7 Hücre Hattında Sinnamaldehit'in Apoptotik Mekanizmasının Araştırılması" başlıklı tezi 18/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**Unvanı Adı Soyadı**	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU	
Üye	: Doç. Dr. Gökhan KUŞ	
Üye	: Doç. Dr. Mustafa CENGİZ	

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

3T3 VE 5RP7 HÜCRE HATTINDA SİNNAMALDEHİT'İN APOPTOTİK MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Kübra URAL
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bilim Dalı
Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Temmuz 2019
Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Sinnamaldehit olarak da bilinen Trans-Cinnamaldehyde (C_9H_8O, moleküler ağırlık: 132,16 g/mol, saflık>99%), *Cinnamomum cassia*'nın kök kabuğundan izole edilmiş aktif bir bileşiktir. *Cinnamomum cassia*, hem Doğu hem de Batı ülkelerinde gastrit, kan dolaşımı rahatsızlıkları ve iltihaplı hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. Sinnamaldehit; içecek, dondurma, tatlılar ve sakız gibi gıda maddelerinde koku arttırıcı bir madde olarak yaygın kullanılan tarçın kabuğu yağının ana bileşenidir. Yapılan çalışmalarda, Sinnamaldehit'in antitümör, antifungal, sitotoksik ve mutajenik/anti-mutajenik aktiviteler gibi çeşitli biyolojik aktiviteler göstermesi kanser tedavisi için yararlı bir kemoterapötik madde olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Sinnamaldehit'in, tümör hücresinin çoğalmasını inhibe ettiği bilinmektedir. Yaptığımız çalışmamızda, Sinnamaldehit'in kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizmalarını araştırmak için H-Ras onkojeni ile transfekte edilen sıçan embriyonik fibroblast hücreleri (H-ras 5RP7) kullanılmıştır. NIH/3T3, fare embriyo fibroblast hücreleridir. NIH/3T3 hücreleri Sinnamaldehit'in kanser hücreleri üzerinde göstermiş olduğu etkilerin normal hücreler üzerinde gösterdiği etkiler ile karşılaştırmak için kullanılmıştır. Bu çalışmamızda; Sinnamaldehit'in H-Ras onkojeni ile transfekte edilen sıçan embriyonik fibroblast hücrelerindeki sitotoksik etkileri tespit edilip aynı zamanda yol açtığı programlı hücre ölümü mekanizmaları araştırılmıştır. Böylelikle Sinnamaldehit'in gelecek yıllarda anti-kanser ilaç olarak kullanılmasına katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Sinnamaldehit, Apoptoz, Sitotoksisite

ABSTRACT

3T3 AND 5RP7 CELL LINE THE CINNAMALDEHYDE INVESTIGATION OF APOPTOTIC MECHANISM

Kübra URAL

Department of Advanced Technologies

Program in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Trans-Cinnamaldehyde (C_9H_8O, molecular weight: 132,16 g / mol, purity> 99%), also known as cinnamaldehyde, is an active compound isolated from the root shell of Cinnamomum cassia. Cinnamomum cassia has been traditionally used in the treatment of gastritis, circulatory disorders and inflammatory diseases in both Eastern and Western countries. Cinnamaldehyde; is the main component of cinnamon bark oil which is widely used as an odor enhancing agent in foodstuffs such as beverages, ice cream, desserts and gum. In studies, Sinnamaldehyde shows a variety of biological activities such as antitumor, antifungal, cytotoxic and mutagenic/anti-mutagenic activities, suggesting it may be a useful chemotherapeutic agent for cancer treatment. It is also known that cinnamaldehyde inhibits the proliferation of tumor cells. In our study, rat embryonic fibroblast cells transfected with H-Ras oncogene (H-ras 5RP7) were used to investigate the mechanisms of action of cinnamaldehyde on cancer cells. NIH/3T3 are mouse embryo fibroblast cells. NIH/3T3 cells were used to compare the effects of cinnamaldehyde on cancer cells with those on normal cells. In this study; Cytotoxic effects of cinnamaldehyde in rat embryonic fibroblast cells transfected with H-Ras oncogene were determined and also the mechanisms of programmed cell death caused by these cells were investigated. Thus, it has been tried to contribute to the use of Sinnamaldehyde as an anti-cancer drug in the coming years.

Keywords: Cinnamaldehyde, Apoptosis, Cytotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca akademik tecrübelerinden, bilgi birikiminden yararlandığım, alanındaki başarılarını her daim takdir edip örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya

Tezimin her aşamasına desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, akademik bilgi eksikliklerimi tamamlamamda yardımcı olan Sayın Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e

Tez çalışmamın deneysel sürecinde BİBAM (Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi) imkanlarından yararlanmamı sağlayan, mikroskop takibi ve görüntülenmesinde yardımcı olan Sayın Uzman Biyolog Arzu İŞCAN'a

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Melike ÇEVİK'e ve Sayın Arş. Gör. Sedat KAÇAR'a

Tezimin yazım aşamasında bana yardımcı olan ve stresli zamanlarıma sabırla katlanabilen moral kaynağım, can dostum Türk Dili ve Edebiyatı Öğretmeni Funda BİLGİLİ'ye

Hayatım boyunca hiç bir fedakarlıktan kaçınmadan daima fikirlerimin en büyük destekçisi olan annem, babam ve kardeşime

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra URAL

18/07/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Kübra URAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ..... **i**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ..... **ii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

TEŞEKKÜR ..... **v**

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiii**

GÖRSELLER DİZİNİ ..... **xv**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xvii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kanser **1**

1.2. Kanser Oluşumu **1**

1.3. Kanser ve Hücre Döngüsü **3**

1.3.1. Hücre döngüsü kontrolü ve kontrol noktaları **4**

1.3.1.1. ***G1/S kontrol noktası*** **4**

1.3.1.2. ***G2/M kontrol noktası*** **5**

1.3.1.3. ***M kontrol noktası*** **5**

Sayfa

1.3.2. Protoonkogenler 6

1.3.3. Tümor baskılayıcı genler 6

1.4. Apoptoz ve Kanser 8

1.4.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar 10

1.4.2. Apoptozun mikroskobik olarak belirlenmesi 12

1.4.2.1. *Konfokal mikroskop ile apoptozun belirlenmesi* 13

1.4.2.2. *Geçirimli Elektron mikroskop ile apoptozun belirlenmesi* 14

1.4.3. Anneksin V yöntemi ile apoptozun belirlenmesi 15

1.4.4. Kaspazların apoptozdaki rolü 17

1.5. Deneylerde Kullanılan H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri 17

1.5.1. NIH/3T3 hücresinin kökeni ve kullanım alanları 17

1.5.2. H-ras 5RP7 hücresinin kökeni ve kullanım alanları 18

1.6. Sinnamaldehit'in Kimyasal Yapısı 18

1.6.1. Sinnamaldehit'in özellikleri ve kanser hücreleri üzerindeki etkisi 19

1.7. Sitotoksisite Testleri 21

1.7.1. MTT testi 22

2.MATERYAL VE YÖNTEM 24

2.1. Materyal 24

2.1.1. Kullanılan hücre serileri 24

Sayfa

2.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler 24

2.1.3. Kullanılan sarf malzemeler 24

2.1.4. Kullanılan cihazlar 24

2.2. Yöntem 25

2.2.1. Kullanılan araç-gereçlerin hazırlanması ve sterilizasyonu 25

2.2.2. H-ras 5RP7 (Sıçan Embriyo Fibroblast) ve NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) hücre hatları ile hücre kültürü uygulamaları..... 25

2.2.2.1. *Hücrelerin stoktan çıkarılması* 25

2.2.2.2. *Hücrelerin pasajlanması* 25

2.2.2.3. *Hücrelerin sayılması ve 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi* 26

2.2.2.4. *Hücrelerin stoklanması* 27

2.2.3. Sinnamaldehit dozlarının hazırlanması 27

2.2.4. Deney gruplarının belirlenmesi 27

2.2.5. MTT sitotoksisite testi 27

2.2.6. Anneksin V yöntemi ile apoptoz tayini 28

2.2.7. Kaspaz 3-7 uygulaması ile apoptoz tayini 28

2.2.8. Konfokal mikroskop ile hücre morfolojik değişikliklerinin tayini 29

2.2.9. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) ile yapısal değişikliklerin tayini 29

Sayfa

2.2.10. İstatiksel değerlendirme 31

3.BULGULAR 32

3.1. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki MTT bulguları 32

3.2. Flow sitometri bulguları 34

3.2.1. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki Anneksin V uygulaması ile elde edilen apoptotik bulgular 34

3.2.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki Kaspaz 3-7 uygulaması ile elde edilen apoptotik bulgular 38

3.3. Konfokal mikroskobik bulgular 42

3.3.1. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskobik bulguları 42

3.3.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları 43

3.3.3. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskobik bulguları 46

3.3.4. Sinnamaldehit'in NIH/3T3 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları 47

3.4. Geçirimli elektron mikroskobik bulguları 49

3.4.1. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskobik bulguları 49

Sayfa

3.4.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskobik bulguları 50

4.TARTIŞMA VE SONUÇ 52

KAYNAKÇA 55

ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Karsinogenezle ilişkilendirilen bazı proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ……..……..…….……..... 7

Tablo 1.2. Apoptoz ve nekroz'un kıyaslanması ……..……..... 11

Tablo 3.1. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 34

Tablo 3.2. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi..... 35

Tablo 3.3. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 36

Tablo 3.4. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 37

Tablo 3.5. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 38

Tablo 3.6. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 39

Tablo 3.7. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 40

Tablo 3.8. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser hücresine has özellikler ……..……..... 3

Şekil 1.2. Hücre döngüsü boyunca hücrenin izlediği kontrol noktaları ve hücrenin çoğalma kontrol noktaları ……..……..…. 4

Şekil 1.3. *Caenorhabditis elegans*'ta apoptozu kontrol eden Ced genlerinin insanlarda karşılığı ……....…….…….….. 9

Şekil 1.4. Apoptoz aşamaları ……..……...…….…….... 10

Şekil 1.5. Hücre ölümü ile ilgili değişkenleri saptama yöntemleri …..…….... 13

Şekil 1.6. Sağlam ve apoptotik hücreleri gösteren diyagram ……..……..... 16

Şekil 1.7. Sinnamaldehit'in kimyasal yapısı …..……..……..... 19

Şekil 2.1. Thoma lamında sayım yapılacak alanlar……..……. 26

Şekil 3.1. H-ras 5RP7 hücrelerine 24 saatlik Sinnamaldehit uygulanması sonucu oluşan konsantrasyona bağlı canlılık yüzdelerinin grafiği 33

Şekil 3.2. NIH/3T3 hücrelerine 24 saatlik Sinnamaldehit uygulanması sonucu oluşan konsantrasyona bağlı canlılık yüzdelerinin grafiği 33

Şekil 3.3. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı …....……..... 34

Şekil 3.4. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunn uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı 35

Sayfa

Şekil 3.5. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı ….....……....… 36

Şekil 3.6. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı 37

Şekil 3.7. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı …….....……...…..... 38

Şekil 3.8. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı ……..... 39

Şekil 3.9. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı …….....……...……..... 40

Şekil 3.10. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı ……..... 41

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış H-ras 5RP7 Kontrol Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 42

Görsel 3.2. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 43

Görsel 3.3. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 44

Görsel 3.4. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 45

Görsel 3.5. Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış NIH/3T3 Kontrol Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 46

Görsel 3.6. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan NIH/3T3 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 47

Görsel 3.7. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan NIH/3T3 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) 48

Sayfa

Görsel 3.8. H-ras 5RP7 Kontrol Hücrelerinin TEM Görüntüsü 49

Görsel 3.9. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü 50

Görsel 3.10. Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü 51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC: American Type Culture Collection

CO_2: Karbondioksit

dk.: Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

FBS: Fetal Bovin Serum

IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansına

IC_{50}: İnhibitör Konsantrasyonu 50

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MTT: 3-(4,5- dimethythiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide sitotoksisite testi

nm: Nanometre

ºC: Santigrad derece

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)

PI: Propidyum iyodür

PS: Fosfatidilserin

rpm: Revolutions per minute

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskobu

µL: Mikrolitre

µM: Mikromolar

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Normal hücreler belirli bir kontrol mekanizması sayesinde kontrollü bir şekilde çoğalırlar. Normal hücreler genetik ya da çevresel etmelerle hücre kontrol mekanizmasından çıkıp düzensiz ve kontrolsüz bölünüp çoğalmaya başlarsa kanser oluşmaktadır. Kanserin tanımlayıcı bir özelliği, hücrenin normal sınırlarını aşan, sonrasında vücudun diğer kısımlarını ele geçiren ve farklı organlara dağılabilen anormal hücrelerin hızlıca çoğalmasıdır [1].

1.2. Kanser Oluşumu

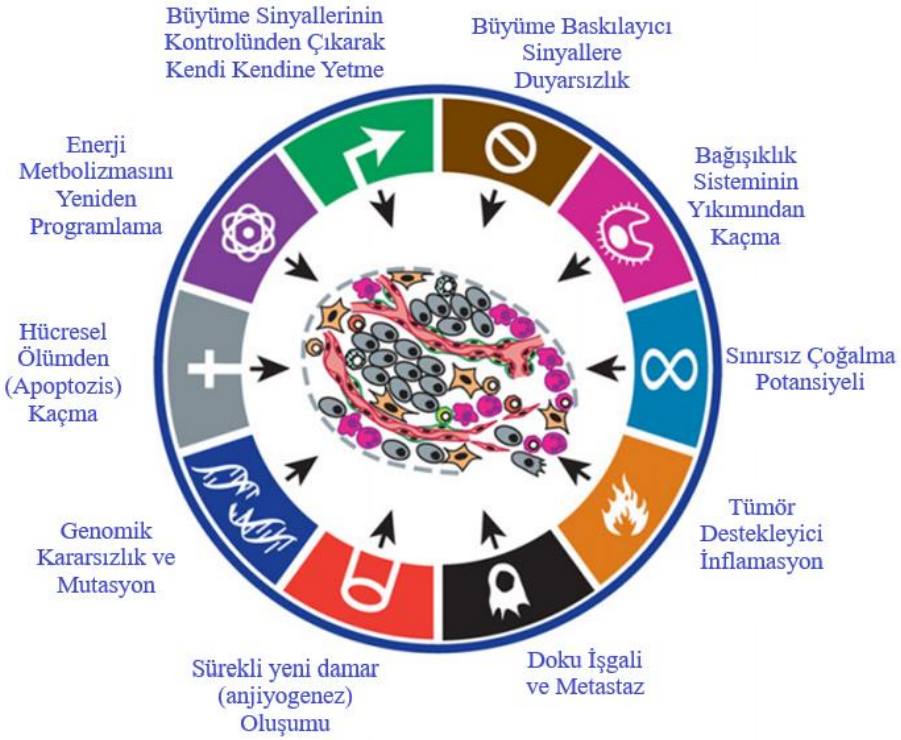
Kanser, ülkemizde ve dünyada ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra en yaygın görülen hastalıktır. Dünyada yaklaşık her altı ölümden, ülkemizde ise beş ölümden birinin altında yatan nedenin kanser olduğu görülmektedir [1, 2]. Kanser hastalığının yol açtığı ölümlerin yaklaşık üçte biri; beden kütle indeksinin fazlalığı, yetersiz beslenme, fiziksel aktivitenin azlığı ve zararlı madde (alkol, tütün vb.) kullanımından kaynaklanmaktadır. Zararlı maddelerin kullanımı kanserde en önemli risk faktörüdür ve ölümlerin yaklaşık %22'sini oluşturur. Günümüzde kanserin önlenebilirliği konusunda birçok çalışma bulunmaktadır. Risk faktörlerinden kaçınmak kanserden korunmanın yollarından sadece biridir. Birçok kanser türünde erken teşhis konulmuş ve kanser hücresine istenilen şekilde müdahale edilmişse iyileşme olasılığı yüksektir [1].

Dünya nüfusunun devam eden artışı, yaşlanması ve etiyolojik faktörler ile birlikte kanser insidanslarındaki artış nedeniyle, gelecekte kanser insidansında daha da büyük artışlar öngörülmektedir [1, 3]. 2015 yılında Türkiye'de yaşa bağlı kanser ilerleme hızı oranı; kadınlarda ortalama yüz binde 177,5 erkeklerde ise ortalama yüz binde 247,6 olarak tespit edilmiştir. Kadın ve erkekler birlikte değerlendirildiğinde toplam kanser insidansı ise ortalama yüz binde 212,6'dır. Son 5 yıla ait araştırma sonuçlarına göre; erkeklerde kanser sıklığında azalma görülürken, kadınların durumu sabit kalmıştır [4]. Türkiye 2015 kanser verileri: Dünya, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na (IARC) üye 24 ülke, Avrupa Birliği üyesi 28 ülke ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en son kanser verileri 2012 yılı olduğu için o yıl ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; Türkiye'de genel kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansından yüksek iken kadınlarda biraz daha düşüktür. Ülkemizde görülen kanser türlerinden ilk beşi diğer

ülkelerdeki durum ile benzeşmektedir. Kadınlarda meme kanseri; erkeklerde ise bronş, akciğer ve trakea kanseri en çok rastlanan türlerdir [4].

Kontrolsüz bölünmeyle sürekli çoğalan hücreler, dokularda kümelenmiş tümörleri oluşturmaktadır. Oluşan tümörlerin yayılıp yayılmamasına göre kanser iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar benign (iyi huylu) tümörler ve malign (kötü huylu) tümörlerdir. Hücreler kanserli değilse tümör benign olarak adlandırılır. Benign tümörler yakındaki dokuları istila etmeyen veya vücudun diğer bölgelerine yayılmayan (metastaz) tümörlerdir. Benign bir tümör önemli organların, dokuların, sinirlerin veya kan damarlarının yakınında bulunmadığı ve hasara neden olmadığı sürece daha az zararlıdır. Benign tümör çok büyüyebilir, bazen kilo ağırlığında olabilmektedir. Beyinde ve kafatasının etrafındaki normal yapılarda oluştuklarında tehlikeli olabilirler. Bu tehlike hayati organlara zarar verme, kanalları tıkayabilme gibi özelliklerden kaynaklanmaktadır. Bu tümörler ameliyatla çıkarılabilir ve genellikle bir kez alındıklarında tekrar ortaya çıkmazlar. Malign tümörler; kanserli hücrelerin, kan ve lenf sistemiyle vücudun diğer bölgelerine metastazı ile oluşmaktadır. Örneğin, meme kanseri meme dokusunda başlar ve tedavi edilmezse koltuk altındaki lenf düğümlerine yayılabilir ve kemikler veya karaciğer gibi vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapabilir. Bu kanser hücreleri metastaz yaptıkları bölgelerde ikincil tümör olarak adlandırılan yerlerde tümör oluşturabilir. Bu ikincil tümörler vücuttaki uzak bölgelere yayıldığından dolayı, ameliyat ile uzaklaştırılması ve hastalığın tedavisini güçleştirmektedir [5].

