T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN *İN VİTRO* ANTİKANSER ve APOPTOTİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fulya Tuğba ARTUN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Aralık, 2018

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ali KARAGÖZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Özge ÇELİK
Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Doç. Dr. Betül KARADEMİR
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 24601 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince maddi ve manevi her konuda benden destek, sevgi ve ilgisini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan değerli hocam Prof.Dr. Ali KARAGÖZ'e en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine,

Tezimde kullanılan bitkileri temin ettiğimiz İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Çağlayan GÜRER'e,

Sitotoksisite çalışmalarımın bir kısmımı xCELLigence RTCA DP cihazını kullanarak gerçekleştirmeme olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Dr.Öğr. Üyesi Mehmet R. TOPÇUL ve Araş. Gör. Dr. İdil ÇETİN'e,

Tez çalışmam boyunca tecrübelerinden yararlandığım ve maddi ve manevi destek aldığım İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. Gül ÖZCAN hocama,

Bilgi ve tecrübelerinden tez çalışmam sırasında yararlandığım Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Cenk KIĞ hocama,

Tez çalışmam sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım arkadaşlarım Araş. Gör. Utku GÜNEŞ'e, Aslıhan ŞENGELEN'e ve Yunus AKSÜT'e teşekkür ederim.

Varlıklarından güç aldığım sevgili eşim Fatih ARTUN ve biricik oğlum Metehan ARTUN'a bu süreçte bana verdikleri destek ve gösterdikleri sabır için teşekkür ederim.

Aralık 2018 Fulya Tuğba ARTUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xvi**
SUMMARY ..... **xix**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. KANSER 3
2.2. HÜCRE SİKLUSU KONTROL NOKTALARI 6
2.3. ÇEŞİTLİ SİNYAL İLETİM YOLLARI VE KANSER 9
2.3.1. Protein Kinazlar ve Sinyal İletimi 10
2.3.2. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu 11
2.3.3. Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser 11
2.3.4. PI-3 kinaz/Protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu ve Kanser 12
2.3.5. Nonreseptör Tirozin Kinazlar ile Sinyal İletim Yolu ve Kanser 14
2.3.6. STAT Proteinleri ile Sinyal İletim Yolu ve Kanser 14
2.3.7. Adenovirüs Proteinlerinin Sinyal İletim Yollarında Etkileri ve Kanser 16
2.4. HÜCRE ÖLÜM ÇEŞİTLERİ 16
2.4.1. Nekroz 17
2.4.2. Otofaji 17
2.4.3. Paraptoz 18
2.4.4. Otoşizis (Otoparçalanma) 19
2.4.5. Apoptoz 20
2.4.5.1. Apoptoz Mekanizmaları 22
2.4.5.2. Kaspaz Aktivasyonu, İşlevi ve Düzenlenmesi 30
2.4.5.3 Apoptozun Genetik Kontrolü 32
2.4.5.3.1. Antiapoptotik proteinler 32
2.4.5.3.2. Proapoptotik proteinler 33

2.4.5.4 Apoptozun Kanserdeki Rolü.....33
2.4.5.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....36
2.4.6. Etnomedikal Bitkiler ve Kanser 40
2.4.6.1. Klinikte Antikanser Ajan olarak Kullanılan Bitkiler 41
2.4.6.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Etnomedikal Bitkiler.....42
3. MALZEME VE YÖNTEM.....46
3.1. BİTKİLERİN ELDESİ VE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI.....46
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI 46
3.3. BİTKİ EKSTRELERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ 47
3.3.1. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi 48
3.3.2. Sitotoksisitenin Morfolojik olarak Değerlendirilmesi 49
3.3.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi 49
3.4. APOPTOZUN FARKLI YÖNTEMLERLE TAYİNİ 51
3.4.1. Apoptozun Flow sitometri (Hücre Akış Ölçer) İle Tayini.....51
3.4.2. Kaspaz 3,7 ve Kaspaz 9 Aktivitesinin Spektroflorometre İle Tayini 53
3.4.3. Apoptozun Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Tayini 54
3.4.3.1. Total RNA İzolasyonu 54
3.4.3.2. Total RNA'lardan c-DNA Sentezi.....55
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....58
4. BULGULAR.....59
4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ 59
4.1.1. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi.....59
4.1.2. Sitotoksisitenin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi 66
4.1.3. xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi 71
4.2. APOPTOZUN FARKLI YÖNTEMLERLE TAYİNİ 74
4.2.1. Flow sitometre Analizi Sonuçları 74
4.2.2. Kaspaz 3,7 ve Kaspaz 9 Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....78
4.2.3. RNA İzolasyonu Sonuçları 80
4.2.4. qRT-PCR Analizi Sonuçları 80
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 82