Karsinogenez terimi, normal hücrenin bir kanser hücresine dönüşümde geçirdiği değişiklikleri kapsayan sürecin tamamını ifade etmektedir. Bu süreçle ilgili Hanahan ve Weinber 2000 yılında kanser hücresini normal bir hücreden ayıran 6 özellik belirlemişlerdir. 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada ise kanserleşme sürecine neden olan 4 ilave özellik daha tespit edilmiştir [6]. Bu özellikler Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *Kanser hücresine has özellikler (Hanahan ve Weinberg, 2011)*

1.3. Kanser ve Hücre Döngüsü

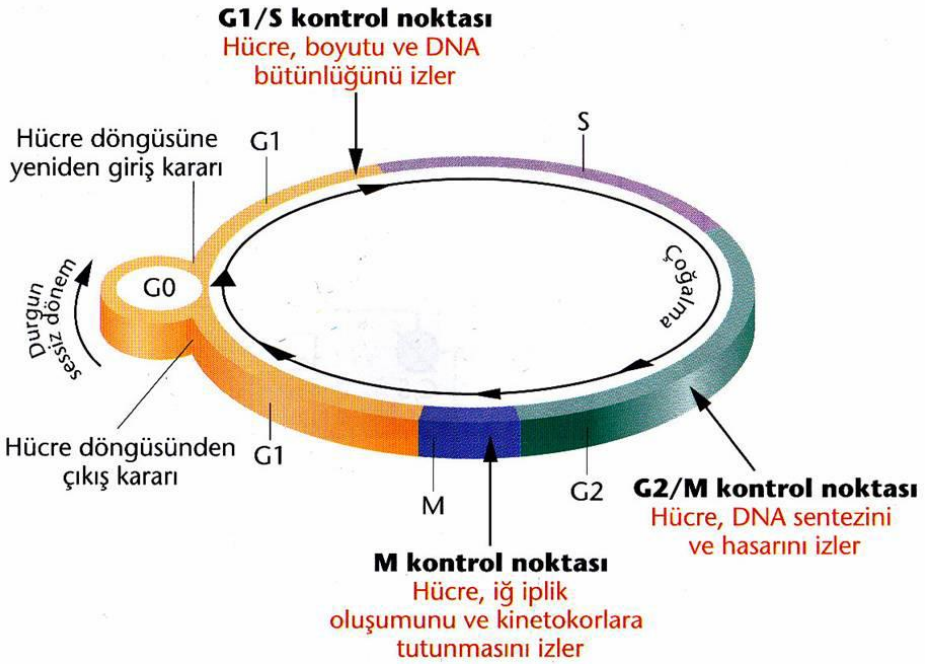
Kanserin oluşumunu daha iyi anlamak için hücre döngüsünün ve kontrol noktalarının incelenmesi gerekmektedir. Hücre döngüsü ve fazları ilk kez 1951 yılında Howard ve Pele tarafından açıklanmıştır [7].

Hücre döngüsü; G0, İnterfaz (G1, S, G2) ve Mitoz (M) fazlarını içermektedir. G0 fazında farklılaşmış hücreler aktif metabolizmalarına rağmen büyüme faktörü ile uyarılana kadar büyüyemez ve bölünemezler. İnterfazın G1 fazında DNA replikasyonu için hazırlıklar başlar ve protein sentezi gerçekleşir. S fazında DNA miktarı iki katına çıkarak G1 fazındaki hazırlığa göre DNA replikasyonu gerçekleşmektedir. G2 fazında da hücre büyümesi sürdürülürken eş zamanlı olarak mitoz aşamasına hazırlık gerçekleştirilmektedir. Mitoz fazında hücre bölünmesi; profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz alt evreleri dahilinde gerçekleşmektedir [8, 9]. Mitoz aşamasının tamamlanması ile bir hücre döngüsü tamamlanmış olmaktadır [10].

Sonuç olarak birbirinin aynısı iki yeni hücre oluşmaktadır. Devamlı olarak bölünen hücreler, hücre büyümesini durduran sinyalleri alana kadar çoğalmaya devam etmektedir. Eğer hücre çoğalması durur ise bölünmekte olan hücre G0 fazına geçmektedir [11]. Bu durum kanser hücreleri için geçerli değildir. Kanser hücreleri G0 fazına girmezler ve büyüme sinyalinin kontrolünden çıkarlar. Bunun dışında kanser hücreleri çevredeki hücrelerden gelen sinyallere de tepkisizleştiklerinden dolayı (kontakt inhibisyon eksikliği) kontrolsüz şekilde çoğalabilmektedirler.

1.3.1. Hücre döngüsü kontrolü ve kontrol noktaları

Hücre döngüsündeki faz geçişlerinin istenilen şekilde gerçekleşip gerçeklemediğini denetleyen, siklinler ve siklin bağımlı kinaz proteinleri vardır. Bu proteinler hücre döngüsünü üç farklı noktadan denetlemektedir. Bu noktalar Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. *Hücre döngüsü boyunca hücrenin izlendiği kontrol noktaları ve hücrenin çoğalma kontrol noktaları (Klug, Cummings ve Spencer, 2011)*

1.3.1.1. *G1/S kontrol noktası*

Hücrenin uygun boyuta ulaşıp ulaşmadığı, DNA'nın kendini düzgün eşleyip eşlemediği veya DNA'da hasar olup olmadığı, protein ve enzimlerin yeterince üretilip

üretilmediği kontrol edilmektedir. Bu aşamalardan sadece birisi bile başarıyla gerçekleşmemiş ise S evresine geçiş engellenmektedir. Bölünmeye elverişli koşullar yeniden sağlandığında hücre döngüsü, kontrol noktasından bölünmenin devam ettirilmesi yönünde sinyal oluşmaktadır.

1.3.1.2. *G2/M kontrol noktası*

Mitoz fazına kadar olan aşamaların kontrolü bu noktada gerçekleştirilir. DNA replikasyonu istenilen biçimde tamamlanmadıkça mitozun başlamasını sağlayan sinyaller bu kontrol noktasından gönderilmemektedir. DNA kontrolü ve replikasyonu tamamlandığında hücre döngüsünün devamı bu kontrol noktasından sağlanmaktadır.

1.3.1.3. *M kontrol noktası*

M kontrol noktasında iğ ipliklerinin meydana gelmesi ve bu ipliklerin kinetokorlar sayesinde sentromere tutunması kontrol edilmektedir [11]. Kinetokorda bir hasar meydana gelir veya kromozomların bağlanması sırasında bir hasar oluşursa hasar düzeltilene kadar M kontrol noktasından gönderilen sinyal ile mitoz fazı metafaz evresinde durdurulmaktadır.

Hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan proteinler siklinler (cyc), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) dir. Günümüzde 11 çeşit siklin bağımlı kinaz ve 16 çeşit siklin bulunduğu tespit edilmiştir. Siklinler hücre döngüsünün bazı evrelerinde sentezlenmektedir. G1 fazının başlangıcında siklin-D, geç G2 ve S fazında siklin-E, S fazının başlangıcından G2 fazının sonuna kadar siklin-A, G2 ve M fazında siklin-B sentezlenmektedir [12]. Temel olarak siklinlerin ortak görevleri siklin bağımlı kinazları aktive etmektir. Siklin ve siklin bağımlı kinaz kompleksinin rolü hücre döngüsü aşamalarında görev alan proteinlerin fosforilasyonunu sağlayarak döngünün ilerlemesini kontrol etmektir [13]. Herhangi bir siklin ile birleşerek kompleks oluşturmayan siklin bağımlı kinazlar aktifleşememektedir. Siklin bağımlı kinazların her biri farklı bir siklin ile bağlanır ve bu yapı proteinlerin hangisinin fosforile edileceğinin tespitini gerçekleştirmektedir. [12, 14, 15]. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ise oluşan siklin ve siklin bağımlı kinaz yapısını denetleyerek döngüyü G1/S kontrol noktasında durdurmaktadır. Genel olarak hücre döngüsünü kontrol eden genlerin herhangi birinde meydana gelen mutasyon veya yanlış anlamlandırma kanser gelişimine sebebiyet vermektedir [11].

Kanser hücrelerinin temelinde tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenlerin mutasyona uğraması ya da yanlış ifade edilmesi bulunmaktadır (Bkz. Tablo 1.1.).

1.3.2. Protoonkogenler

Protoonkogenler; hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma gibi sinyal iletim mekanizmasında görev alan birden fazla proteinin sentezlenmesinden sorumludurlar [16]. Büyüme düzenlemesini denetleyen proteinleri sentezleyen bu genler mutasyona uğradığında onkogene dönüşmektedirler [11, 16]. Bunların onkogene dönüşmesi hücre büyümesine ait kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonuna, aynı zamanda da istenmeyen kontrolsüz hücre büyümelerine neden olmaktadır [16, 17]. Onkogenler hücre çoğalmasını uyarma özelliğini taşımaktadır. Tümör dokusunda çok sayıda veya farklılaştırılmış biçimde ifade edilen, kontrol edilemeyen hücre proliferasyonuna neden olmaktadır. Buna ilaveten bu genler otozomal dominant özelliktedirler ve isimlendirmeleri proteinlerinin önüne c harfi getirilerek gerçekleştirilmektedir [11, 18].

1.3.3. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genlerin temel iki özelliği; hücre döngüsüne ait kontrol noktalarını düzenlemesi ve programlı hücre ölümünü indüklemesidir. Normal hücrelerde tümör baskılayıcı genler ile kodlanmış proteinler, DNA hasarına veya dışarıdan gelen büyüme baskılayıcı sinyallere tepki olarak hücre döngülerini durdurabilmektedir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyon ise tümör oluşumuna neden olmaktadır [11].

Tümör baskılayıcı genler, ilk kez kalıtsal kanser türlerinde tespit edilerek tanımlanmıştır. Bunlarda ilk tanımlanan ise retinoblastomadır (Rb). Normal hücrelerde Rb geni heterozigottur. Rb geni normal kopyalarının ikisininde kaybı sonucu hücrelerin kanser hücresine dönüşmesi meydana gelmektedir. Bu sebeple diğer kanser baskılayıcı genler ile birlikte genellikle çekinik kanser genleri olarak bilinmektedir. Kalıtsal olarak aktarılan tümör baskılayıcı genlerdeki istenmeyen değişiklikler çocukluk çağında tümör insidansının artmasına neden olabilmektedir. Ayrıca tümör baskılayıcılarını şifreleyen bölgedeki normal allellerin kaybı veya aktifliğini yitirmesi çocukluk ve erişkin dönem kanserlerinin oluşumunu tetikleyebilir [16, 19, 20, 21].

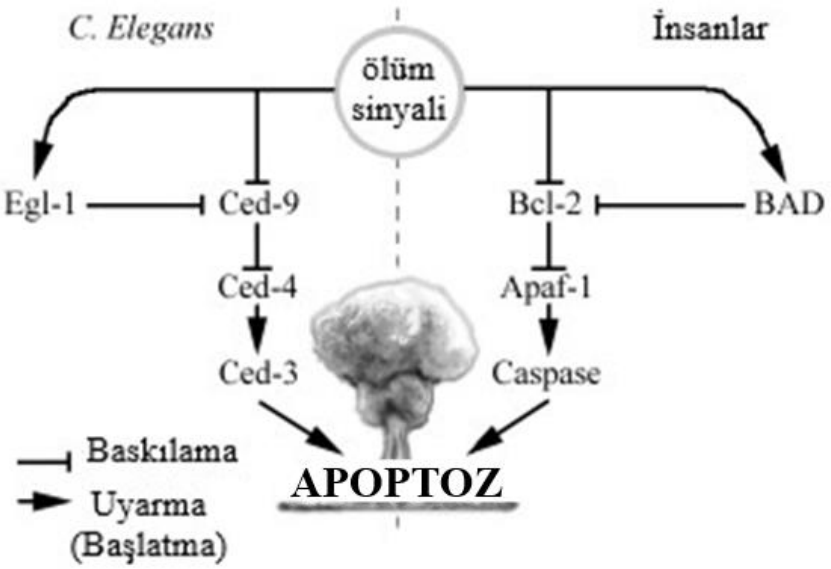
Tablo 1.1. *Karsinogenezle ilişkilendirilen bazı proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (Klug, Cummings ve Spencer, 2011)*

Proto-onkogen	**Genel Fonksiyonları**	**Kanserde Yaptığı Değişiklik**	**İlgili Olduğu Kanser Hastalıkları**
H-ras	Sinyal iletimi yapan molekül GTP ve GDP'ye bağlanır	Nokta mutasyonları	Kolorektal, mesane ve pek çok kanser tipi
c-erbB	Transmembran büyüme faktörü reseptörü	Gen çoğalımı, nokta mutasyonları	Glioblastomalar, meme kanseri ve serviks kanseri
c-myc	Transkripsiyon faktörü, hücre döngüsünü, farklılaşmayı ve apoptozisi düzenler	Translokasyon, nokta mutasyonları, amplifikasyon	Lenfoma, lösemi, akciğer kanseri ve pek çok kanser tipi
c-kit	Tirozin kinaz, sinyal iletimi	Mutasyon	Sarkomalar
RARα	Hormona bağımlı transkripsiyon faktörü	Kromozomal translokasyonlar, füzyon ürünü	Akut promiyelositik lösemi
E6	İnsan papilloma virüsü tarafından kodlanan onkogen, p53'ü inaktive eder	HPV infeksiyonu	Servikal kanser
CDK 2,4	Siklin bağımlı kinazlar, hücre döngüsü fazlarını düzenler	Aşırı ifade, mutasyon	Mesane, meme ve pek çok kanser tipi
Tümör Baskılayıcı Gen	**Genel Fonksiyonları**	**Kanserde Yaptığı Değişiklik**	**İlgili Olduğu Kanser Hastalıkları**
p53	Hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptozis	Viral onkogenlerin ürünleri ile inaktivasyon, Mutasyon	Akciğer, meme kolorektal kanseri ve dahası
RB1	Hücre döngüsü kontrol noktaları	Viral onkogen ürünleri ile inaktivasyon, Mutasyon, Delesyon	Osteosarkoma, Retinoblastoma
APC	Hücre-hücre etkileşimi	Mutasyon	Kolorektal kanser, tiroid
Bcl2	Apoptozis düzenlemesi	Fazla ifade edilmesi apoptozisi durdurur	Lösemi, Lenfoma
BRCA2	DNA tamiri	Nokta mutasyon	Yumurtalık, prostat, meme kanserleri

1.4. Apoptoz ve Kanser

Kerr, Wyllie ve Currie'nin 1972 yılında yapmış oldukları çalışma ile fizyolojik hücre ölümünü ifade eden "apoptoz" terimi bilim dünyasına kazandırılmıştır. Kontrolsüz ve pasif bir hücre ölüm tipi olan nekrozun aksine apoptoz; aktif, kontrollü, morfolojik değişikliklerle ilerleyen çeşitli fizyolojik koşullarla başlatılan ve engellenen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır [22]. Yaprakların ağaçtan düşmesini tanımlayan apoptozis terimi, Yunanca apo (ayrı), ptozis (düşmek) kelimelerinin birleşimi ile oluşmuş ve günümüzde de bu şekilde kullanılmaktadır. Genetik kaynaklı hücre tahribatının önlenmesi ya da hücrenin her anlamda ortadan kaldırılması çok hücreli organizmalarda apoptoz aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu şekli ile tümör oluşumu ve canlı dokudaki hasarın diğer dokulara yayılması gibi zararların önüne geçilmiş olunmaktadır [23]. Bir diğer tabir ile apoptoz organizmanın yararına çalıştığından kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlayan bir sistemdir. Bu nedenle neredeyse tüm kanser hücreleri normal apoptotik sürece uğramayacakları bir özellik kazanmayı amaçlar. Tümör hücreleri; antiapoptotik proteinleri istenilenden fazla yaparak, proapoptotik proteinlerin yapımlarının veya etkinliklerinin azalmasını sağlayarak apoptoza karşı dirençlilik geliştirmektedirler [24].

Memeli hücrelerinde apoptozun moleküler mekanizması hakkındaki bilgilerin çoğu *Caenorhabditis elegans* türü nematod kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu türde gelişme sırasında üretilen 1090 somatik hücrenin 131'i apoptoz geçirmektedir [26]. Bu hücre ölüm şekli üç temel genin (Ced-3, Ced-4, Ced-9) işleyişine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Nematodlarda apoptozun meydana gelmediği durumda Ced-3 ve Ced-4 genlerinin mutasyon ile aktifliğini kaybettiği ayrıca normalde ölmesi beklenen hücreler yaşamlarını sürdürdüğü görülmüştür. Bu nedenle Ced-3 ve Ced-4'e ölüm genleri olarak adlandırılıp apoptozu indükledikleri, Ced-9'un ise ölüme karşı koruyan gen olarak adlandırılıp apoptozu inhibe ettikleri tespit edilmiştir [25]. Bu üç genin klonlanması, insanlar dahil olmak üzere diğer türlerde homologların varlığını göstermiş ve insanlarda homologlar; Ced-3 için kaspazlar, Ced-4 için Apaf-1 ve Ced-9 için Bcl-2 olarak tanımlanmıştır (Bkz. Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. *Caenorhabditis elegans'ta apoptozu kontrol eden Ced genlerinin insanlarda karşılığı (Vaskivuo, 2002)*

Apoptoz sürecinde üç temel protein bulunmaktadır. Bu proteinler; kaspazlar, Bcl-2 ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) dir. Apoptoziste görülen; çekirdek zarındaki kırılmalar, mitokondrideki hasar, DNA fragmentasyonu, apoptotik cisimlerin şekillenmesi, kromatinin yoğunlaşması gibi değişik morfolojik farklılıklarının sebebi bunların biyokimyasal aktivasyonudur [30].

Programlı hücre ölümü olarak da ifade edilen apoptoz, hücre içi veya dışından gelen sinyaller ile indüklenen, peşpeşe meydana gelen olaylar zinciridir ve sürecin en sonunda fagositoz gerçekleşmektedir [31].

Apoptoz aşamaları:

1) Apoptozun başlaması,

2) Hücre içi kaspazların aktifleşmesi,

3) Hücrede farklı morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin görülmeye başlaması,

4) Sonuçta fagositozun gerçekleşmesidir [31] (Bkz. Şekil 1.4.).

Şekil 1.4. *Apoptoz aşamaları (Öztürk, 2002)*

1.4.1. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

Apoptoz yoluyla ölmekte olan hücre, hem yapısal hem biyokimyasal olarak hızlı değişiklikler geçirmektedir. Apoptozda görülen en temel morfolojik değişiklik hücre çekirdeğinin yoğunlaşarak parçalara ayrılmasıdır. Apoptozun gerçekleşme şekli şöyle olmaktadır; önce morfolojik olarak hücre komşu hücrelerden uzaklaşır, yuvarlak hale gelir, psödopodları geri çekilir, kromatin yoğunlaşır ve sonra çekirdek ayrılması meydana gelir. Çekirdek membranına yakın yerlerde yoğunlaşan kromatinler elektron mikroskobu aracılığıyla bakıldığında yarım ay, hilal (yüzük) şeklinde görülmektedir.

Sitoplazmik organellerde küçük modifikasyonlar oluşurken plazma membranında kabarcıklar şekillenmektedir. Hücrenin tomurcuklar şeklinde bulunduğu yerden ayrılması (apoptotik cisim) komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tespit edilip fagositoz başlatılmaktadır [22]. İmmun elektroforezde 'ladder pattern' olarak tanımlanmış merdivene benzeyen görüntü dikkat çekmektedir [27]. Normal bir hücrede peş peşe 7 kırılma düzeltilebilinirken, apoptoz da yaklaşık 300000 kırılma oluşmakta ve hücre onarımı gerçekleştirilememektedir [28]. Anlaşılacağı gibi apoptozda hasar gören hedef yapı hücre çekirdeğidir fakat nekrozda hasara uğrayan hedef yapı hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir. Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılıp farklılaşmış yüzey organellerini kaybetmektedirler. Dakikalar içerisinde şekillerinde büzülme ve hacimlerinin üçte birinde kayıp görülmektedir. Bu görünümün

iyon kanallarındaki aktivasyonun bozulmasından ve plazma membranındaki pompalardan kaynaklanıyor olabileceği belirtilmektedir. Apoptotik hücreli dokulardan elde edilen bölümler ışık mikroskobunda incelendiğinde açık renkli bir parlama gibi gözükmektedir [28]. Apoptotik hücrelerin tanınması ve yok edilmesinin ana sebebi plazma membranındaki değişikliklerdir [29].

Apoptoz ve nekroz ile hücre ölümü başlıca; yol açan nedenler, morfolojik özellikleri, biyokimyasal özellikleri açısından önemli farklılıklar göstermektedir. Bu iki farklı hücre ölümü Coşkun ve Özgür tarafından 2011 yılında Tablo 1.2.'deki gibi özetlenmiştir.

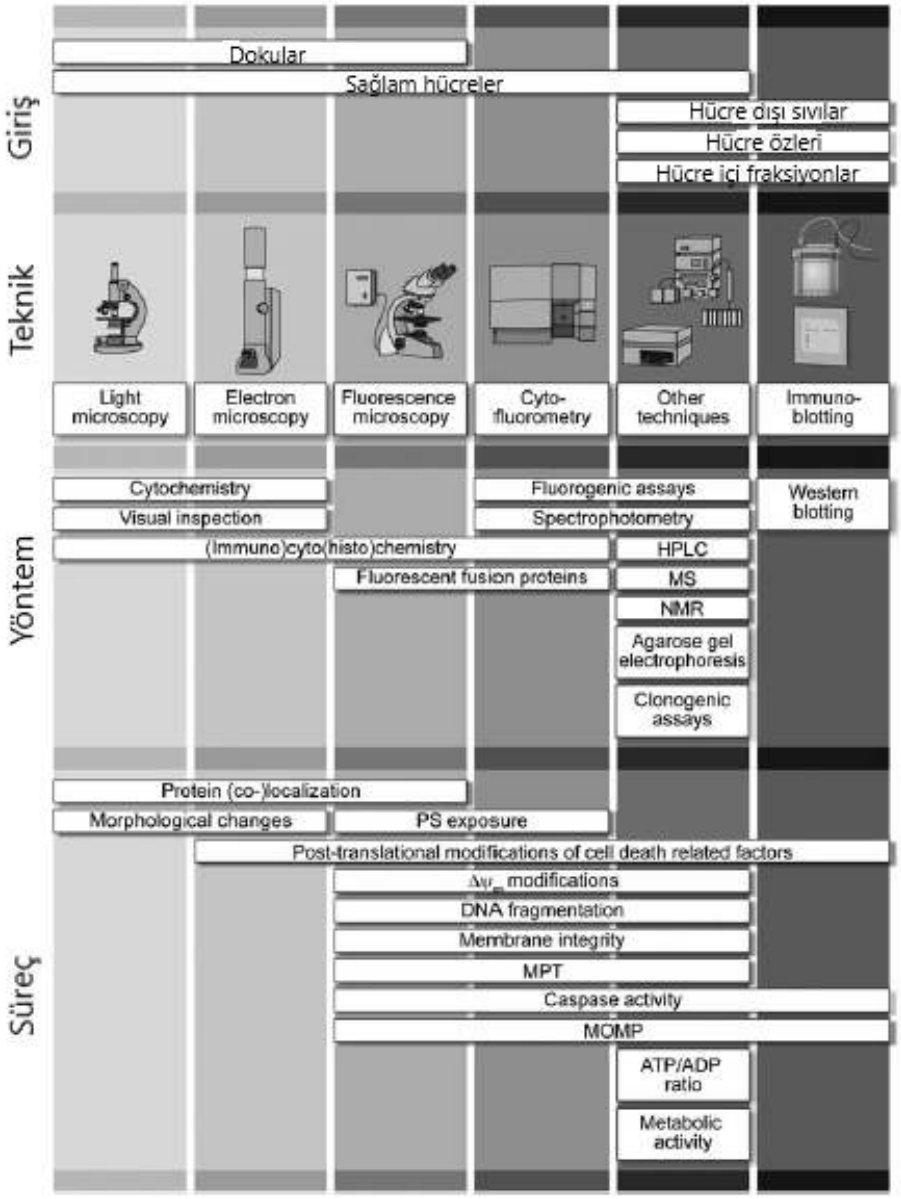
Tablo 1.2. *Apoptoz ve nekroz'un kıyaslanması (Coşkun ve Özgür, 2011)*

ÖZELLİK	APOPTOZ	NEKROZ
Yol Açan Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması , HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stress
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organellerin parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin Tanslokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Enflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.

1.4.2. Apoptozun mikroskobik olarak belirlemesi

Morfolojik farklılıklara bakılarak belirlenen apoptoz ilk kez 1980'lerin sonuna doğru DNA kırıklarının da tespit edilmesiyle birlikte farklı yöntemlerin kullanılma gerekliliğini ortaya çıkarmıştır [33, 34]. 1990'lı yılların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği tespit edilmiştir. Böylece kaspazların aktifleşmesinin belirlenmesini sağlayan ve fosfotidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemler 1990'ların sonuna doğru uygulanmaya başlanmıştır. 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu tespit eden antikorların kullanılmasıyla daha belirgin tespitler sağlanmıştır [32].

Günümüzde hücre ölümüyle ilgili parametreleri izlemek için çeşitli teknikler vardır. Bu çeşitli metodlar içinde, en uygun tekniklerin seçimi ve sonuçların doğru yorumlanması, hücre ölümüyle ilgili herhangi bir çalışmanın başarısı için kritik öneme sahiptir. Burada, ölü/ölen hücreleri tespit etmek için en yaygın prosedürler, uygulanması için gerekli teknik altyapılar ve uygulanabilecekleri örnek tipleri ile birlikte Şekil 1.5. üzerinde belirtilmiştir [35].



Şekil 1.5. *Hücre ölümü ile ilgili değişkenleri saptama yöntemleri (Galluzzi, Aaronson, Abrams ve diğerleri, 2009)*

1.4.2.1. *Konfokal mikroskop ile apoptozun belirlenmesi*

Bu inceleme, bir tür konfokal mikroskop ve floresan malzemeleri (propidyum iyodür, DAPI, Hoechst Boyası) kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Floresan boyar maddeler, DNA'ya bağlanma özelliği gösterdiğinden hücre içindeki kromatin görünür hale gelir. Böylece çekirdek rahatlıkla görülebilecek hale gelmektedir. Hücre kültürü çalışmasında kullanıldığında, ölü hücre ile canlı hücrenin ayrılmını sağlamaktadır. Tüm

hücreler Hematoksilen ve Giemsa boyamasındaki boyama aşamaları nedeniyle ölebilmektedir. Birlikte kullanılan boyalardan Hoechst ile canlı/ölü hücreler boyanırken Propidyum İyodür sadece ölü hücreleri boyayabilmektedir. Bunlar ölü ve canlı hücreler arasında ayrım yapmak için kullanılmaktadır.

Bu yöntemlerde hücre zarının bütünlüğünün belirlenmesi hücrenin canlılığının belirleyicisidir. Canlı hücrelerin zarları bir bütün olduğundan dolayı Propidyum İyodür ile boyanmazken, bütün hücreleri boyayabilen Hoechst boyası ise canlı ve ölü hücreler arasında farklılaşmanın belirlenmesini sağlamaktadır. Kullanılan boyama yöntemi sayesinde boyanan hücreler mikroskop ile saptanabilir hale gelmektedirler. Çekirdek morfolojisine bakılarak ölü hücrelerin apoptoz ile mi yoksa nekroz ile öldükleri ayırt edilebilmektedir [36, 37]. Ayrıca hücre iskeleti ve çekirdek morfolojisi tespiti için falloidin ve akridin oranj boyamaları yapılabilmektedir.

Hücrelerin ayırt edilmesinde dikkat edilen kıstaslar:

- Hoechst ve Propidyum İyodür boyalarının her ikisi ile de boyanan, nükleuslarından apoptozis göstergesi saptanmayan hücreler nekroz ile ölmüş hücrelerdir [36, 37, 38].

- Propidyum İyodür ile boyanmayıp Hoechst Boyası ile boyanan ikincil nekrotik değişiklik göstermeyen belirgin apoptotik çekirdek yapısına sahip ve hücre membran bütünlüğü korunmuş hücreler apoptoz yolu ile ölmüş hücrelerdir [36, 37, 38].

- Hoechst Boyası ile boyanıp Propidyum İyodür ile boyanmayan normal nukleus yapısına sahip, membran bütünlüğü de korunmuş sağlam ve canlı hücrelerdir [36, 37, 38].

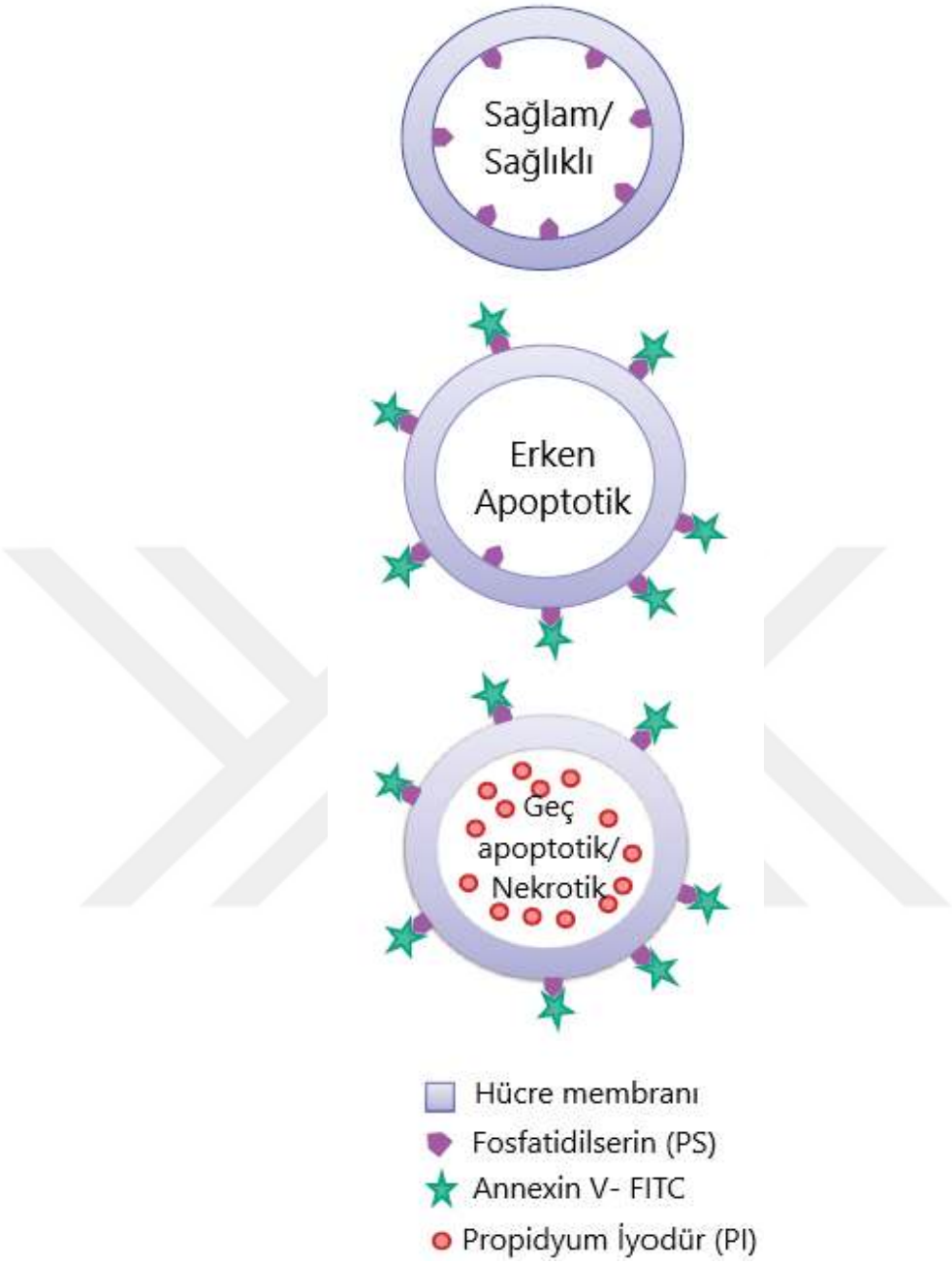
1.4.2.2. *Geçirimli Elektron mikroskop ile apoptozun belirlenmesi*

Elektron mikroskobik değerlendirmesi ile apoptozun belirlenmesinde tüm morfolojik ve ince yapısal değişiklikler ayrıntılı olarak görüntülenebildiği için en kullanışlı ve güvenilir yöntem olarak kabul görmüştür. Bunun yanı sıra mitokondrinin, çekirdek/hücre membranının bütünlüğünün durumu da bu yöntem ile tespit edilebilmektedir. Morfolojik olarak en önemli değişiklikler çekirdekte görüntülenmektedir. Kromatinin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çökmesi gözlenmektedir. Hücre zarı ya da çekirdek membranının bütünlüğünün bozulup bozuImadığı, mitokondrinin durumu gibi

subselüler detaylar da incelenebilmektedir. TEM ile yapılan çalışmalarda çekirdek fragmentasyonu net bir biçimde görülebilirken, normal hücreyle karşılaştırıldığında apoptotik hücrede sitoplazmik küçülme, kromatin kondenzasyonu ve fragmentasyonu görülmektedir. Elektron mikroskobik incelemede kromatinin yoğun granüler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği görülmektedir. Çekirdek de hücre gibi büzüşmekte ve parçalanabilmektedir [41, 42]. Ayrıca mitokondri başta olmak üzere endoplazmik retikulum gibi diğer hücre organellerinin morfolojisindeki değişiklikler de detaylı olarak tespit edilebilmektedir.

1.4.3. Anneksin V yöntemi ile apoptozun belirlenmesi

Anneksin V histokimyasal bir apoptoz belirleme yöntemidir. Normal hücrelerde fosfatidilserin hücre zarına ait sitoplazmik yüzeyde bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normal olarak iç yüzde yerleşik bulunan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzeyine geçmektedir. Dış yüzeye geçmiş olan fosfatidilserin molekülleri yer değiştirmiş olan floresan madde (F1TC gibi) ile işaretlenmiş anneksin V kullanılmasıyla görünür hale getirilir. Bu sayede apoptotik hücreler tespit edilmektedir [39, 40]. Anneksin V ile birlikte Propidyum İyodür (PI) boyası erken ve geç apoptotik hücrelerin ayırt edilmesi için kullanılmaktadır. Hücreler ölü/geç apoptotik evredeyse PI ile boyanır, canlı veya hasar görmüşse/erken apoptotik evredeyse PI ile boyanmaz yani boyaya karşı geçirgen özellik göstermektedir [57]. Bu durum Şekil 1.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. *Sağlam ve apoptotik hücreleri gösteren diyagram (Hingorani, Deng, Elia, McIntyre ve Mittar, 2011)*

1.4.4. Kaspazların apoptozdaki rolü

Günümüzde apoptozun tespiti morfolojik görüntüleme ile oldukça kolay olsa da apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. Bunlardan birisi kaspaz aktivasyonlarıdır. İçsel ve dışsal sinyallerle hücre içinde bir grup proteaz aktifleşmektedir. Bu proteazlar kaspaz (Caspase: ***C***ysteine-Containing **Asp**artate Specific Prote**ase**s) olarak bilinmektedir. Kaspazlar inaktif olarak (zimojen/prokaspaz) sitoplazmada bulunmaktadır. Aynı zamanda aktif merkezlerinde sistein bulundurdukları için sistein proteazlar olarak adlandırılan enzim gruplarıdır. Kaspazlar birbirlerinin aktivasyonunu sağlayarak kaspaz aktivasyon serisinin oluşumuna sebep olmaktadırlar. Kaspaz 8, Kaspaz 9 gibi bazıları başlatıcı kaspazlar olarak tanınırken, Kaspaz 3, Kaspaz 7 gibi bazıları da apoptozu yürüten (efektör) kaspazlar olarak tanınmaktadır. Hücrenin apoptotik uyarıyı fark etmesi ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar sonrada efektör kaspazları aktifleştirmektedir. Aktifleşmiş efektör kaspazların görevi kendisi ile ilişkili proteinleri parçalamaktır. Bunun sonucunda alışılagelmiş apoptotik hücre morfolojisi oluşmaktadır. Apoptotik hücre morfolojisinde hücre iskeletinin ana bileşeni aktin filamanları yıkıma uğrar ve bu yıkımdan dolayı hücre alışılmış şeklini kaybolmaktadır [39].

1.5. Deneylerde Kullanılan H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 Hücreleri

1.5.1. NIH/3T3 hücresinin kökeni ve kullanım alanları

NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücreleri, 1962'de New York Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda izole edilen bir hücre hattından başlatılmıştır. Bu hücre hattını ilk kez kültürleyen bilim insanları George Todaro ve Howard Green, hücreleri ayrıştırılmış NIH İsviçre fare embriyo fibroblastlarından elde etmiştir. Hücre çizgisi o zamandan beri standart bir fibroblast hücre çizgisi haline gelmiştir. 3T3 hat için hücre transferi ve aşılama protokolünü ifade etmektedir ve "3 günlük transfer, 3 x 105 hücre aşılama" anlamına gelmektedir. Bu protokolü kullanarak, ölümsüz hücre çizgisi yaklaşık 20-30 jenerasyon *in vitro* gelişimden sonra hücre kültüründe gelişmeye ve stabilize olmaya başlamaktadır. En yaygın kullanılan hücre hatlarından biri olan NIH/3T3 hücre hattı, protein fonksiyonel analizi de dahil olmak üzere bir dizi mekanik ve hücre bazlı analiz için yapılan çalışmalara dahil edilmiştir. Hücrelerin morfolojisi yapışık, fibroblastik ve büyümesi kolay hücre hatları arasında olduğu kabul

edilmektedir. Ayrıca NIH/3T3 hücrelerinin iki katına çıkma süresi 20-26 saattir [43, 44].

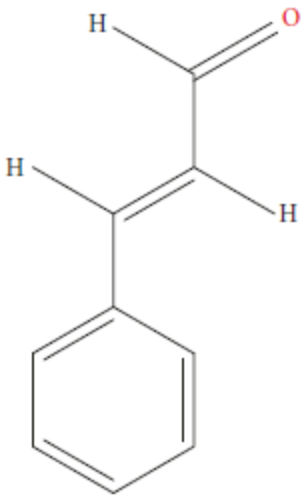
Fare embriyonik fibroblast NIH/3T3, bir murin embriyonik fibroblast hücresi türüdür (MEF). MEF'ler genellikle insan embriyonik kök hücre araştırmalarında besleyici hücreler olarak ve farklılaşmamış durumda embriyonik kök hücrelerin bakımı için kullanılmaktadır. Besleyici hücreler, diğer kültürler için bazal bir tabaka görevi görür ve kök hücreler de dahil olmak üzere diğer hücre tiplerinin beslenmesini ve çoğalmasını desteklemek için kullanılmıştır. Besleyici hücrelerin hücre katmanları bölünemez ancak hedef hücrelerin büyümesini destekleyen kültür ortamına büyüme faktörü salgılarlar. MEF hücre çizgisi, sıklıkla hücre ve moleküler biyoloji araştırmalarında transfeksiyon konakçısı olarak kullanılan, memeli embriyonik dokusuyla ilgili çalışmalar için mükemmel bir konaktır. Pek çok çeşitli MEF hücre çizgisi biraz farklı özellikler gösterir. MEF hücreleri ayrıca laboratuvar çalışmalarında fare organlarından ve dokularından virüs titrasyonu için kullanılmaktadır [44].

1.5.2. H-ras 5RP7 hücresinin kökeni ve kullanım alanları

H-ras 5RP7 hücreleri *Rattus norvegicus*'un embriyonik dokularından izole edilip H-ras onkogeniyle transforme edilmektedir. Ras hücre farklılaşması ve çoğalmasından sorumlu onkogenlerden biridir. Ras mutasyonunun pankreas, tiroid ve kolon kanserleri gibi insan tümörlerinde meydana geldiği iyi bilinmekte olup Ras ailesine ait H-ras proteini kanser hastalıklarında rol oynamaktadır [45].