KAYNAKLAR **90**
ÖZGEÇMİŞ **96**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Gelişmiş ve daha az gelişmiş bölgeler için, her iki cinsiyetten, 2012 için oranlara sahip yeni vakaların tahmini küresel sayıları. Dairenin alanı, yeni vakaların sayısıyla orantılıdır [8].....4

Şekil 2.2: Kanser işaretleri: kanser hücresi çoğalması ve ilerlemesi için gerekli olan faktörler [18].....8

Şekil 2.3: Hücre sağkalımı, Hücre kaderi ve Genom düzenlenmesini içeren kanserin 3 çekirdek fonksiyonundan sorumlu olan 12 sinyal yolu [18]. 9

Şekil 2.4: 5 ana hücre ölüm tipinin morfolojik özellikleri. 21

Şekil 2.5: Apoptotik olayların şematik gösterimi. 23

Şekil 2.6: Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik diyagramı. 28

Şekil 2.7: Apoptotik sinyal yollarının şematik gösterimi.....29

Şekil 2.8: *İn vitro* antikanser ve apoptotik aktiviteleri değerlendirilen etnomedikal bitkilerin görünümleri.....43

Şekil 3.1: A) xCELLigence RTCA DP cihazı (Acea Biosciences), B) E-plate 16 kuyucuklu (Acea Biosciences) 50

Şekil 3.2: Flowsitometre sistemi (BD FACSCalibur™ Flow Cytometry).....52

Şekil 3.3: Biorad CFX Connect qRT-PCR cihazı.....57

Şekil 4.1: Ekstrelerin Vero hücrelerindeki sitotoksik etkileri.....60

Şekil 4.2: Ekstrelerin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkileri.....61

Şekil 4.3: Ekstrelerin A549 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.....62

Şekil 4.4: Ekstrelerin Mcf-7 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.....63

Şekil 4.5: Ekstrelerin PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.....64

Şekil 4.6: Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücre hatları için IC_{50} değerleri 65

Şekil 4.7: *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücre hatları için IC_{50} değerleri.....65

Şekil 4.8: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 24. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....67

Şekil 4.9: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 48. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....67

Şekil 4.10: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....68

Şekil 4.11: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 48. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....68

Şekil 4.12: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....69

Şekil 4.13: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 48. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....69

Şekil 4.14: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....70

Şekil 4.15: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).....70

Şekil 4.16: Vero hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=557,8 µg/mL, R^2=0,990) 71

Şekil 4.17: HeLa hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=18,3 µg/mL, R^2=0,976) 72

Şekil 4.18: Vero hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda Doxorubicin kanser ilacının uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=19,2 µM, R^2=0,992).....72

Şekil 4.19: HeLa hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda Doxorubicin kanser ilacının uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=7,8 µM, R^2=1).....73

Şekil 4.20: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen boyasız HeLa hücreleri.....74

Şekil 4.21: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen Annexin V boyalı Canlı HeLa hücreleri 75

Şekil 4.22: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen PI boyalı Ölü HeLa hücreleri 75

Şekil 4.23: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen Kontrol grubundaki HeLa hücreleri (48. saat) 76

Şekil 4.24: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin IC_{50} konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki HeLa hücreleri (48. saat) 76

Şekil 4.25: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki HeLa hücreleri (48. saat) 77

Şekil 4.26: *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL ve IC_{50} konsantrasyonları uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki HeLa hücrelerinin % hücre değerlerinin gösterimi.*$p<0,05$ Kontrole göre anlamlılık 78

Şekil 4.27: *C. hermannii* bitiki ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saatte deney gruplarındaki kaspaz 3, 7 ve 9' un kontrole göre kat değişim oranları 79

Şekil 4.28: *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanmış HeLa hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve otofajik genlerin kontrole göre kat değişimleri (48.saat) * Kat değişimi ≥2 81

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: *İn vitro* antikanser ve apoptotik aktiviteleri değerlendirilen etnomedikal bitkilerle ilgili genel bilgiler. 42