1.6. Sinnamaldehit'in Kimyasal Yapısı

Sinnamaldehit olarak da bilinen Trans-Cinnamaldehyde (C_9H_8O, moleküler ağırlık: 132,16 g/mol, saflık>99%), *Cinnamomum cassia*'nın kök kabuğundan izole edilmiş aktif bir bileşenlerinden biridir. Sinnamaldehit'in kimyasal yapısı Dutta ve Chakraborty tarafından Şekil 1.7.'deki gibi belirtilmiştir [46].



Şekil 1.7. *Sinnamaldehit'in kimyasal yapısı (Dutta ve Chakraborty, 2018)*

1.6.1. Sinnamaldehit'in özellikleri ve kanser hücreleri üzerindeki etkisi

Son yıllarda doğal biyoaktif bileşenler güçlü antikarsinojenik etkinlikleri ile dikkat çekmektedir. Tarihsel olarak en sık kullanılan baharatlardan biri olan tarçın, sağlığı arttırıcı potansiyelleri açısından yoğun bir şekilde araştırılmaktadır ve bunların arasında antikanser etkinliği birincil odak noktasındadır. Tropikal ülkelerde hemen hemen her evde en sık kullanılan geleneksel baharatlardan biri olan tarçının ve aktif bileşenlerinin (Sinnamaldehit, Sinnamikasit, 2-hidroksisinamaldehit, 2-metoksisinnamaldehit ve Öjenol) kanserle mücadelede büyük bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat tarçının antikarsinojenik potansiyeli, kanser türüne göre değişir. Ayrıca verilen aktif bileşiğe, bazı kimyasallarla kombinasyonuna hatta tarçın ekstraktına bağlıdır [46].

Tarçın ve bileşenleri, antikanser ve kanser önleme faaliyetlerini çeşitli mekanizmalar yoluyla sergilemektedir [52]. Bunlar:

(1) proliferasyon karşıtı,

(2) hücre ölümünün uyarılması,

(3) anti-anjiyojenez,

(4) antimetastaz,

(5) tümör destekli enflamasyonun baskılanması,

(6) immünomodülasyon,

(7) redoks homeostazının modülasyonudur [52].

Farklı çalışmalar tarçının farklı kanser hücrelerine karşı güçlü antiproliferatif potansiyelini göstermiştir. Tarçın ekstraktının önemli antiproliferatif etkisi, üç farklı hematolojik tümör hücre çizgisinde Jurkat, Wurzburg ve U937'de gözlenmiştir [47]. Hücre tiplerinin her biri, 24 ila 0,05 ile 0,2 mg / mL tarçın ekstresi (CE) doz aralığında tedavi edildiğinde, hücrelerin yüzdesinde doza bağlı bir azalma gösterse de, Würzburg hücreleri CE'ye karşı en yüksek hassasiyet göstermiştir. Bu, hücre proliferasyonunun kontrolünde tarçın hücresine özgü diferansiyel potansiyelini oluşturmaktadır. Rahim ağzı kanseri hücre dizisi SiHa ayrıca üç farklı sürede (24, 48 ve 72 saat) değişik konsantrasyonlarda CE (10, 20, 40 ve 80 μg / mL) muamele edildiğinde tarçın ekstraktının antiproliferatif etkisinin görüldüğü belirtilmiştir [48].

Tarçının aktif bileşenlerinden biri olan Sinnamaldehit'in 30 μM'lik konsantrasyonunun hücre proliferasyonunu, doza ve süreye bağlı, yaklaşık %71'ini baskıladığı bildirilmiş ve karaciğer kanseri hücre çizgisi HepG2 üzerinde güçlü antiproliferatif etki göstermiştir [49]. Benzer şekilde, Sinnamaldehitle muamele edilmiş olan PLC / PRF / 5 hücrelerinin (başka bir karaciğer kanseri hücre çizgisi), belirli süre (6, 12 ve 24 saat) ve konsantrasyona (0,1, 0,5, 1 ve 5 μM) bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir [49]. Başka bir *in vitro* çalışmada ise Sinnamaldehit'in HL-60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin, IC_{50} değeri 30,7 mM olarak bildirmiştir [51].

Apoptozda Sinnamaldehit'in etkisine bakıldığında ise aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır. Sinnamaldehit'in 40 μM konsantrasyonun HL-60 hücrelerinde DNA'nın internükleozomal fragmantasyonu ile birlikte kromatin yoğunlaşması ve çekirdeklerinin parçalanması yoluyla apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Prokaspaz-9 ve prokaspaz-3'ün proteolitik bölünmesinin önemli ölçüde artması, ardından kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinin artması, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı ve sitokrom c'nin sitozol içerisine salınması da bu grupta görülmüştür [46, 51]. Yapılan başka bir çalışmada Sinnamaldehit'in 30 μM konsantrasyonunda antiapoptotik protein Bcl-XL seviyesini zamana bağlı bir şekilde azalmış ve p53 ile birlikte proapoptotik protein Bax

seviyesini yükselterek, karaciğer kanseri hücresi HepG2 üzerinde belirgin antikarsinojenik etki göstermiştir. 24 saatlik Sinnamaldehit tedavisinden sonra Bcl-XL ekspresyonunun tamamen baskılandığı gözlenmiştir [49, 51].

1.7. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisite terimi hücre ölümüne sebebiyet veren anlamını taşımaktadır. Sitotoksisite testleri, kullanılan maddenin hücre ölümüne neden olup olmama potansiyelini belirlenme amacıyla gerçekleştirilmektedir[58].

Sitotoksisite testleri:

- MTT yöntemi [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]: MTT bileşiğindeki tetrazolyum tuzlarının formazana indirgenmesi sırasında oluşan rengin kolorimetrik olarak ölçümü ile gerçekleştirilen bir sitotoksisite testidir. Tetrazolyum halkasının kırılması sadece aktif haldeki mitokondri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple indirgenen formazan sayısı ile canlı hücre miktarı tespit edilmektedir [53].
- Tripan mavisi yöntemi: Negatif yüklü tripan blue boyası ile canlı olmayan hücrelerin boyanması ile görüntü elde edilmektedir.
- Sülforodamin B yöntemi: Fluoresan boyama esnasında kiton kırmızısı kullanılarak yapılmaktadır.
- Klonojenik yöntem: Mikrobiyolojik bir yöntemdir. Genellikle kanser araştırma laboratuvarlarında ilaçlar veya radyasyonun, tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması yapılırken kullanılmaktadır.
- WST yöntemi [2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu]: Bu yöntemde hücre proliferasyonu ve yaşama oranı kolorimetrik olarak tespit edilmektedir [58].
- XTT yöntemi [2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid]
- MTS yöntemi [3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum]

Kolorimetrik yöntemlerde temelde dört çeşit bileşik (MTT, XTT, MTS, WST) kullanılmaktadır. XTT, MTS, WST bileşikleri negatif yüklü oldukları için hücre

membranında geçemezler. Membrandan geçmelerini sağlayan fenazin etil sülfat, fenazin metil sülfat gibi elektron alıcılarının kullanılması gerekmektedir [57].

Sitotoksisite testlerinden en yaygın kullanılanı MTT kolorimetrik yöntemidir. Bu yöntemin avantajı; ELİZA plaka okuyucu sayesinde 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak aynı anda birden fazla örneğin analizinin gerçekleştirilebilmesi ve pozitif yüklü bir bileşik olduğundan hücre membranını kolayca geçebilmesidir [59].

1.7.1. MTT testi

MTT; hücre metabolizmasını, hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi *in vitro* koşullarda ölçmek amacıyla kullanılan kolorimetrik yöntemlerden biridir. Bu yöntem hızlı, kolay ve yüksek doğruluğa sahip olduğundan tercih edilmektedir. Sitotoksisite testlerinin en çok tercih edilen testi olan MTT'nin protokolü Mossman tarafından ilk kez 1983 yılında geliştirilmiştir ve günümüze kadar gelmiştir. MTT ile sitotoksisite ölçüm prensibi canlı aynı zamanda sağlam mitokondriye sahip hücrelerin mitokondrilerine uygulanmış olan sarı renkli [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] tetrazolyum tuzunun, tetrazolyum halkasını parçalayıp mor renge dönüştürmesi temeline dayanmaktadır [53]. Tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan bir enzim olan süksinat dehidrojenaza özel olarak bağlanmaktadır. Tetrazolyum halkasının parçalanması ile sarı renkli MTT boyası, mor renge aynı zamanda suda çözünmeyen formazan kristaline dönüşmektedir. Oluşan kristallerin spektrofotometre ile absorbansının ölçülebilmesi gerekmektedir. Bu nedenle formazan kristallerinin suda çözünmesini sağlayan DMSO ve izopropanol gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Sonuçta canlı ve mitokondri aktivitesi bozulmamış hücreler mor renge boyanırken, ölü ya da mitokondri aktivitesi bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu şekilde hücrelerin metabolik aktivitelerinin kolayca ve olabildiğince güvenilir ölçümü sağlanmaktadır [54, 57].

Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilmiş MTT canlılık testi temelde 3 aşamada gerçekleştirilmektedir.

1. Aşama: Hücreler belirli bir süre ilaçla muamele edilmektedir.
2. Aşama: Kullanılan ilaç uzaklaştırılıp, tetrazolyum bileşiği ilave edilip 1-4 saat inkübasyona bırakılmaktadır. İnkübasyon süresi içinde canlı hücreler tarafından

tetrazolyum bileşiği formazana dönüştürülerek renk değişimi meydana getirmektedir.

3. Aşama: Renk değişimi spektrofotometre ile ölçülerek canlı ve ölü hücre oranı yüzde cinsinden kontrol kuyusu absorbasına göre tespit edilmektedir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan hücre serileri

Çalışmamızda kullanılan H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücre serileri American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan kimyasal malzemeler

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid], Dimetil sülfoksit (DMSO), Fetal Bovine Serum (FBS), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science), Anneksin V & Dead Cell Assay Kit (Muse®, Merck), Caspase-3/7 Assay Kit (Muse®, Merck).

2.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

25 ve 75 cm^2'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, pastör pipetleri, cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), steril santrifüj tüpleri (15 ve 50 mL), 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 mL'lik Durham şişeleri, (TPP, İsviçre), 0,2 mikron çapında steril tek kullanımlık filtreler, Thoma lamı, 10,100 ve 1000 µL'lik otomatik pipet takımı ve pipet uçları (Eppendorf, Almanya).

2.1.4. Kullanılan cihazlar

Konfokal Mikroskop (Leica TCS-SP5 II, Hollanda), TEM (Biotwin FEI, ABD), Inverted Mikroskop (Nikon Eclipse TS100, ABD), Hücre analiz cihazı (Muse™ Cell Analyzer, ABD), Su Banyosu (JSR JSWB-11T, Türkiye), Santrifüj (Elektoro-mag, Türkiye), Steril kabin (ESCO Class II BSC, Türkiye), Spektrofotometre (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader, BioTek, ABD), Sıvı azot tankı (Taylor Wharton LS750, ABD), Otomatik pipetler (Eppendorf, ABD), Buzdolabı (Arçelik, Türkiye), Derin dondurucu(Arçelik, Türkiye).

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan araç-gereçlerin hazırlanması ve sterilizasyonu

Deneysel çalışmada kullanılan metal ve cam malzemeler sterilizatörde alüminyum folyolara sarılı olarak 180^0C'de 2 saat steril edilerek; bazı cam, plastik malzemeler ve Durham şişelerine konulan sıvılar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121^0C'de 1,5 atm/civa basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek; sıvı besiyerleri ve diğer sıvı kimyasal maddeler ise 0,2 mikron çapında steril tek kullanımlık filtrelerden geçirilip steril edilerek kullanılmıştır.

2.2.2. H-ras 5RP7 (Sıçan Embriyo Fibroblast) ve NIH/3T3 (Fare Embriyo Fibroblast) hücre hatları ile hücre kültürü uygulamaları

2.2.2.1. *Hücrelerin stoktan çıkarılması*

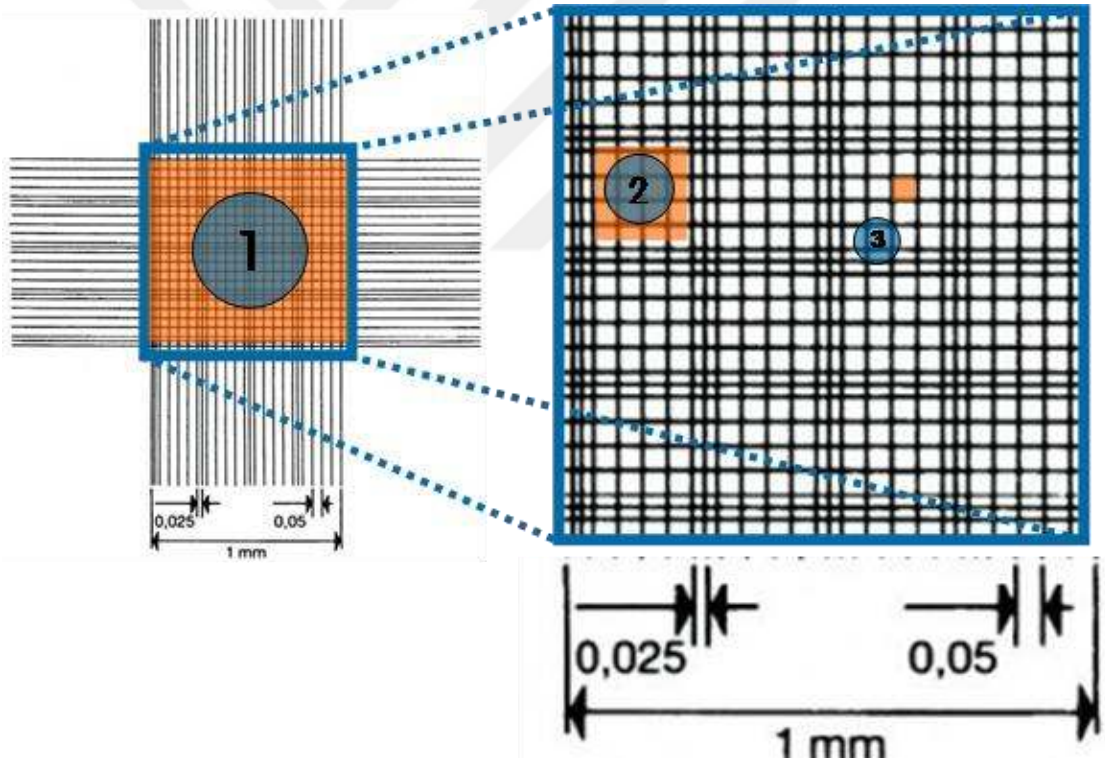
Sıvı azot tankında -196 °C'de bulunan sıçan embriyo fibroblast H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri çıkarılmıştır, içeriği tamamen eriyince %10 FBS içeren DMEM besiyeri içine aktarılarak, 10 dk. boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan kısmı dökülerek yeni besiyeri içinde süspanse edilmiş, kültür flasklarına alınan hücreler 37 °C'de %5 CO_2 ve %100 nem içeren inkübatörde kültüre kaldırılmıştır. İnkübatörde bulunan flasklara ilk iki gün müdahale edilmemiştir. İnkübasyon süresince hücrelerin doluluk durumu Inverted mikroskop (Nikon Eclipse TS100, ABD) ile kontrol edilip hücre çoğalmaları izlenmiştir. Yaklaşık 2 günde bir hücrelerin pasaj işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2. *Hücrelerin pasajlanması*

H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücreleri flaskları tamamen kapladıkları zaman flask içindeki besiyerleri bir pipet yardımıyla uzaklaştırılıp, hücre hatlarının yüzeylerinin PBS ile hafifçe yıkanması yapıldıktan sonra 1x tripsin/EDTA solüsyonu konularak hücrelerin flasktan kalkması sağlanmıştır. Kalkan hücrelerin üzerine tripsinin iki katı hacminde besiyeri eklenip 5 dk. boyunca 1200 rpm'de santirüj edilmiştir. Bu süre sonunda süpernatan kısım atılmış hücrelerin miktarına ve hücre pellet büyüklüğüne göre flasklara pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3. *Hücrelerin sayılması ve 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi*

Flaskların tabanını tamamen kaplayan hücrelerin besiyerleri pipet yardımıyla ortamdan uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Bu hücreler %0,25 tripsin ile 15 dk. yıkanarak flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tüp içerisine alınan hücreler santrüfüjde 1200 rpm'de 5-10 dk. döndürülmüştür. İşlem sonrasında supernatan atılarak hücre pelleti üzerine yeni besiyeri ilavesinden sonra hücreler yeniden süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 10 µL pipet yardımıyla alınarak alkol ile önceden temizlenmiş Thoma lamı ve lamel arasına dikkatli bir şekilde aktarılmıştır. Bir süre hücrelerin hareketsizleşmesi için beklenmiş ve Inverted Mikroskobun 10x ve 20x objektifleri kullanılarak Thoma lamındaki (Bkz. Şekil 2.1.) 16 büyük kare içinde hücre sayımı yapılmış (1 numaralı alanın tamamı) ardından 1 mililitrede bulunan hücre sayısı aşağıdaki gibi belirlenmiştir.



Şekil 2.1. *Thoma lamında sayım yapılacak alanlar (http-3)*

- 1 numaralı kare alanın kenarının uzunluğu 1 mm ve yüksekliği 0,1 mm'dir. Hacmi = 1 x 1 x 0,1 = 0,1 mm^3 (1 mL = 1000 mm^3)
- 1 numaralı karenin alanı = 1mm x 1mm x 0,1 mm = 0,1 mm^3 = 1x10^{-4} mL

Yani 1 mL'nin 10.000 de biridir.

- Bu nedenle 1 numaralı alan içinde sayılan hücre konsantrasyonu =

  1 numaralı alan içinde sayılan hücre sayısı x 10.000/mL'dir [54].

2.2.2.4. *Hücrelerin stoklanması*

Çoğalan hücreler, PBS ile yıkama sonrası, 1X tripsin/EDTA ile flasktan kaldırılıp üzerine yeni besiyeri eklenmiş, 5 dk. boyunca 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet üzerine her bir tüp için 1800 µL hücre süspansiyonu ve 200 µL DMSO konulup 30 dk. kuru buz üzerinde bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler -20°C ye kaldırılmıştır. Tamamen donmalarından sonra sıvı azot tankına (-196°C) dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir.

2.2.3. Sinnamaldehit dozlarının hazırlanması

Yaptığımız deneysel çalışmada ilaç olarak kullanacağımız 100 mM'lık Sinnamaldehit stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu ana stoktan 10 µM'lık ara stok elde edilmiştir. Deneylerde kullanılan ilaç dozları bu ara stoktan besiyeri ilavesi ile hazırlanmıştır.

2.2.4. Deney gruplarının belirlenmesi

Deneyde kullanılan Sinnamaldehit dozları 1,56 µM-200 µM arasındadır. Bu dozlara ve uygulama süresine yapılan literatür taraması sonrasında karar verilmiştir.

a. Kontrol grupları: Sadece hücre ve besiyeri içermektedir.
b. Deney grubu: 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 µM Sinnamaldehit konsantrasyonları, hücre ve besiyeri içermektedir.

2.2.5. MTT sitotoksisite testi

MTT boyası, fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi içinde çözünerek hazırlanıp filtre edilmiştir. 96 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna 5000 hücre ve yukarıda belirtilen Sinnamaldehit dozları ilave edilip 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT solüsyonu eklenerek 37^{o}C'de 4 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda plaka içeriği boşaltılarak 200 µL DMSO ilave edilerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Plakanın absorbansı spektrofotometrede 570 nanometre dalga boyunda okutulmuştur. İlaçla muamele edilen

kuyucuklarda okunan optik yoğunluk, kontrole karşı yaşayan hücrelerin yüzdesine aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Hücre canlılığı (%)= (Deney kuyusunun optik yoğunluğu) / (Kontrolün optik yoğunluğu) x 100

Bu test her hücre serisinde üçer defa olmak üzere tekrar edilmiştir

2.2.6. Anneksin V ile apoptoz tayini

Sinnamaldehit'in hücreler üzerindeki sitotoksisitesine ve apoptoz etkisine Anneksin V yöntemi ile flow sitometrik olarak bakılmıştır. Normalde hücre zarının iç yüzeyine bakan fosfolipid sırasına dizilen fosfatidilserin molekülleri hücre apoptoza giderse zarın dış yüzeyindeki sıraya geçmektedir. Bu yer değiştirme hücre zarının bütünlüğünün korunduğu apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Hücrenin dış yüzeyine geçen fosfatidilserine bağlanma yeteneğine sahip olan protein yapılı Anneksin V, floresan isotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmiştir. FITC-Anneksin V bileşiminin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülmüştür.

Anneksin V yöntemi ile apoptoz belirlenmesi için en az bir milyon hücre gerekmektedir: Deney ve kontrol grubu hücreler tripsinle kaldırılarak santrifüjlendikten sonra soğuk PBS çözeltisi eklenmiş ve hücreler yeniden süspanse edilmiştir. Bu çözeltiden 100 mikrolitre bir eppendorf tüpe aktarılmış bunun üzerine de 100 mikrolitre Anneksin V kit solüsyonu ilave edilmiştir. 15 dk. oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilen hücreler Muse^{TM} hücre analiz cihazında incelenmiştir.

2.2.7. Kaspaz 3-7 uygulaması ile apoptoz tayini

İlaç uygulamaları sonrası hücreler üzerinde % 50 den fazla ölüm meydana getiren ilaç dozları (IC_{50}) belirlendikten ve flow sitometrik olarak apoptoz uyarımı tespit edildikten sonra apoptoz mekanizmasını ortaya koyabilecek kaspaz 3-7 ölçümleri için kullanılan kitler üretici firmanın kullanım talimatları doğrultusunda uygulanmıştır. İlaç uygulamalarından sonra hücre hatlarındaki kaspaz 3-7 değişimleri Muse^{TM} hücre analiz cihazında ölçülmüştür.

2.2.8. Konfokal mikroskop ile hücre morfolojik değişiklerinin tayini

Konfokal mikroskop (Leica TCS-SP5 II, Hollanda) ile birlikte floresan boyalar kullanılarak hücre görüntüleri elde edilmiştir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelmiştir. Hücre çekirdeği akridin oranj hücre iskeleti ise falloidin ile boyanarak konfokal mikroskopta hücre morfolojisi görüntülenmiştir.

2.2.9. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) ile yapısal değişikliklerin tayini

Elektron mikroskobuyla yapılan değerlendirme apoptozda en kıymetli yöntem olarak görülmektedir. Hücre serileri üzerinde olan ince yapısal değişiklikleri incelemek için hücreler Sinnamaldehit'in IC_{50} değeri ile muamele edildikten sonra 24 saat etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelere TEM'de (Biotwin FEI, ABD) incelenebilmesi için aşağıdaki doku takibi protokolü uygulanmıştır.

- **Fiksatif Hazırlama:** İlk fiksatif tamponlanmış glutaraldehittir. Fosfat Tamponu; Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 karıştırılarak, tampon solüsyonu hazırlanmıştır. İncelenecek hücrelerin yapısı ve büyüklüğüne göre, hücreler tespit içerisinde 4-24 saat arasında +4 ^oC'de fikse edilmiştir.

- **Yıkama:** Fikse olmuş hücrelerden fiksatifi uzaklaştırmak için hücreler tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. (3x15 dk.)

- **İkinci Tespit (Osmium Tetraoksit) :** Yıkanan hücreler %1'lik OSO_4 içerisine alınıp, 2 saat süreyle rotatorda döndürülerek, fiske edilmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda tampon ile 3x15 dk. yıkanmıştır.

- **Dehidratasyon:** Etil alkol ile yapılmıştır.

% 50 Alkol 15 dk. x2 +4 ^oC,

% 70 Alkol 15 dk. x2 +4 ^oC,

% 90 Alkol 15 dk. x2 +4 ^oC,

% 96 Alkol 30 dk. x2 +4 ^oC,

Absolu Alkol 30 dk. x1+4 ^oC,

Absolu Alkol 30 dk. x1 +25 ^{o}C.

- **Şeffaflandırma:**

Propilenoksit 30 dk. x2,

Resin+propilenoksit (1/1).

Hücreler bu karışımda 2 saat süreyle rotatorda döndürülmüştür.

- **Bloklama:** Taze hazırlanmış resinle bloklama işlemi yapılmıştır. Polimerizasyon işlemi 48 saat boyunca 60 ^{o}C'de yapılmıştır.

Resin Solüsyonunun Hazırlanması:

Araldit CY212 20 mL,

DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride) 20mL,

BDMA (Benzyldimethylamine) 0,6 mL,

Dibütilfitalat 1 mL.

- **Kesitlerin Boyanması:** Uranil asetat boyasının hazırlanması;

Metil Alkol 80 mL,

Uranil asetat 2 gram,

Distile su 20 mL.

Bu boya içerisinde gridler 45-60 dk. bekletilip, distile suyla yıkanmıştır (boya kullanılmadan önce süzülmelidir).

- **Kurşun Sitrat Boyasının Hazırlanması:**

A Karışımı

10 N NaOH 2 gram,

Distile su 5 mL.

B Karışımı

Kurşun sitrat 200 mgr,

Distile su 50 mL.

B karışımı üzerine 0,5mL A karışımı katılıp, kuvvetlice çalkalanarak karıştırmıştır (pH 12-13 arasında olmalıdır). Temiz bir falkona konup, karanlıkta ve +4 ^{o}C'de saklanmıştır. Boyanan kesitler geçirimli elektron mikroskobunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir.

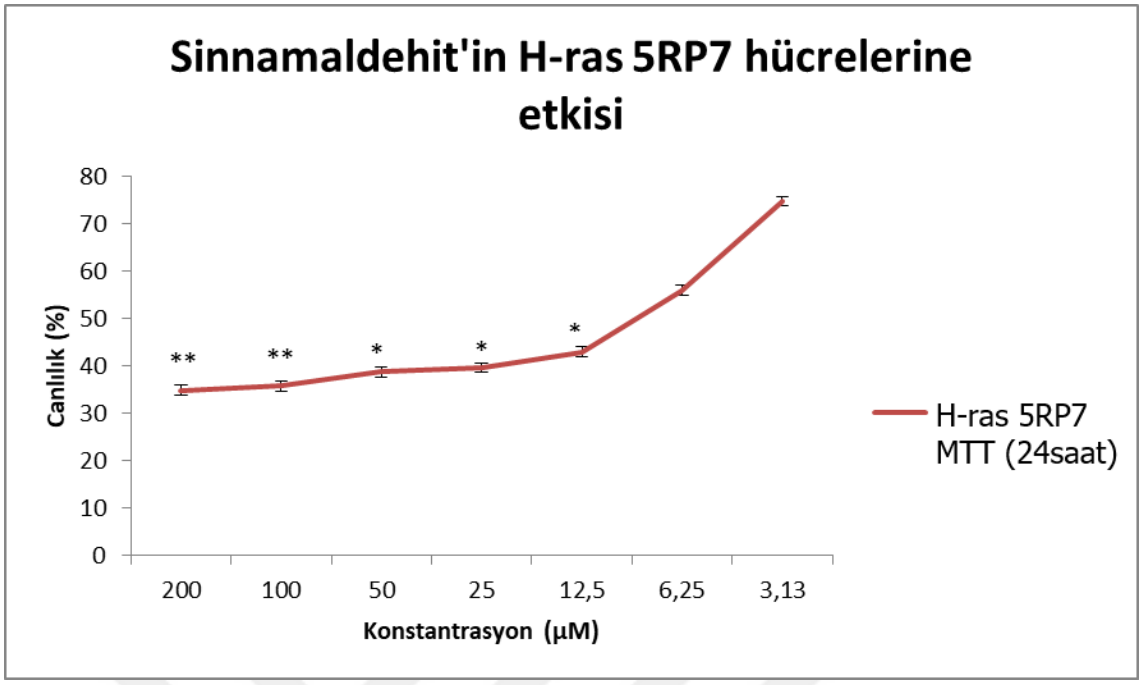
2.2.10. İstatiksel değerlendirme

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ve anlamlılık değerlerinin belirlenmesinde GraphPad PRISM Version 6.01 programı kullanılmıştır.

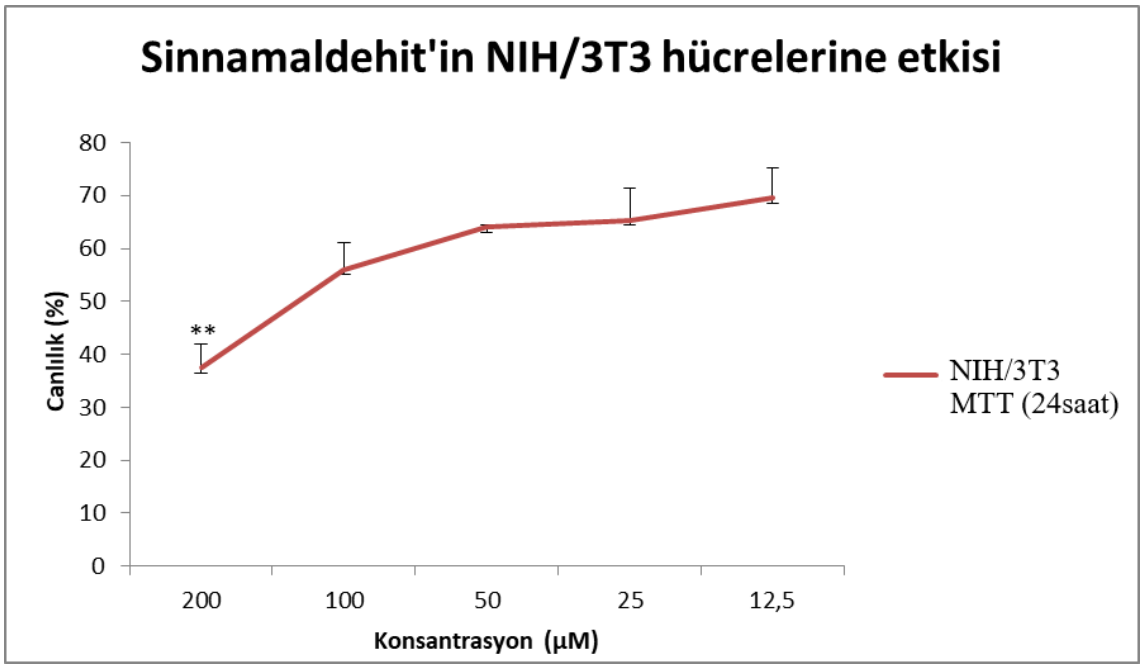
3. BULGULAR

3.1. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki MTT bulguları

Sinnamaldehit'in uygulanan farklı konsantrasyonlarının uygulandığı H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, H-ras 5RP7 hücrelerine uygulanan tüm konsantrasyonlarda mitokondriyal aktivitede doza bağlı olarak hücre canlılığında belirgin azalma tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.1.). H-ras 5RP7 hücrelerindeki canlılık oranındaki azalmanın en fazla gözlemlendiği konsantrasyon aralığı ise 3,13 µM-12,5 µM olarak tespit edilmiştir. Şekil 3.1.'de gösterilen grafik Microsoft Office Excel programı ile hazırlanmış olup aynı zamanda hücrelerin IC_{50} konsantrasyonun belirlenmesinde de aynı program kullanılmıştır. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerindeki IC_{50} konsantrasyonu 46,88 µM ve NIH/3T3 hücrelerindeki IC_{50} konsantrasyonu ise 63,06 µM olarak hesaplanmıştır. Deneyde kanser hücreleri olarak kullandığımız H-ras 5RP7'nin canlılık yüzdesinde Sinnamaldehit'in dozu arttıkça belirgin bir azalma gözlemlenirken, Sinnamaldehit'in kanser hücreleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmak için kullandığımız normal hücreler olan NIH/3T3'teki azalmanın ise ilaç verilmeyen kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda azalmaya neden olduğu fakat herhangi aşırı sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 3.2.). Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak sitotoksik ve antiproliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.1. *H-ras 5RP7 hücrelerine 24 saatlik Sinnamaldehit uygulanması sonucu oluşan konsantrasyona bağlı canlılık yüzdelerinin grafiği. Anlamlılık değeri p<0.005**, p<0.01* ile grafikte gösterilmiştir. (Kontrol grubunun canlılığı %100 alınmıştır. IC_{50} değeri 46,88 µM olarak belirlenmiştir.)*

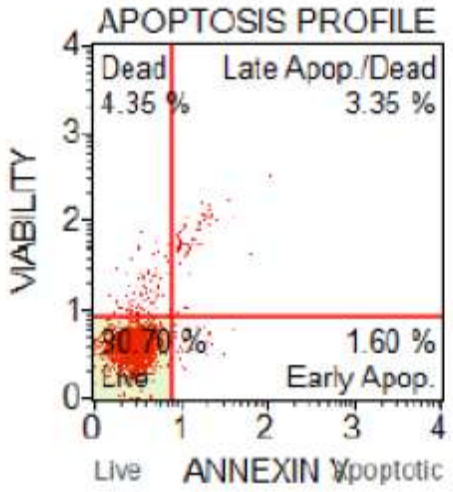


Şekil 3.2. *NIH/3T3 hücrelerine 24 saatlik Sinnamaldehit uygulanması sonucu oluşan konsantrasyona bağlı canlılık yüzdelerinin grafiği. Anlamlılık değeri p<0.005**, p<0.01* ile grafikte gösterilmiştir. (Kontrol grubunun canlılığı %100 alınmıştır. IC_{50} değeri 63,06 µM olarak belirlenmiştir.)*

3.2. Flow sitometri bulguları

3.2.1. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki Anneksin V uygulaması ile elde edilen apoptotik bulgular

H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Anneksin V uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. H-ras 5RP7 hücrelerine ait kontrol gruplarında; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %4,35, geç apoptotik/ölü hücreler %3,35, canlı hücreler %90,70, erken apoptotik hücreler %1,60 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.3). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

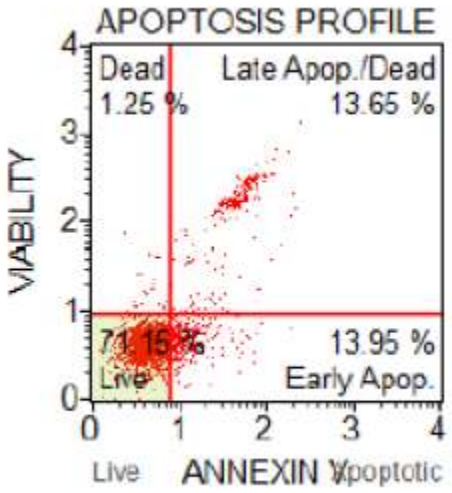


Şekil 3.3. *H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.1. *H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	90,70
Erken apoptotik hücreler	1,60
Geç apoptotik/ ölü hücreler	3,35
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	4,35
Toplam apoptotik hücreler	4,95

Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun 24 saatlik uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Anneksin V uygulaması sonrası incelendiğinde; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %1,25, geç apoptotik/ölü hücreler %13,65, canlı hücreler %71,15, erken apoptotik hücreler %13,95 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.4.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

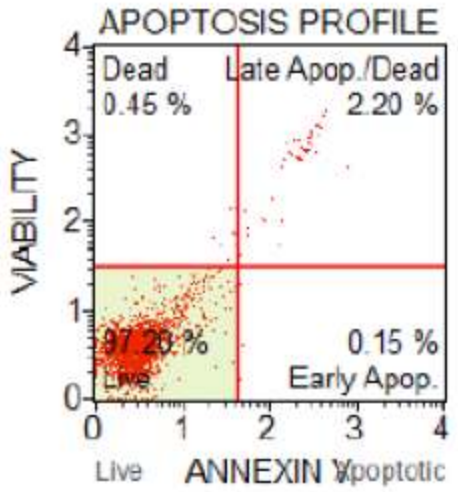


Şekil 3.4. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.2. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	71,15
Erken apoptotik hücreler	13,95
Geç apoptotik/ ölü hücreler	13,65
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	1,25
Toplam apoptotik hücreler	27,60

NIH/3T3 kontrol hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Anneksin V uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. NIH/3T3 hücrelerine ait kontrol gruplarında; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %0,45, geç apoptotik/ölü hücreler %2,20, canlı hücreler %97,20, erken apoptotik hücreler %0,15 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.5.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.3.'de gösterilmiştir.

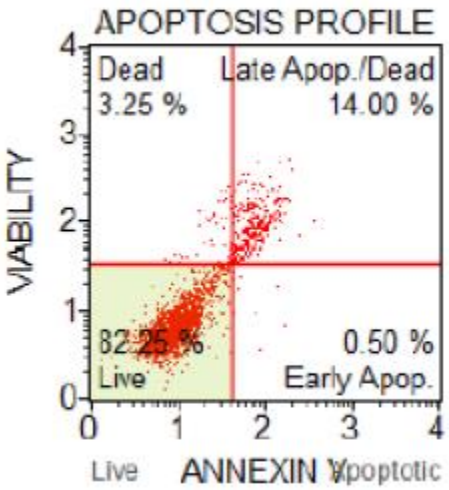


Şekil 3.5. *NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.3. *NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	97,20
Erken apoptotik hücreler	0,15
Geç apoptotik/ ölü hücreler	2,20
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	0,45
Toplam apoptotik hücreler	2,35

Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun 24 saatlik uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Anneksin V uygulaması sonrası incelendiğinde; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %3,25, geç apoptotik/ölü hücreler %14,00, canlı hücreler %82,25, erken apoptotik hücreler %0,50 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.6.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.4.'de gösterilmiştir.



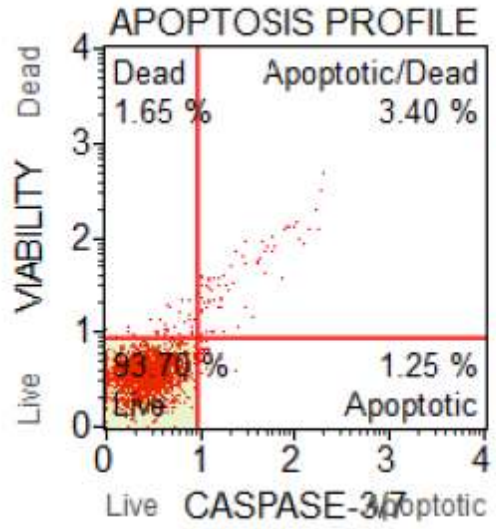
Şekil 3.6. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.4. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Anneksin V değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	82,25
Erken apoptotik hücreler	0,50
Geç apoptotik/ ölü hücreler	14,00
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	3,25
Toplam apoptotik hücreler	14,50

3.2.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 ve NIH/3T3 hücrelerindeki Kaspaz 3-7 uygulaması ile elde edilen apoptotik bulgular

H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Kaspaz 3-7 uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. H-ras 5RP7 hücrelerine ait kontrol gruplarında; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %1,65, apoptotik/ölü hücreler %3,40, canlı hücreler %93,70, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %1,25 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.7.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.5.'de gösterilmiştir.

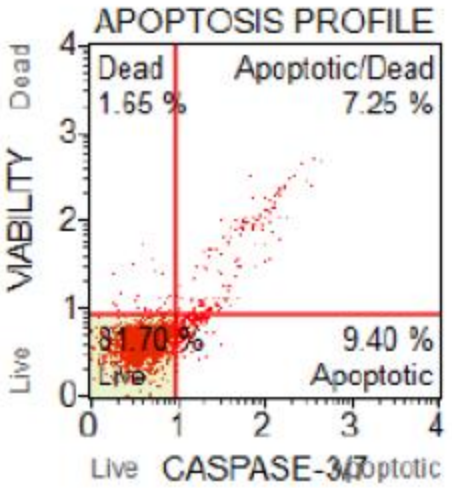


Şekil 3.7. *H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.5. *H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	93,70
Apoptotik veya erken apoptotik hücreler	1,25
Apoptotik/ ölü hücreler	3,40
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	1,65
Toplam apoptotik hücreler	4,65

Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun 24 saatlik uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Kaspaz 3-7 uygulaması sonrası incelendiğinde; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %1,65, apoptotik/ölü hücreler %7,25, canlı hücreler %81,70, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %9,40 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.8.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.6.'da gösterilmiştir.