Tablo 3.1: c-DNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları 56

Tablo 3.2: qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri 57

Tablo 4.1: Ekstrelerin Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri 59

Tablo 4.2: Ekstrelerin HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri 60

Tablo 4.3: Ekstrelerin A549 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri 61

Tablo 4.4: Ekstrelerin Mcf-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri 62

Tablo 4.5: Ekstrelerin PC-3 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri 63

Tablo 4.6: *C. hermannii* ve Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücreleri için MTT analizinden elde edilen IC_{50} ve SI değerleri 66

Tablo 4.7: *Centaurea hermannii* ve Doxorubicin'in MTT analizi ve xCELLigence RTCA DP sistemi ile belirlenen IC_{50} ve SI değerleri 73

Tablo 4.8: *C. hermannii* ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saatte kontrol ve deney gruplarındaki kaspaz 3, 7 ve 9' un floresan ışıma değerleri (±SD) *p<0,05 Kontrole göre anlamlılık 79

Tablo 4.9: 48 saat süreyle *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin nanodrop sonuçları 80

Tablo 4.10: *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanmış HeLa hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve otofajik genlerin anlatım seviyelerindeki değişim (48. saat) * Kat değişimi ≥2 81

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

µg : Mikrogram
ng : Nanogram
µL : Mikrolitre
µM : Mikromolar
mg : Miligram
mL : Mililitre
µm : Mikrometre
nm : Nanometre
% : Yüzde
kDa : Kilo dalton
x g : Nispi merkez kaç kuvveti
cm^2 : Santimetre kare
ºC : Santigrat
CT : Eşik döngüsü
SD : Standart sapma

Kısaltmalar **Açıklama**

AIF : Apoptoz indükleyici faktör
ATG3 : Otofaji ilişkili gen 3
ATG5 : Otafaji ilşkili gen 5
ATP : Adenozin trifosfat
Bcl-2 : B hücreli lenfoma 2
BECN : Beclin-1
CAD : Kaspaz ile aktive edilmiş nükleaz
CAK : Siklin bağımlı aktive edici kinaz
CARD : Kaspaz alım bölgesi
Cdks : Siklin bağımlı kinazlar
CIS : Sisplatin
CYLD : Silindromatozis tümör baskılayıcı protein

DED : Ölüm efektör alanı
DISC : Ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
DR : Ölüm reseptörü
EDTA : Etilen diamin tetra asetik asit
EGF : Epidermal büyüme faktörü
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium
ER : Endoplazmik retikulum
ERK : Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz
FADD : Fas ilişkili ölüm alanı
FAK : Fokal adezyon kinazı
FAS : İlk apoptoz sinyal resöptör
FBS : Fetal bovine serum
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
FITC : Floresan İzotiyosiyanat
FLIP : FLICE benzeri inhibe edici protein
GOF : Fonksiyon kazandıran mutasyonlar
GTPaz : Guanozin trifosfataz
HRK : Harakiri geni
ICAD : Kaspaz ile aktive edilmiş DNaz inhibitörü
IC_{50} : Hücrelerin % 50'sinin ölümüne neden olan ekstre konsantrasyonu
IGF 1 : İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
JAK : Janus ailesi kinazları
LDH : Laktat dehidrojenaz
LSCM : Lazer taramalı konfokal mikroskopi
LUBAC : Lineer ubikitin birleştirme kompleksi
MAPK : Mitojen aktive edici kinazlar
miRNA : mikro RNA
MLKL : Karışık soy kinaz domeni benzeri protein
MOMP : Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu
MPT : Mitokondriyal geçirgenlik geçişi
mRNA : Mesajcı RNA
mTOR : Rapamisinin memeli hedef proteini

MTS : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum

MTT : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid

NF- : Nüklear faktör-

NGF : Sinir büyüme faktörü

PAK2 : p21 ile aktive olan kinaz 2

PARP1 : Poli (ADP-riboz) polimeraz -1 geni

PCD : Programlanmış hücre ölümü

PCNA : Çoğalan hücre nüklear antijeni

PDGF : Trombosit kökenli büyüme faktörü

PIP3 : Fosfotidilinositol trifosfat

PI-3K : Fosfoinositid-3 kinaz

PKB : Protein kinaz B

PTEN : Fosfataz ve tensin homolog

P53 : Tümör baskılayıcı

qRT-PCR : Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RB : Retinoblastoma duyarlılık geni