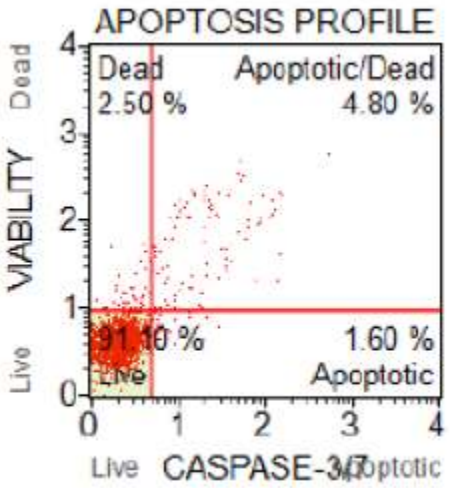


Şekil 3.8. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.6. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	81,70
Apoptotik veya erken apoptotik hücreler	9,40
Apoptotik/ ölü hücreler	7,25
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	1,65
Toplam apoptotik hücreler	16,65

NIH/3T3 kontrol hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Kaspaz 3-7 uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. NIH/3T3 hücrelerine ait kontrol gruplarında; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %2,50, apoptotik/ölü hücreler %4,80, canlı hücreler %91,10, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %1,60 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.9.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.7.'de gösterilmiştir.

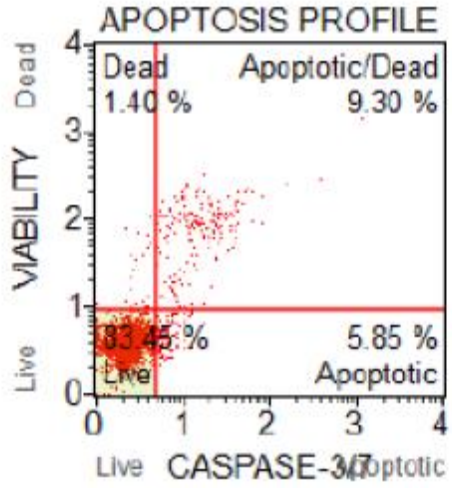


Şekil 3.9. *NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

Tablo 3.7. *NIH/3T3 kontrol hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	91,10
Apoptotik veya erken apoptotik hücreler	1,60
Apoptotik/ ölü hücreler	4,80
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	2,50
Toplam apoptotik hücreler	6,40

Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun 24 saatlik uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin apoptotik profili flow sitometride Kaspaz 3-7 uygulaması sonrası incelendiğinde; nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler %1,40, apoptotik/ölü hücreler %9,30, canlı hücreler %83,45, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %5,85 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 3.10.). Elde edilen popülasyon yüzdeleri Tablo 3.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.10. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin histogramı (24 saatlik)*

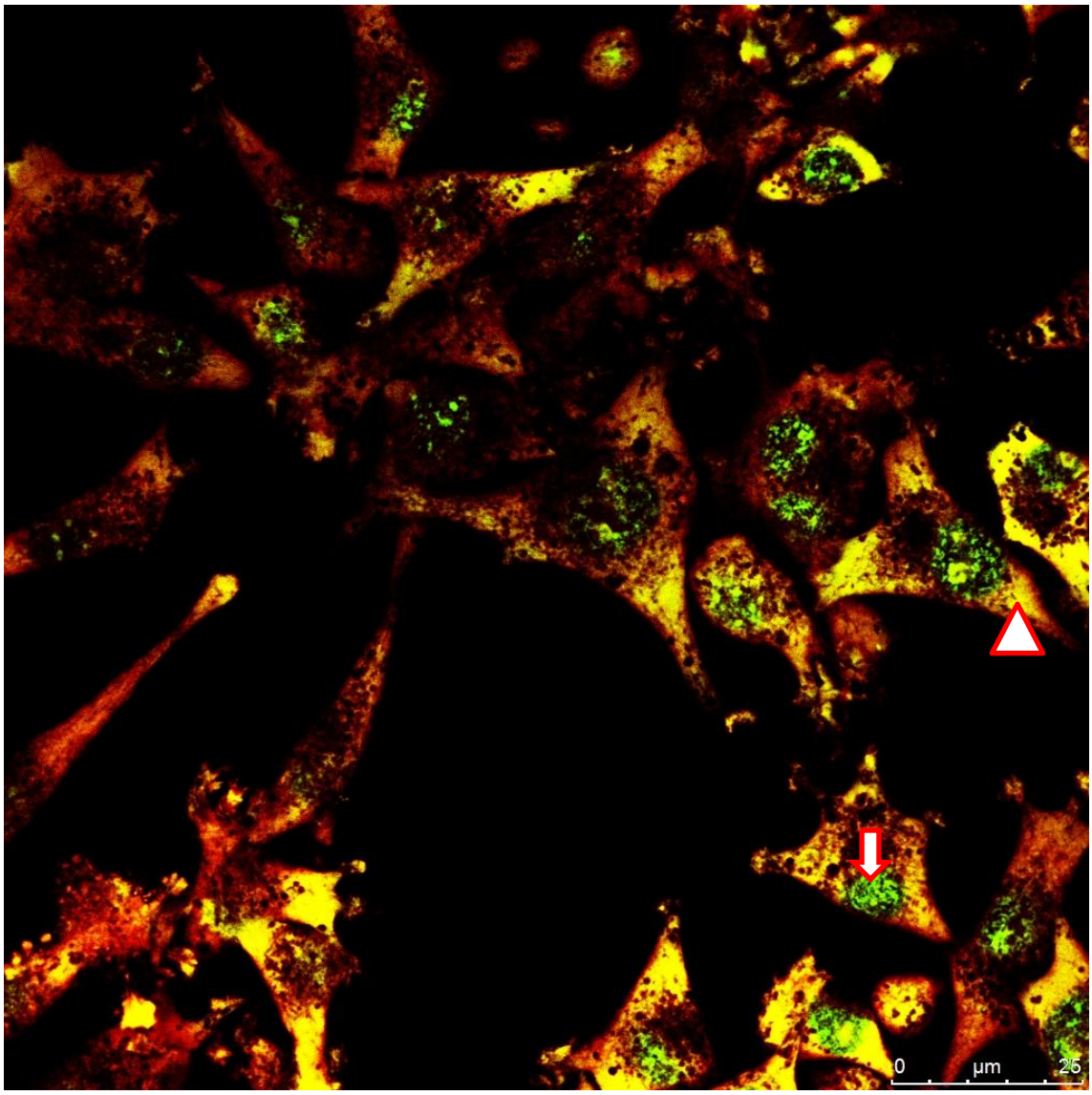
Tablo 3.8. *Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinin Kaspaz 3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon yüzdesi*

	Popülasyon yüzdesi (%)
Canlı hücreler	83,45
Apoptotik veya erken apoptotik hücreler	5,85
Apoptotik/ ölü hücreler	9,30
Nekrotik, geç nekrotik veya ölü hücreler	1,40
Toplam apoptotik hücreler	15,15

3.3. Konfokal mikroskobik bulgular

3.3.1. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskobik bulguları

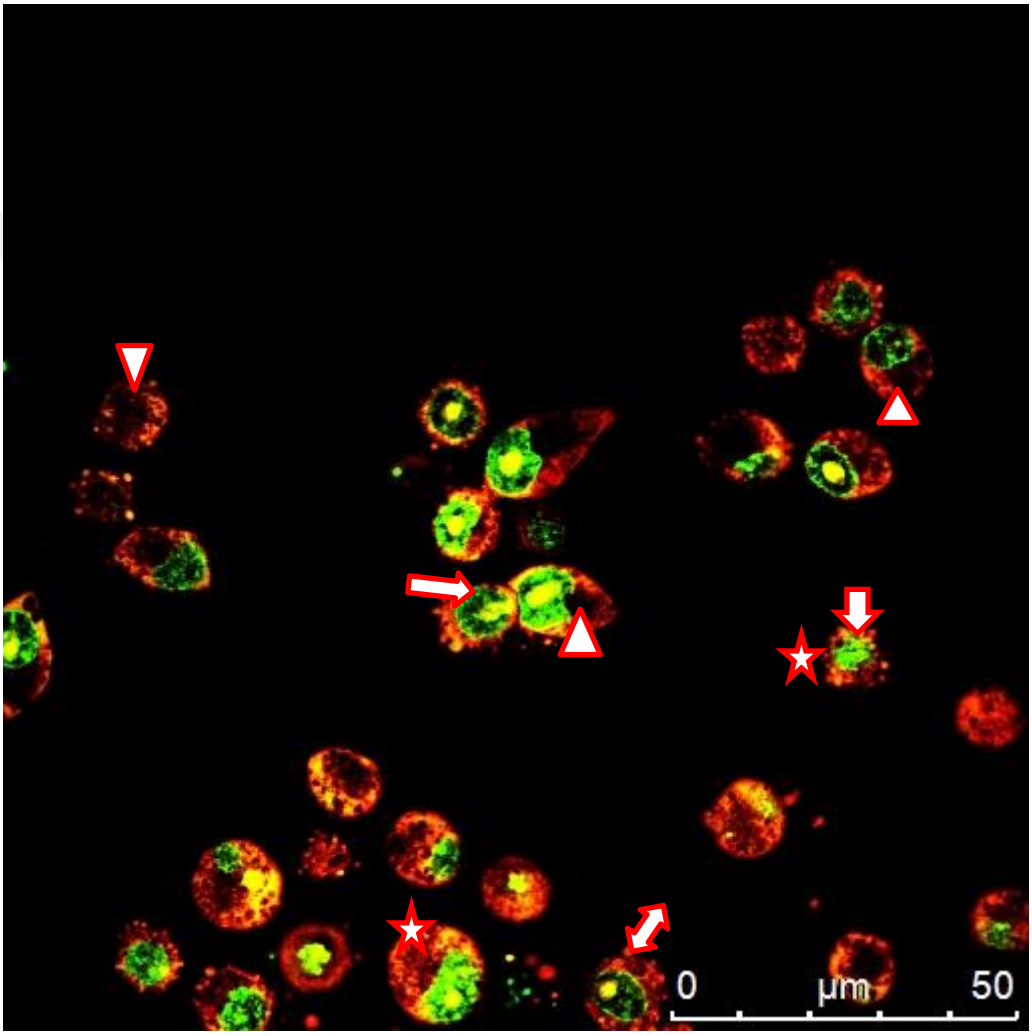
H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama sonrasında konfokal mikroskop görüntüsü Görsel 3.1. ile gösterilmektedir.



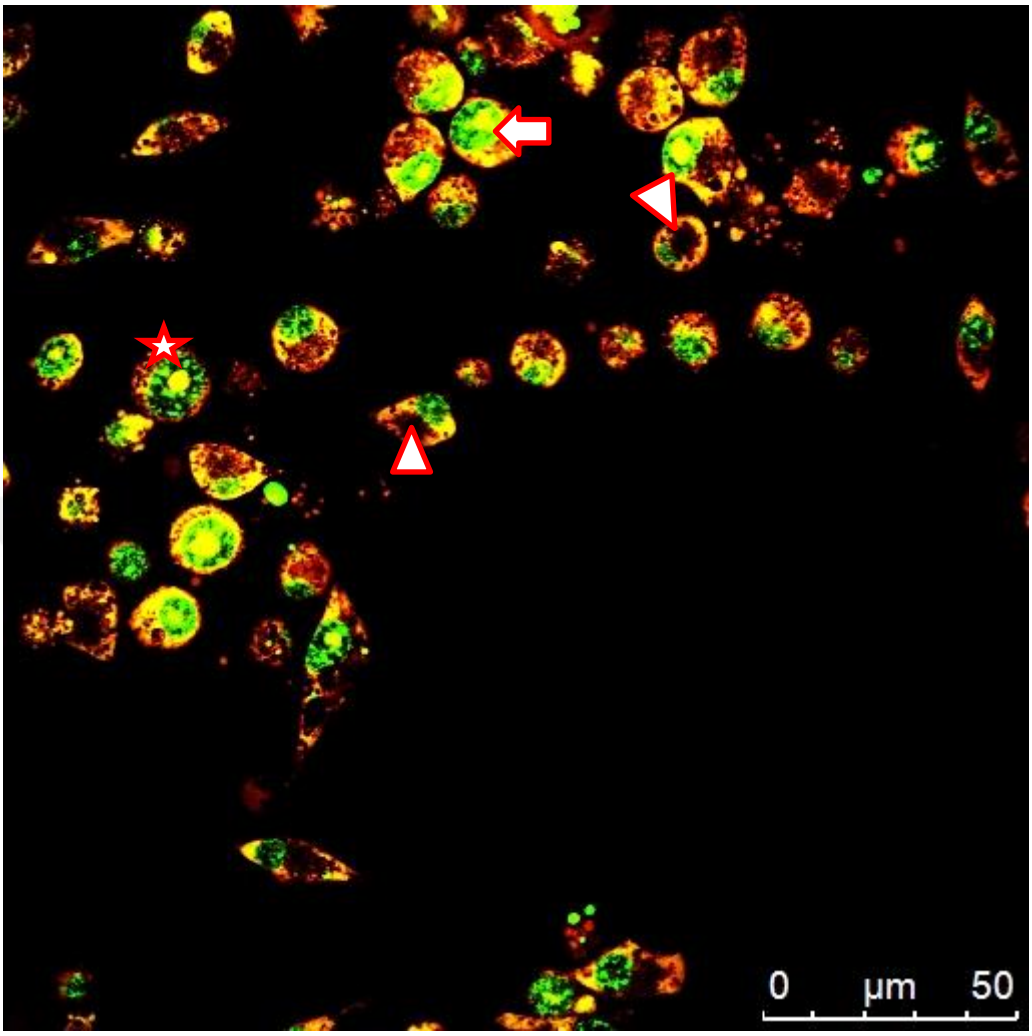
Görsel 3.1. *Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış H-ras 5RP7 Kontrol Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Normal Hücre İskeleti, Ok-> Normal Çekirdek Yapısı*

3.3.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları

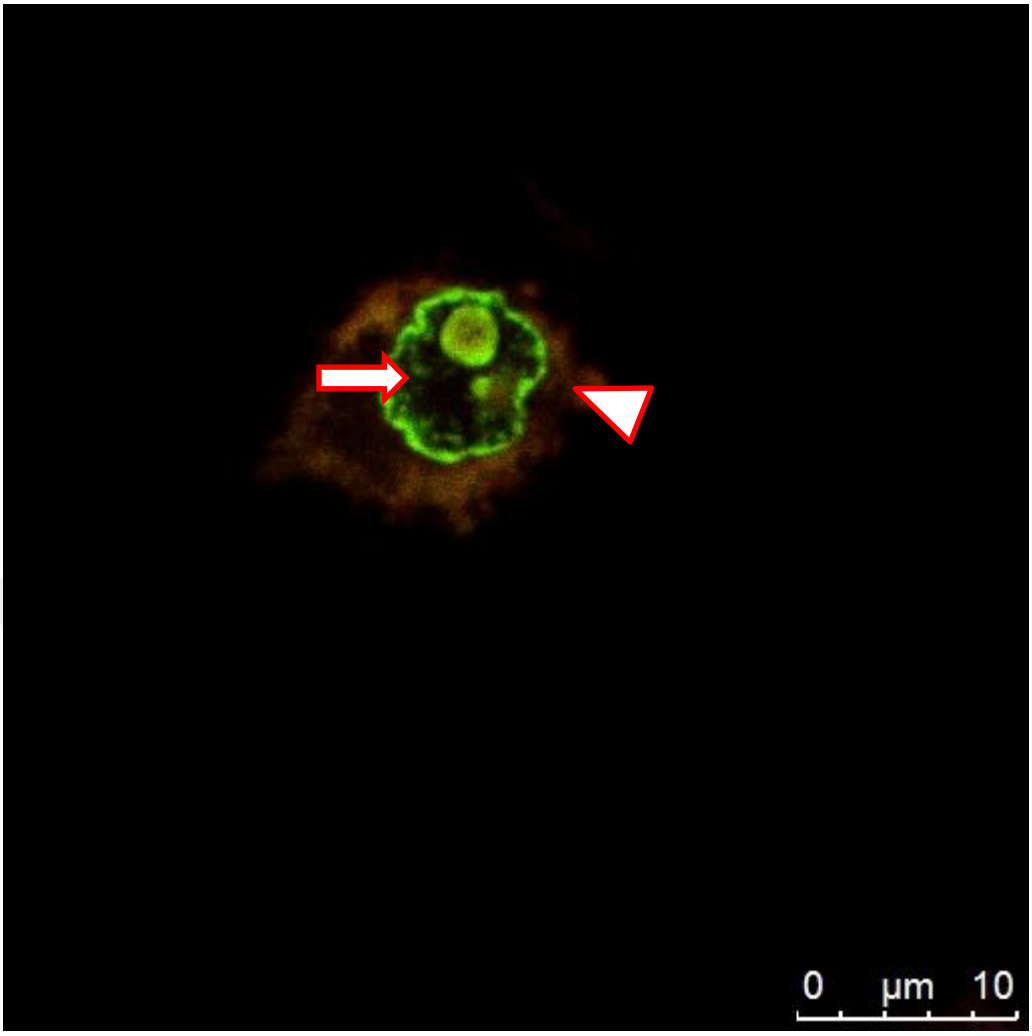
Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinin morfolojik yapısında neden olduğu değişiklikler falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile incelenmiş ve görüntü Görsel 3.2., Görsel 3.3. ve Görsel 3.4. ile gösterilmektedir.



Görsel 3.2. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Hücre İskeletinde Parçalanma ve Delik Oluşumu, Ok-> Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-> Hücre Büzüşmesi, Çift Ok-> Membran Tomurcuklanması*



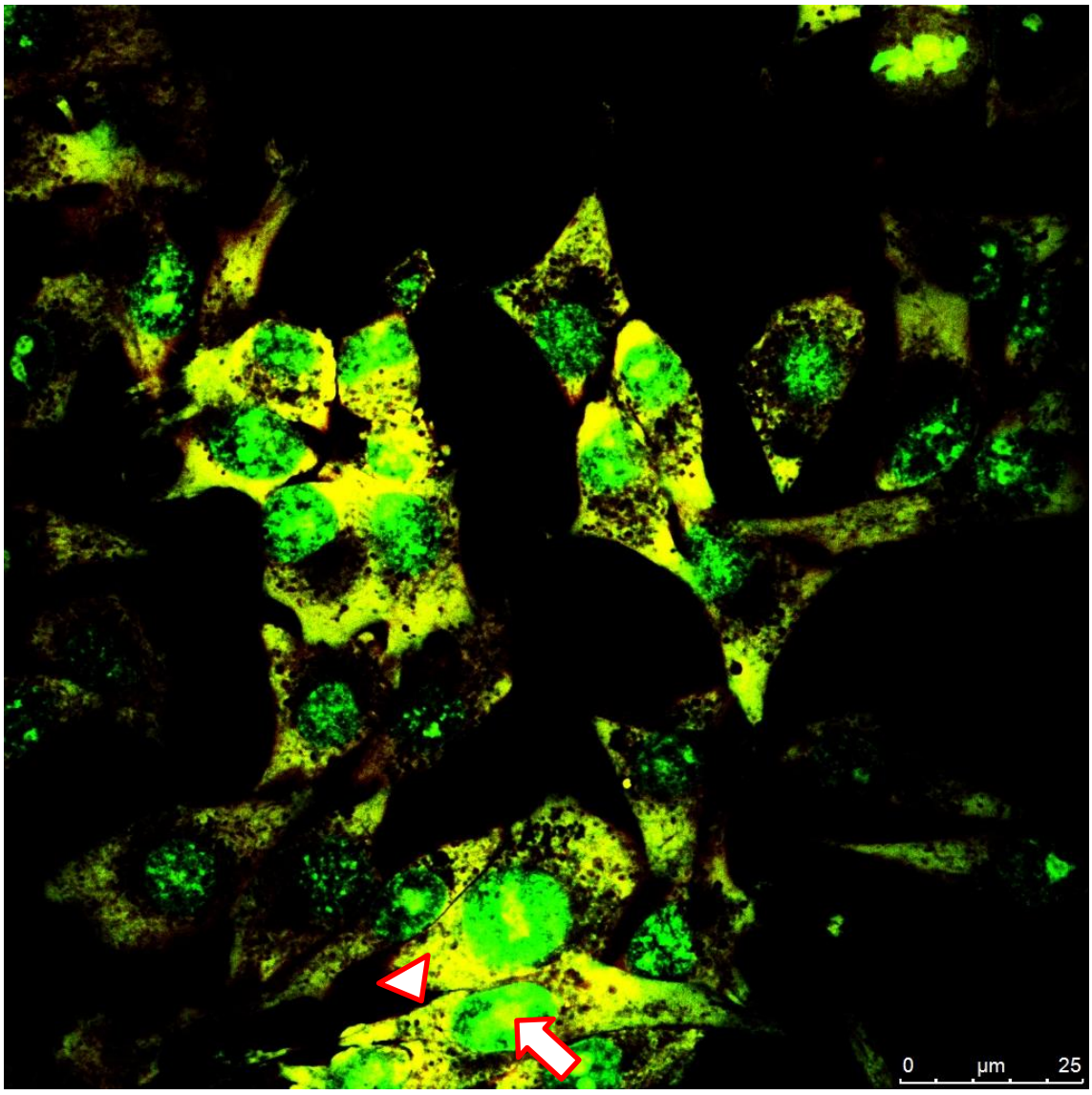
Görsel 3.3. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Hücre İskeletinde Parçalanma ve Delik Oluşumu, Ok-> Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-> Çekirdek Parçalanması*



Görsel 3.4. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Hücre İskeletinde Parçalanma, Ok-> Kromatin Kondenzasyonu ve Hasarlı Çekirdek Yapısı*

3.3.3. NIH/3T3 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısının konfokal mikroskobik bulguları

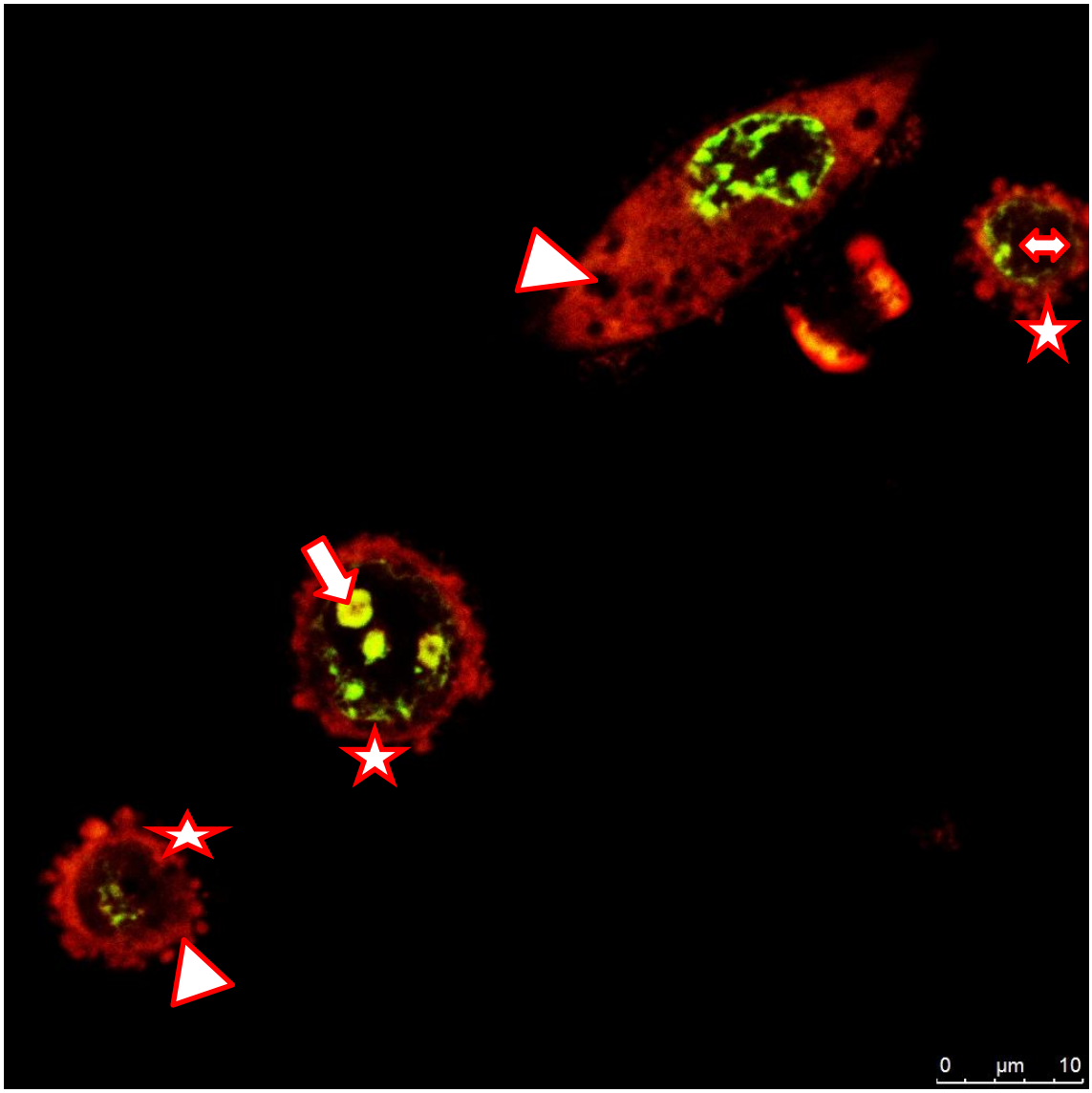
NIH/3T3 kontrol hücrelerinin morfolojik yapısı falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama sonrasında konfokal mikroskop görüntüsü Görsel 3.5. ile gösterilmektedir.



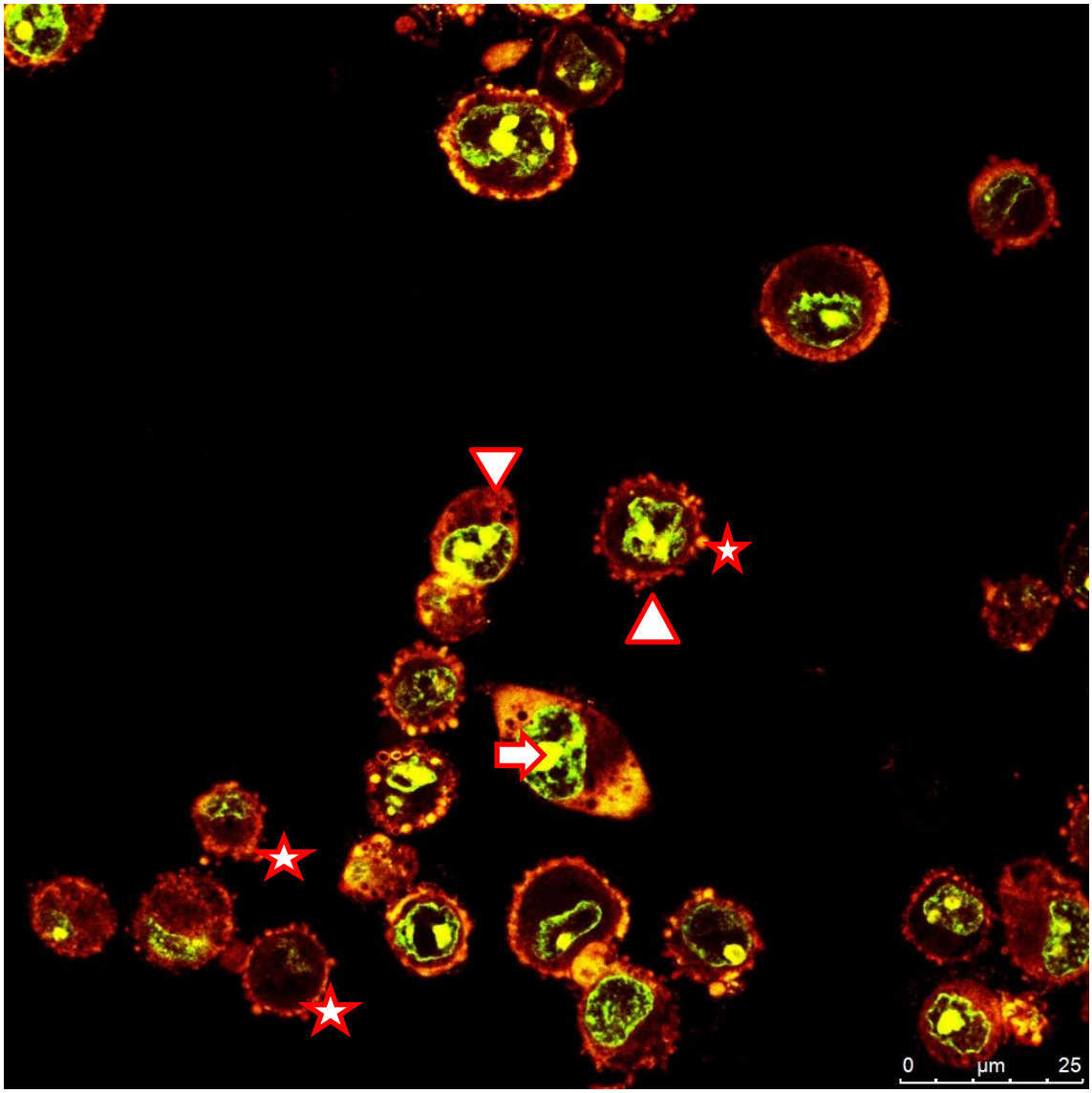
Görsel 3.5. *Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış NIH/3T3 Kontrol Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Normal hücre iskeleti, Ok-> Normal Çekirdek Yapısı*

3.3.4. Sinnamaldehit'in NIH/3T3 hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskobik bulguları

Sinnamaldehit'in NIH/3T3 hücrelerinin morfolojik yapısında neden olduğu değişiklikler falloidin ve akridin oranj ile gerçekleştirilen ikili boyama uygulaması sonucunda konfokal mikroskop ile incelenmiş ve görüntü Görsel 3.6. ve Görsel 3.7. ile gösterilmektedir.



Görsel 3.6. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan NIH/3T3 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Hücre İskeletinde Parçalanma ve Delik Oluşumu, Ok-> -Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-> Membran Tomurcuklanması, Çift Ok-> Çekirdek Parçalanması*

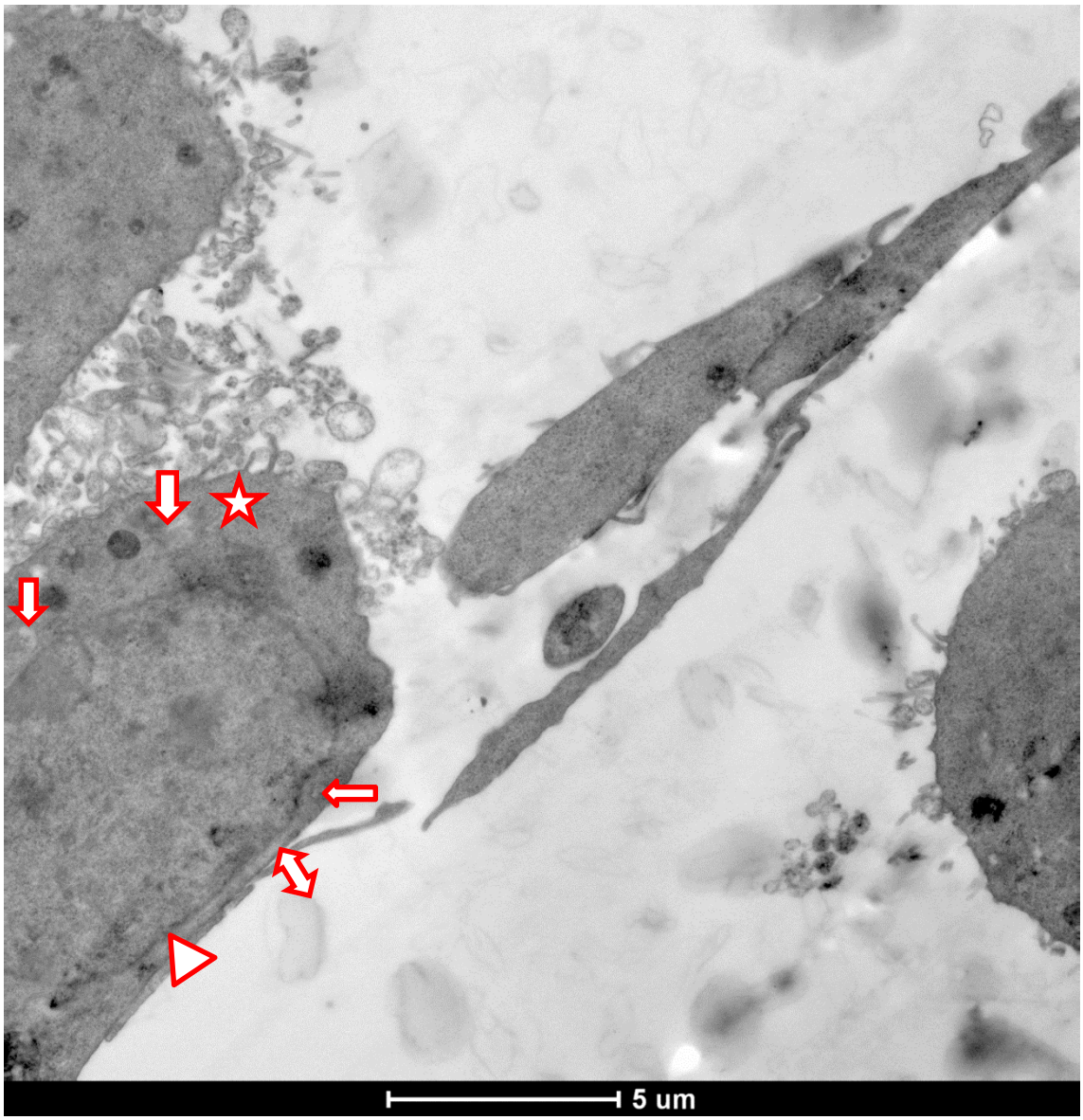


Görsel 3.7. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan NIH/3T3 Hücrelerinin Akridin Oranj ve Falloidin Kullanılarak İkili Boyanmış Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Ok başı-> Hücre İskeletinde Parçalanma ve Delik Oluşumu, Ok-> -Kromatin Kondenzasyonu, Yıldız-> Membran Tomurcuklanması*

3.4. Geçirimli elektron mikroskobik bulguları

3.4.1. H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskobik bulguları

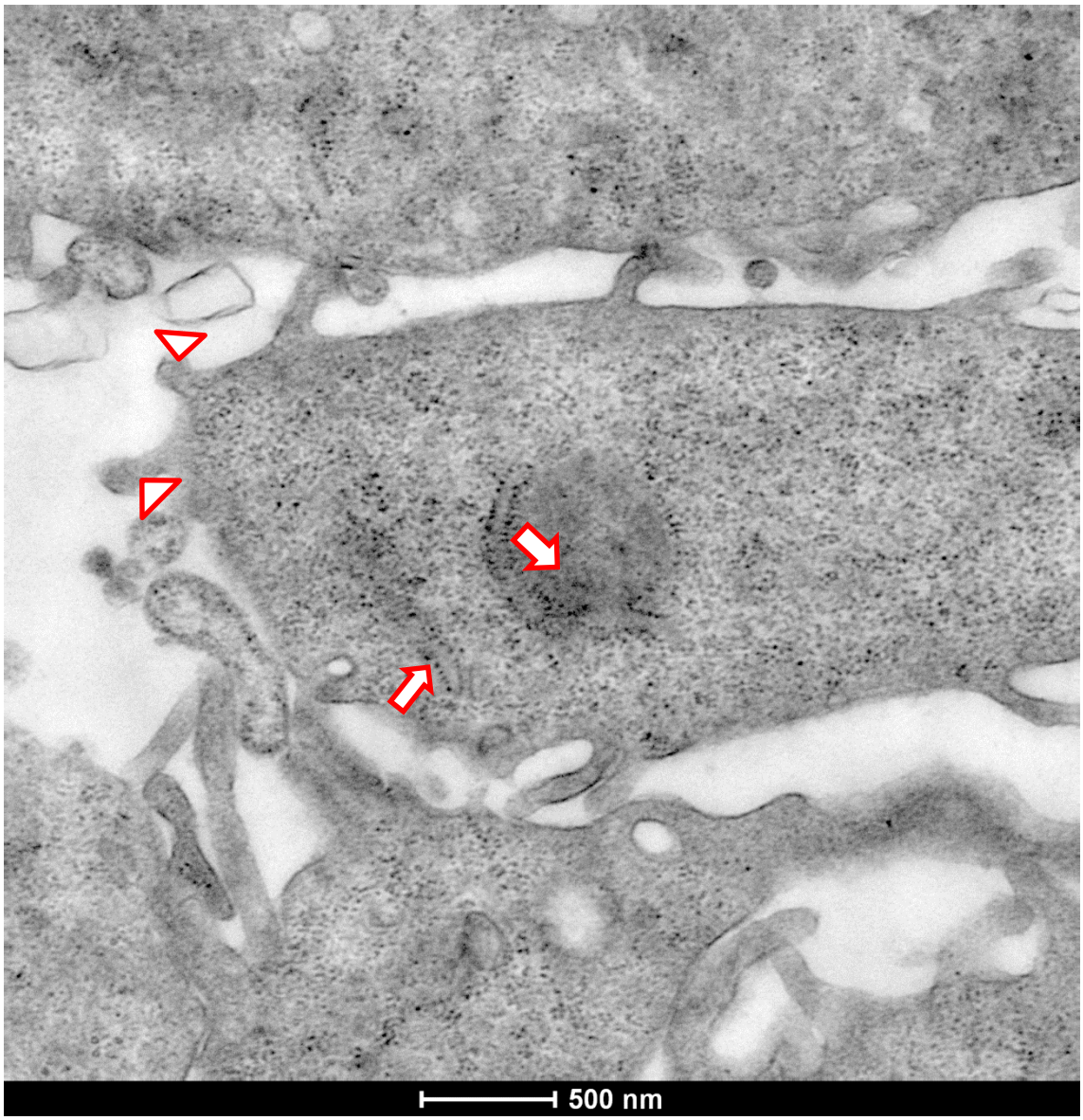
H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin ince yapısında Sinnamaldehit uygulandıktan sonra oluşan sitotoksik etki sebebiyle gerçekleşen değişikliklerin karşılaştırılması için geçirimli elektron mikroskobu ile görüntülenip Görsel 3.8. ile gösterilmiştir.