RIPK : Reseptör etkileşimli serin/treonin protein kinaz 1

RNA : Ribonükleik asit

ROCKI : Rho ile ilişkili kinaz

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute 1640

RTCA DP : Gerçek zamanlı hücre analizi

RTK : Reseptör tirozin kinazlar

SH2 : Src-homoloji-2

SI : Seçicilik indeksi

STAT : Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü

TCR : T hücresi reseptörü

TEM : Transmisyon elektron mikroskobu

TGF-β : Tümör büyüme faktörü β

TLR : Toll benzeri reseptör

TNF : Tümör nekroz faktörü

TNFRSF10A : Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süper Ailesi Üyesi 10A

TNFRSF10B : Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süper Ailesi Üyesi 10B

TRADD : TNF reseptörü ilişkili ölüm alanı

TRAIL : TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

WST : 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum

XIAP : X ilişkili apoptoz inhibitör proteini

XTT : 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid

4E-BP : Ökaryotik başlatma faktörü 4E ile bağlanan protein

ÖZET

BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN *İN VİTRO* ANTİKANSER ve APOPTOTİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Fulya Tuğba ARTUN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Bu tez çalışmasında, 3'ü Türkiye'ye endemik olan 7 metanolik bitki ekstresinin Vero [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı], HeLa (insan serviks kanseri epitel hücre hattı), A549 (insan akciğer kanseri epitel hücre hattı), Mcf-7(insan meme kanseri epitel hücre hattı) ve PC-3 (insan prostat kanseri epitel hücre hattı) hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) Kolorimetrik Yöntemi ile belirlenmiştit. Potansiyel antikanser aktiviteye sahip olan *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin ve kemoterapötik ajan olan Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini doğrulamak amacıyla xCELLigence RTCA DP sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir. Daha sonra potansiyel antikanser aktiviteye sahip olan *C. hermannii* ekstreninin apoptotik aktivitesi biyokimyasal (Flow sitometri analizi), florometrik (Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonu analizi) ve moleküler (qRT-PCR analizi) olarak değerlendirilmiştir.

MTT analizi ile 48. saatte elde edilen veriler değerlendirildiğinde *C. hermannii* ekstresisinin sağlıklı hücre hattı Vero'daki düşük sitotoksisitesi ve serviks kanseri hücre hattı HeLa'daki seçici yüksek sitotoksisitesi potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Kemoterapötik ajan olan Doxorubicin'in ve *C. hermannii* bitki ekstresinin sitotoksik etkileri Vero ve HeLa hücre hatları üzerinde denenerek elde edilen verilerle IC_{50} (Hücrelerin %

50'sinin ölümüne neden olan ekstre konsantrasyonu) ve SI (Seçicilik indeksi; SI= IC_{50} Vero hücresi / IC_{50} HeLa hücresi) değerleri hesaplanmıştır. *C. hermannii* bitki ekstresinin seçicilik indeksi ile Doxorubicin'in seçicilik indeksi değerleri karşılaştırılmıştır. IC_{50} değerleri Vero hücre hattında *C. hermannii* için 599 µg/mL ve Doxorubicin için 21,2 µM, HeLa hücre hattında *C. hermannii* için 15,74 µg/mL ve Doxorubicin için 8,4 µM olarak bulunmuştur. SI değerleri ise sırasıyla *C. hermannii* için 38,1, Doxorubicin için 2,5 olarak bulunmuştur.

xCELLigence RTCA DP sistemi ile hücre indeksi parametlerinin analizi sonucunda IC_{50} değerleri Vero hücre hattında *C. hermannii* için 557,8 µg/mL ve Doxorubicin için 19,2 µM, HeLa hücre hattında *C. hermannii* için 18,3 µg/mL ve Doxorubicin için 7,8 µM olarak bulunmuştur. SI değerleri ise *C. hermannii* için 30,5 iken Doxorubicin için 2,5 olarak hesaplanmıştır. MTT analizinden elde edilen veriler hem morfolojik değerlendirmeler ile hem de xCELLigence sistemi ile yapılan analiz sonuçlarıyla tutarlı olarak bulunmuştur.