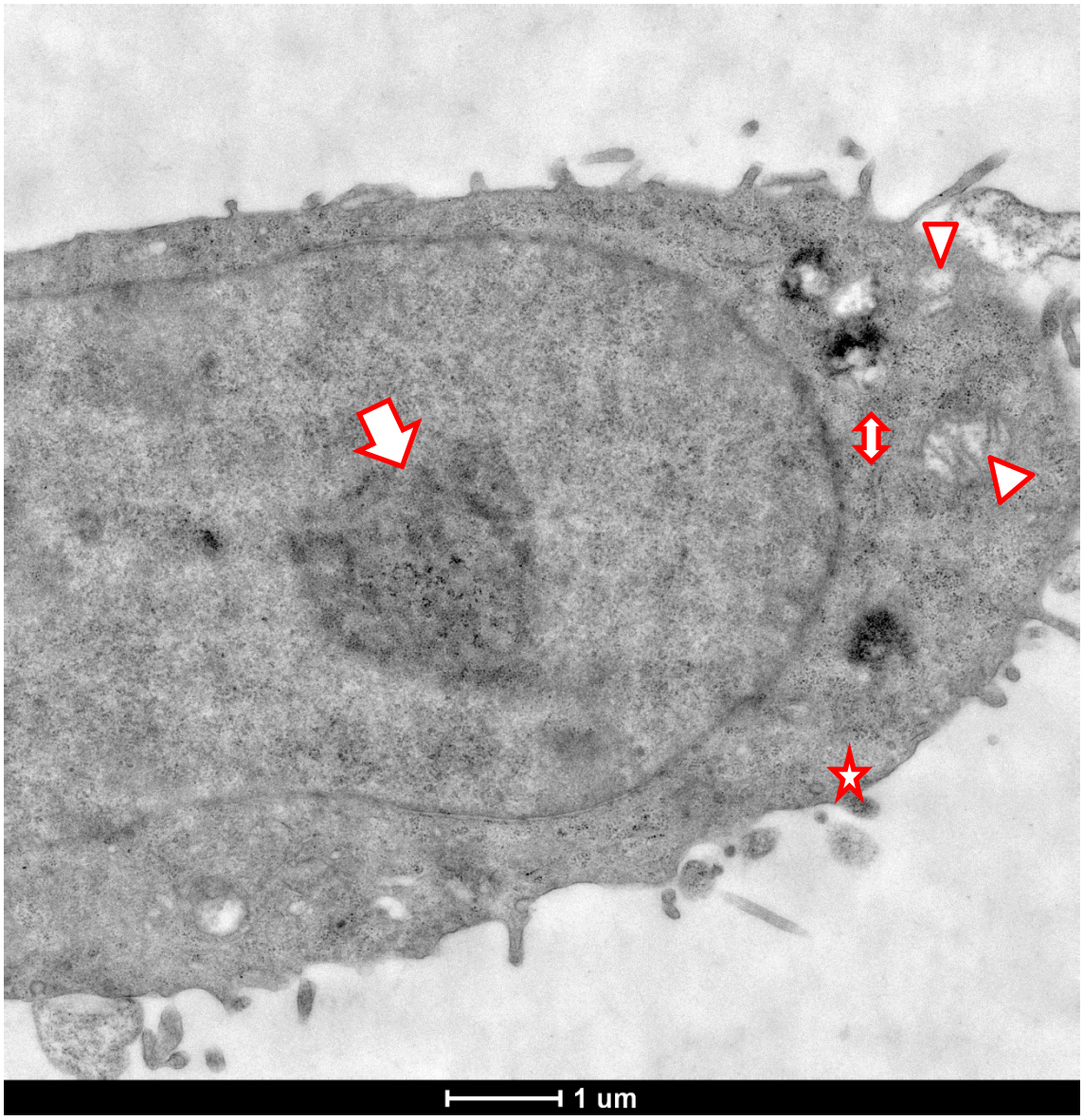
Görsel 3.8. *H-ras 5RP7 Kontrol Hücrelerinin TEM Görüntüsü. Ok başı-> Normal Çekirdek Membranı, Ok-> Mitokondri, Yıldız-> Hücre İskeleti ve Organeller, Çift Ok-> Normal Hücre Membranı*

3.4.2. Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişikliklerin geçirimli elektron mikroskobik bulguları

Sinnamaldehit'in 46,88 µM IC_{50} konsantrasyonun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinde neden olduğu ince yapısal değişiklikler TEM ile incelenip oluşan Görsel 3.9. ve Görsel 3.10. ile gösterilmiştir.



Görsel 3.9. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü. Ok başı->Hücre Membranının Dışa Doğru Tomurcuklanması, Ok-> Kromatin Kondenzasyonu*



Görsel 3.10. *Sinnamaldehit'in IC_{50} Konsantrasyonuna 24 Saat Süreyle Maruz Bırakılan H-ras 5RP7 Hücrelerinin TEM Görüntüsü. Ok başı-> Mitokondri Şişmesi ve Krista Kaybı, Ok-> Kromatin Kondenzasyonu, Çift Ok-> Şişmiş Endoplazmik Retikulum Kanalı, Yıldız-> Membran Tomurcuklanması*

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, hücre döngüsünün düzenlenmesi aşamasında görevli sinyallere uymayan; bu nedenle aşırı derecede bölünüp, oluştuğu sınırların dışına çıkarak diğer dokuları da istila edebilen dünyadaki ölüm nedenleri arasında ilk sıralardaki yerini koruyan ciddi bir hastalıktır. Kanserin yaş ile bir ilgisinin olmadığı gibi yaklaşık her üç kişiden biri yaşamının bir döneminde bu hastalıkla karşılaşmaktadır. Dünya genelinde görülme sıklığının oldukça fazla olması, bilim insanlarını kanserin sebeplerini anlamaya, önleme çalışmaları yapmaya ve tedavi yöntemleri geliştirmeye yönlendirmiştir. Kanser alanında yapılan çalışmalar bilimin her alanında ilgi odağı haline gelmiştir [11].

Çalışmamızda tarçının aktif bir bileşeni olan Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 sıçan embriyo fibroblast kanser hücreleri ile NIH/3T3 normal fare embriyo fibroblast hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri karşılaştırılmıştır. Sitotoksisiteyi belirlemek amacıyla yapılan MTT testlerinin sonuçları Microsoft Office Excel programı kullanılarak grafik haline getirilmiş ve IC_{50} değeri H-ras 5RP7 hücreleri için 46,88 µM, NIH/3T3 hücreleri içinse 63,06 µM olarak hesaplanmıştır ve grafik üzerinde belirtilmiştir (Bkz. Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.). Bu sonuçlar Sinnamaldehit'in 24 saatlik kısa uygulama sonucunda kullanılan hücre üzerinde doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. H-ras 5RP7 hücrelerinde bulunan IC_{50} değerinin NIH/3T3 değerinden düşük olması Sinnamaldehit'in kanser hücrelerine seçici olma potansiyeli taşıyabileceğini göstermektedir. Ayrıca H-ras 5RP7 hücreleri için belirlenen Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonu sağlıklı hücrelere verildiğinde anlamlı bir ölüm ortaya konulmamıştır.

Flow sitometrik analiz ile Anneksin V uygulamasında H-ras 5RP7 kontrol hücrelerinin apoptotik profiline bakıldığında hücre popülasyonunun %1,60'ının erken apoptotik dönemde, %3,35'inin geç apoptotik dönemde olduğu, toplam apoptotik hücre popülasyonun ise %4,95 olduğu tespit edilmiştir. Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerindeki apoptotik profilde hücre popülasyonunun %13,94'unun erken apoptotik dönemde olduğu, %13,65'inin geç apoptotik dönemde olduğu ve toplam apoptotik hücre popülasyonun da %27,60 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun apoptozu indüklediği anlaşılmaktadır. Ayrıca çalışmamızda normal fibroblast hücresi olarak kullanılan NIH/3T3 hücrelerine ait Anneksin V uygulaması sonucunda ise

toplam apoptotik hücre popülasyonu kontrol hücrelerinde %2,35 iken, Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı NIH/3T3 hücrelerinde %14,50 olarak tespit edilmiştir. Anneksin V bulgularından yola çıkarak Sinnamaldehit'in kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği, özellikle H-ras 5RP7 hücreleri üzerinde etkin bir antiproliferatif etkisinin olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 3.3.-Şekil 3.6.).

Kaspaz 3-7 uygulamasının flow sitometrik analizi dikkate alındığında H-ras 5RP7 hücrelerinde kontrol grubunda toplam apoptotik hücre popülasyonu %4,65 iken, Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun 24 saat uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerindeki toplam apoptotik hücre popülasyonu %16,65'e yükselmiştir. Bu sonuçtan anlaşılacağı gibi Sinnamaldehit uygulaması sonrası hücrelerde Kaspaz 3-7 aktive olmuştur (Bkz. Şekil 3.7.- Şekil 3.10.). Bu sonuç üzerinden Sinnamaldehit'in bu hücreler üzerinde indüklediği apoptoz şeklinin kaspaza bağımlı olabileceği sonucu çıkmaktadır.

Apoptozun morfolojik olarak tespit edildiği konfokal mikroskopi görüntülerine bakıldığında Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun uygulandığı H-ras 5RP7 hücrelerinde; hücre iskeletinde parçalanma ve delik oluşumu, kromatin kondenzasyonu, hücre büzüşmesi, hücre membranın tomurcuklanması, çekirdek parçalanması, hasarlı çekirdek yapısı gibi apoptozun belirteci olan mikroskobik sonuçlara ulaşılmıştır (Bkz. Görsel 3.1.- Görsel 3.7.).

TEM ile Sinnamaldehit'in IC_{50} konsantrasyonunun uygulandığı H-ras 5RP7 kanser hücrelerindeki ince yapısal değişikliklere bakıldığında; hücre membranının dışa doğru tomurcuklanması, kromatin kondenzasyonu, mitokondri şişmesi ve krista kaybı, şişmiş endoplazmik retikulum kanalı gibi kanser hücrelerini apoptoza sürükleyen görüntüler elde edilmiştir (Bkz. Görsel 3.8 - Görsel 3.10.). Bu bulgular Sinnamaldehit uygulaması sonrasında tetiklenen apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişikliklerini ifade etmektedir.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneyler ve bunların bulguları neticesinde Sinnamaldehit'in H-ras 5RP7 hücrelerinde sitotoksik etkisinin olduğu ve apoptozise neden olduğu ortaya konulmuştur. NIH/3T3 hücrelerinin sonuçları ile karşılaştırıldığında H-ras 5RP7 hücrelerinde Sinnamaldehit daha düşük dozda sitotoksisite göstermiş, morfolojik ve ince yapısal olarak daha net apoptoz bulgularına

neden olmuştur. Bu nedenle Sinnamaldehit'in araştırma sonuçlarına göre antikanser ajanı olarak kullanılması seçici özelliği sahip olabileceğinden ve apoptozu indüklediğinden kanser tedavisi için alternatif bir çözüm niteliği taşıyabileceğini vurgulanmaktadır. Yapılan araştırmalar doğrultusunda Sinnamaldehit'in ilerleyen dönemlerde nano formunun oluşturulup antikanser ilacı olarak biyoteknolojik bir ürün haline getirilebileceği çalışmalar yapılabilecektir. Böylelikle kemoterapiye alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] Cancer Fact sheet September (2018). World Health Organization. http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer (Erişim Tarihi: 04.12.2018)

[2] TÜİK. Ölüm Nedeni İstatistikleri (2015). http://www.tuik.gov.tr/ PreHaberBultenleri.do?id=21526 (Erişim Tarihi: 04.12.2018)

[3] Boyle, P. ve Levin, B. Dünya Kanser Raporu (2008). *Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu Yayını*, Lyon, Fransa.

[4] Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2018). Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. Ankara.

[5] Tarini, Sinha. (2018). Tumors: Benign and Malignant. *Canc Therapy & Oncol Int J.*, 10(3), 555790.

[6] Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

[7] Golias, C.H., Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K. (2004). Cellproliferation and cell cycle control: a mini review. *Blackwell Publishing Limited International Journal of Clinical Practice*, 58, 1134-1141.

[8] Loddish, H., Berk, A., Zipurskyb, S.L., Matsudairan, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2001). *Molecular Cell Biology: Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle, 4 th ed.* New York: W.H. Freeman and Company, 495-536.

[9] Park, M.T. and Lee, S.J. (2002). Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 60-65.

[10] Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. and Berneman, Z.N. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36, 165-175.

[11] Klug, W.S., Cummings, M.R. and Spencer, C.A. (2011). *Genetik kavramlar.* (Çev: C. Öner., S. Sümer., R. Öner., A. Öğüş. ve L. Açık.) Ankara: Palme Yayıncılık.

[12] Canpolat, F. (2016). Hücre Siklüsü ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1 (1), 11-17.

[13] Garrett, M.D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research*, Haddow Laboratories, Sutton, Surrey, 81(5), 515-522.

[14] Flatt, P.M. and Pietenpol, J.A. (2000). Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev*, 32, 283-305.

[15] Senderowicz, A.M. and Sausville, E.A. (2000). Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst*, 92, 376-87.

[16] Yokus, B. ve Cakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 7-18.

[17] Onat, T., Emerk, K. ve Sözmen, E.Y. (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme yayıncılık.

[18] Nussbaum, R.L., McInnes, R.R. and Willard, H.F. (2001). *Genetics and cancer.* Thompson & Thompson Genetics in medicine 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 311-334.

[19] Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (2001). The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. *McGraw-Hill*, 613-74.

[20] Kopnin, B.P. (2000). Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 1, 2-27.

[21] Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R., Lee, E., Bradley, A., Li, W., Bertino, J. and Wahl, G. (1995). Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5436–40.

[22] Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.

[23] Altunkaynak, B. Z. ve Özbek, E. (2008). Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93-104.

[24] Solakoğlu, Z. (2009). Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, *22*(3), 20-25.

[25] Coşkun, G. ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3).

[26] Vaskivuo, T. (2002). *Regulation of apoptosis in the female reproductive system*. University of Oulu.

[27] Walker, P. R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S. and Sikorska, M. (1999). Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods*, 17(4), 329-338.

[28] Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1), 91-95.

[29] Cohen, J. J. (1998). Apoptosis To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*, 1,1-19.

[30] Staley, K., Blaschke, A. J. and Chun, J. (1997). Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semi-quantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell death and differentiation*, 4(1), 66.

[31] Öztürk, F. (2002). Apopitoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(2), 143-148.

[32] Akşit, H. ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. Y*üzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi* Dergisi, 19(1), 55-63.

[33] Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M. P., Tarcsa, E. and Piacentini, M. (1989). Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS letters*, 245(1-2), 150-154.

[34] Yamaguchi, M. and Sakurai, T. (1991). Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on Ca2+ activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *FEBS letters*, *279*(2), 281-284.

[35] Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., and Bredesen, D. E. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*, 16(8), 1093.

[36] Dinçel, G. Ç., ve Oguz, K. U. L. (2016). Patolojik Apoptozis ve Tanı Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, *5*(1), 86-108.

[37] Nguyen, V. T., Ndoye, A., Hall, L. L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Kist, D. A., Zelickson, B. D., Lawry M. A. and Grando, S. A. (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of cell science*, *114*(6), 1189-1204.

[38] Riede, N. and Werner, M. *Color atlas of pathology*. https://books.google.com.tr/books?id=N5D_d5Wi3n8C&pg=PA128&lpg=PA128&dq=programmed+cell+death+apoptosis&source=bl&ots=TK_4EQAzxh&sig=P

G7MijSHTyz5xoVUYCBxEtdqnpQ&hl=tr&ei=hqouSoH_NouPsAbynZ28CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result#v=onepage&q=programmed%20cell%20death%20apoptosis&f=false. (Erişim Tarihi: 03.02.2019)

[39] Antar, V. (2005). *Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph' nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği.

[40] Ulukaya, E. (tarihsiz) *Apoptozis Ders Notları*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

[41] Turgut, B., Demir, T. ve Celiker, Ü. (2006). Oftalmolojide apopitoz. *Fırat Tıp Dergisi*, *11*(1), 6-11.

[42] Mountz, J. D. and Zhou, T. (2001). Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ (Ed.), A Textbook of Rheumatology: Artritis and allied conditions. *Lippincott-Williams & Wilkins*, Pennsylvania, USA.

[43] **http-1:** http://www.nih3t3.com (Erişim Tarihi:09.03.2019)

[44] **http-2:** https://altogen.com/product/nih3t3-transfection-reagent-swiss-mouse-fibroblasts (Erişim Tarihi:09.03.2019)

[45] Kaplan, A., Çiftçi, G. A. and Kutlu, H. M. (2015). Melatonin induces antiproliferative activity through modulation of apoptoticpathway in H-ras oncogene transformed 5RP7 cells. *Turkish Journal of Biology*, *39*(6), 879-887.

[46] Dutta, A. and Chakraborty, A. (2018). Cinnamon in Anticancer Armamentarium: A Molecular Approach. *Journal of toxicology*, 1-8.

[47] Schoene, N. W., Kelly, M. A., Polansky, M. M. and Anderson, R. A. (2005). Water-soluble polymeric polyphenols from cinnamon inhibit proliferation and alter cell cycle distribution patterns of hematologic tumor cell lines. *Cancer letters*, *230*(1), 134-140.

[48] Koppikar, S. J., Choudhari, A. S., Suryavanshi, S. A., Kumari, S., Chattopadhyay, S. and Kaul-Ghanekar, R. (2010). Aqueous cinnamon extract (ACE-c) from the bark of Cinnamomum cassia causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential. *BMC cancer*, *10*(1), 210.

[49] Ng, L. T. and Wu, S. J. (2011). Antiproliferative activity of Cinnamomum cassia constituents and effects of pifithrin-alpha on their apoptotic signaling pathways in Hep G2 cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 1-6.

[50] Wu, S. J., Ng, L. T. and Lin, C. C. (2005). Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human PLC/PRF/5 cells through activation of the proapoptotic Bcl-2 family proteins and MAPK pathway. *Life Sciences*, *77*(8), 938-951.

[51] Ka, H., Park, H. J., Jung, H. J., Choi, J. W., Cho, K. S., Ha, J. and Lee, K. T. (2003). Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer letters*, *196*(2), 143-152.

[52] Larasati, Y. A. and Meiyanto, E. (2018). Revealing the Potency of Cinnamon as an Anti-cancer and Chemopreventive Agent. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, *9*(1), 47-62.

[53] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, *65*(1-2), 55-63.

[54] Fotakis, G. and Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, *160*(2), 171-177.

[55] **http-3:** http://enfeksiyonhastaliklari.com/thoma-lami-ile-hucre-sayimi (Erişim Tarihi: 06.04.2019)

[56] Hingorani, R., Deng, J., Elia, J., Mclntyre, C. and Mittar, D. (2011). Detection of Apoptosis Using the BD Anneksin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System. *BD Biosciences*.

[57] Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Univ Vet Fak Dergisi*, 6 (1), 112, 118.

[58] **http-4:** https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/67480/mod_resource/content/0/Sitotoksisite.pdf (Erişim Tarihi: 16.04.2019)

[59] Yaramış, A. (2011). *İnsan meme kanseri MCF7 hücre dizisinde fumagillinin antikanserojenik etkilerinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Kübra URAL

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı: Eskişehir/ 1990

E-Posta: kubraural2@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2009-2014, Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı
- 2015-2018, Biyoloji Öğretmeni, Sınav Eğitim Kurumları (Bozüyük/Bilecik)

Bilimsel Faaliyetleri:

- 2019, Lipit Araştırmalarında Kanser ve Lipidomiks Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Sistemi & Eskişehir Teknik Üniversitesi
- 2015, 6.Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi Düzenleme Kurulu, Ankara Üniversitesi
- 2014, TUBİTAK 2209- Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı- A (2013-2) "Agara Alternatif Jelleştirici Isubgol ve Sukroza Alternatif Çay Şekeri Kullanılarak in vitro Ortamda Allium cepa'nın Mikroçoğaltımı" Proje Yürütücüsü
- 2014, TUBİTAK 2229 Biyoloji Lisans Öğrencilerine Proje Eğitimi, Antalya
- 2014, 5.Ulusal Çevre ve Ekoloji Öğrenci Kongresi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi
- 2014, 11. Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi
- 2014, 9.Moleküler Biyoteknoloji Bahar Okulu, Karadeniz Teknik Üniversitesi