Potansiyel antikanser aktiviteye sahip *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik aktivitesinin tayini 3 farklı yöntemle ortaya konulmuştur. Deneylerde Vero hücreleri için toksik olmayan fakat HeLa hücreleri için toksik olan (100 µg/mL) ve HeLa hücreleri için yarı öldürücü olan (IC_{50}=15,74 µg/mL) iki konsantrasyon uygulanmıştır. *C. hermannii* ekstresinin uygulandığı apoptoza giden HeLa hücrelerinin sayısı FITC işaretli Annexin V ile flow sitometri analizi ile tespit edilmiştir. *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL ve IC_{50} konsantrasyonları uygulanan HeLa hücrelerinin canlı, ölü ve geç apoptotik popülasyonları kontrol grubuna göre anlamlı olup bu bitki ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar sitotoksisite sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

C. hermannii ekstresinin HeLa hücrelerindeki antikanser aktivitesinin apoptoz ölüm yolu ile gerçekleştiği flow sitometri analizi ile belirlendikten sonra apoptotik aktivitenin belirlenmesi için önemli bir diğer yöntem olan kaspaz aktivitesi tayini ile *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerindeki kaspaz 3,7 ve 9'un aktivasyonuna etkisi belirlenmiştir. *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik kaskadın başrol oyuncuları olan yürütücü kaspazlardan kaspaz 3,7 ve başlatıcı kaspazlardan kaspaz 9'un aktivasyonunu arttırdığı spektroflorometrik olarak belirlenmiştir.

Son olarak, *C. hermannii* ekstresinin uygulandığı HeLa hücrelerinde apoptoz, nekroz ve otofajiye özgü genlerin anlatım seviyeleri qRT-PCR analizi ile belirlenmiştir. qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen verilere göre apoptotik genlerden *FAS*, *HRK* ve *TNFRSF10B* genleri *C. hermannii* bitki ekstresinin her iki konsantrasyonunda da HeLa hücrelerinde yukarı regüle olmuştur. Nekrotik genlerden *RIPK*, HeLa hücrelerinde *C. hermannii* bitki ekstresinin oldukça toksik olan 100 µg/mL konsantrasyonunda aşırı yukarı regüle edilmiştir. *RIPK*, *C. hermannii* bitki ekstresinin IC_{50} konsantrasyonunda da yukarı regüle edilmiştir. Otofajik genlerden *BECN*, *C. hermannii* bitki ekstresinin her iki konsantrasyonunda da HeLa hücrelerinde yukarı regüle olmuş, *ATG3* ve *ATG5* genleri ise sadece *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda yukarı regüle edilmiştir.

Bu sonuçlar, *C. hermannii* ekstresinin serviks kanseri tedavisi için potansiyel olarak aktif yeni bir ilacı temsil edebileceğini ve umut veren sitotoksik ve apoptotik aktivitesi nedeniyle daha fazla çalışmayı destekleyebileceğini düşündürmektedir.

Aralık 2018, 118 sayfa.

Anahtar kelimeler: Bitki ekstreleri, Antikanser&Apoptotik aktivite, XCELLigence RTCA DP sistemi, Flow sitometri analizi, Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SUMMARY

ASSESSMENT of *IN VITRO* ANTICANCER and APOPTOTIC ACTIVITIES of SOME PLANT EXTRACTS

Ph.D. THESIS

Fulya Tuğba ARTUN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

In this thesis, cytotoxic effects of methanolic extracts of 7 plants, 3 of which are endemic species to Turkey, on Vero [African Green Monkey (*Cercopithecus aethiops*) kidney fibroblast cell line], HeLa (Human cervical adenocarcinoma cell line), A549 (Human lung carcinoma cell line), Mcf-7 (Human breast adenocarcinoma cell line) and PC-3 (Human prostate adenocarcinoma cell line) cells were determined by Mitochondrial Dehydrogenase Enzyme Activity (MTT) Colorimetric Method. In order to confirm the cytotoxic effect of *Centaurea hermannii* plant extract having potent anticancer activity and the chemotherapeutic agent Doxorubicin on Vero and HeLa cell lines, cell-index parameters were determined with xCELLigence RTCA DP system. Later, apoptotic activity of the extract with potential anticancer activity was then assessed as biochemically (flow cytometry analysis), fluorometrically (analysis of caspase 3,7 and 9 activation) and molecularly (qRT-PCR analysis).

When the results obtained at 48th hour in MTT assay evaluated, the low cytotoxicity of *C. hermannii* extract in healthy cell line Vero and its selective high cytotoxicity in cervical cancer cell line HeLa showed that *C. hermannii* extract had potent anticancer activity. IC_{50}

(The extract concentration causing 50% of the cells to die) and SI (Selectivity index; SI= IC_{50} of Vero cells/ IC_{50} of HeLa) values of Doxorubicin, the chemotherapeutic agent, and *C. hermannii* extract on Vero and HeLa cell lines were calculated by using the obtained data from cytotoxic effects of the chemotherapeutic agents Doxorubicin and *C. hermanni* extract on Vero and HeLa cell lines were calculated. The selectivity index of *C. hermannii* plant extract and the selectivity index of Doxorubicin were compared. IC_{50} values were found in the Vero cell line as 599 μg/mL for *C. hermannii* and 21.2 μM for Doxorubicin, 15.74 μg/mL for *C. hermannii* and 8.4 μM for Doxorubicin in the HeLa cell line. SI values were found as 38.1 for *C. hermannii* and 2.5 for Doxorubicin, respectively.

As the results of the analysis of cell index parameters with xCELLigence RTCA DP system, IC_{50} values were found as 557.8 μg/mL for *C. hermannii* and 19.2 μM for Doxorubicin in the Vero cell line, 18.3 μg/mL for *C. hermannii* and 7.8 μM for Doxorubicin in the HeLa cell line. SI values were calculated 30.5 for *C. hermannii* and 2.5 for Doxorubicin. The data obtained from the MTT analysis were consistent with the morphological evaluation as well as the results of the analysis with the xCELLigence RTCA DP system.

The determination of the apoptotic activity of *C. hermannii* extract with potential anticancer activity in HeLa cells was demonstrated by 3 different methods. In the experiments, two concentrations which were nontoxic to Vero cells but toxic to HeLa cells (100 μg/mL) and the concentration causing 50 % of the HeLa cells to die (IC_{50}= 15.74 μg/mL) were applied. The number of apoptotic HeLa cells treated with *C. hermannii* extract was determined by flow cytometry analysis with FITC-labeled Annexin V. The alive, dead and late apoptotic populations of HeLa cells treated with 100 μg/mL and IC_{50} concentrations of *C. hermannii* plant extract were significant in comparison to the control group and this plant extract was found to have apoptotic effect in HeLa cells. The results were found to be consistent with the cytotoxicity results.

After determining the apoptotic acvitiy of *C. hermannii* extract on HeLa cells by flow cytometry analysis, the effect of *C. hermannii* extract on the activation of caspases 3,7 and 9 in HeLa cells was determined by the caspase activity assay, another important method for determining apoptotic activity. *C. hermannii* extract enhanced the activation of the lead actors of the apoptotic cascade; caspase-9, the initiator caspase and caspase-3,7 the executer caspases in HeLa cells was determined, spectroflorometrically.

Finally, qRT-PCR analysis of expression levels of apoptosis, necrosis and autophage specific genes was determined in HeLa cells treated with *C. hermannii* extract. According to the results obtained by qRT-PCR analysis, the apoptotic genes *FAS, HRK* and *TNFRSF10B* were upregulated in HeLa cells at both concentrations of *C. hermannii* plant extract. *RIPK* from necrotic genes, was over-regulated at a highly toxic concentration of 100 μg/mL of *C. hermannii* plant extract in HeLa cells. *RIPK* was also upregulated at the IC_{50} concentration of *C. hermannii* plant extract. *BECN* from autophagic genes, was upregulated in HeLa cells at both concentrations of *C. hermannii* plant extract, *ATG3* and *ATG5* genes were upregulated only at 100 μg/mL concentration of *C. hermannii* plant extract.

These results suggest that the *C. hermannii* extract may represent a potentially active new drug for cervical cancer treatment and may support more studies due to promising cytotoxic and apoptotic activity.

December 2018, 118 pages.

Keywords: Plant extracts, Anticancer & Apoptotic activity, XCELLigence RTCA DP system, Flow cytometry, qRT-PCR.

1. GİRİŞ

Kanser vücudun farklı bölümlerini etkileyebilen bir dizi habis hastalık için kullanılan genel bir terimdir. Bu hastalık, bir büyüme veya tümör oluşturmak için birlikte kütle oluşturabilen veya vücutta çoğalan ve diğer bölgelerde anormal büyüme başlatan hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bir çoğalması ile karakterize edilmektedir [1,2]. İnsanlarda kanser için ana tedavi yöntemleri cerrahi, radyasyon ve kemoterapötik ajan kullanımı temeline dayanmaktadır. Kanserin ana nedeni hücresel büyüme, olgunlaşma ve programlanmış hücre ölümü üzerindeki normal kontrolleri azaltan veya ortadan kaldıran DNA'daki değişiklikler yani mutasyonlardır. Kanser hücreleri yakınlardaki dokuları istila etmeye ve vücudun uzak bölgelerine metastaz yapmaya devam eder. Metastaz karsinogenezin en ölümcül yönüdür. Süreç durdurulmazsa, organizmanın ölümüne neden olana kadar ilerleyebilmektedir [1].

Apoptoz, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş ve ortadan kaldırılmasını içeren programlanmış hücre ölümünün önemli ve ayırt edici bir formu olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz, belirli morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize edilen, birçok molekülün rol aldığı enerji bağımlı bir süreçtir. Uygun olmayan apoptoz (çok az ya da fazla) nörodejeneratif hastalıklar, iskemik zarar, otoimmün rahatsızlıklar ve birçok kanser türü ile sonuçlanmaktadır. Normal hücreler eğer antikanser ilaçlar ve radyasyon gibi fizyolojik olmayan stres tipleri ile karşılaşırsa ölüm için programlanırlar. Hücre çoğalması ve/veya yetersiz apoptoz ise kanser hücreleri için görülen en yaygın durumdur. Antiapoptotik proteinlerin aktivitesi ya da artmış anlatımı ve pro-apoptotik genlerdeki her iki inaktive edici mutasyon yetersiz apoptoz ve malign hücrelerin çoğalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle proapoptotik *p53* tümör süpresör genindeki mutasyonlar ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin anlatımındaki değişiklikler oldukça dikkate alınmalıdır. *p53*'ün mutasyona uğraması ya da delesyonu kanserde en sık görülen genetik anomali olup; *p53* fonksiyonunu inaktive eden ve *p53*'deki mutasyonlar sonucu oluşan insan tümörlerinin %50'sinden daha fazlası bu nedenle oluşmaktadır [3].

Dünyanın dört bir yanındaki bilim insanları, vücudun bağışıklık hücrelerini kansere karşı güçlendirmek için bitkisel ilaçlar üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. Antikanser bitkilerin çeşitli bileşenlerinin kompleks sinerjistik etkileşimini anlayarak, bitkisel formülasyonlar, kanserli

hücrelere, vücudun normal hücrelerine zarar vermeden etki edecek şekilde tasarlanabilmektedir. Bilinen kanser kemoterapötik ajan sınıfının yüzlerce kimyasal varyantı sentezlenmiştir, ancak bunların büyük bir kısmı ciddi yan etkilere sahiptir. Bu nedenle, kanser hastaları tedaviye devam ederken ciddi yan etkilere maruz kalmaktadırlar. İdeal bir antikanser ilacı, normal hücrelere zarar vermeden veya en az zararla kanser hücrelerini öldürmelidir. Bununla birlikte, çok fazla sayıda sentetik ilaç çalışması, prototip ilaçlar üzerinde nispeten küçük iyileştirmelere neden olmuştur. Potansiyel kemoterapötik ajanların tasarımında kullanılacak yeni prototiplere ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal ürünler bu tür şablonların oluşturulması için önemli olanaklar sunmaktadır. Son zamanlarda bitkise,l tümör inhibe edici bileşik ortaya koyma çalışmaları, ümit vadeden yeni bileşenlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır [1].

Bitkiler, biyolojik olarak aktif kimyasalların ana kaynakları arasında kabul edilmektedir. Avrupa ve ABD'deki reçeteli ürünlerin yaklaşık % 50'sinin doğal ürünlerden veya türevlerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Yeryüzündeki 250.000–500.000 bitki türünün, sadece % 1-10'u potansiyel tıbbi değerleri için kimyasal ve farmakolojik olarak incelenebilmiştir. Bitkiler, kemoterapötik ajan arayışında yeni maddeler ortaya koymak için neredeyse sınırsız bir kapasiteye sahiptir. Bitkilerde yeni antikanser bileşiklerin arayışının devam etmesi, kanserin önlenmesi ve tedavisi için gerçekçi ve umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir [4].

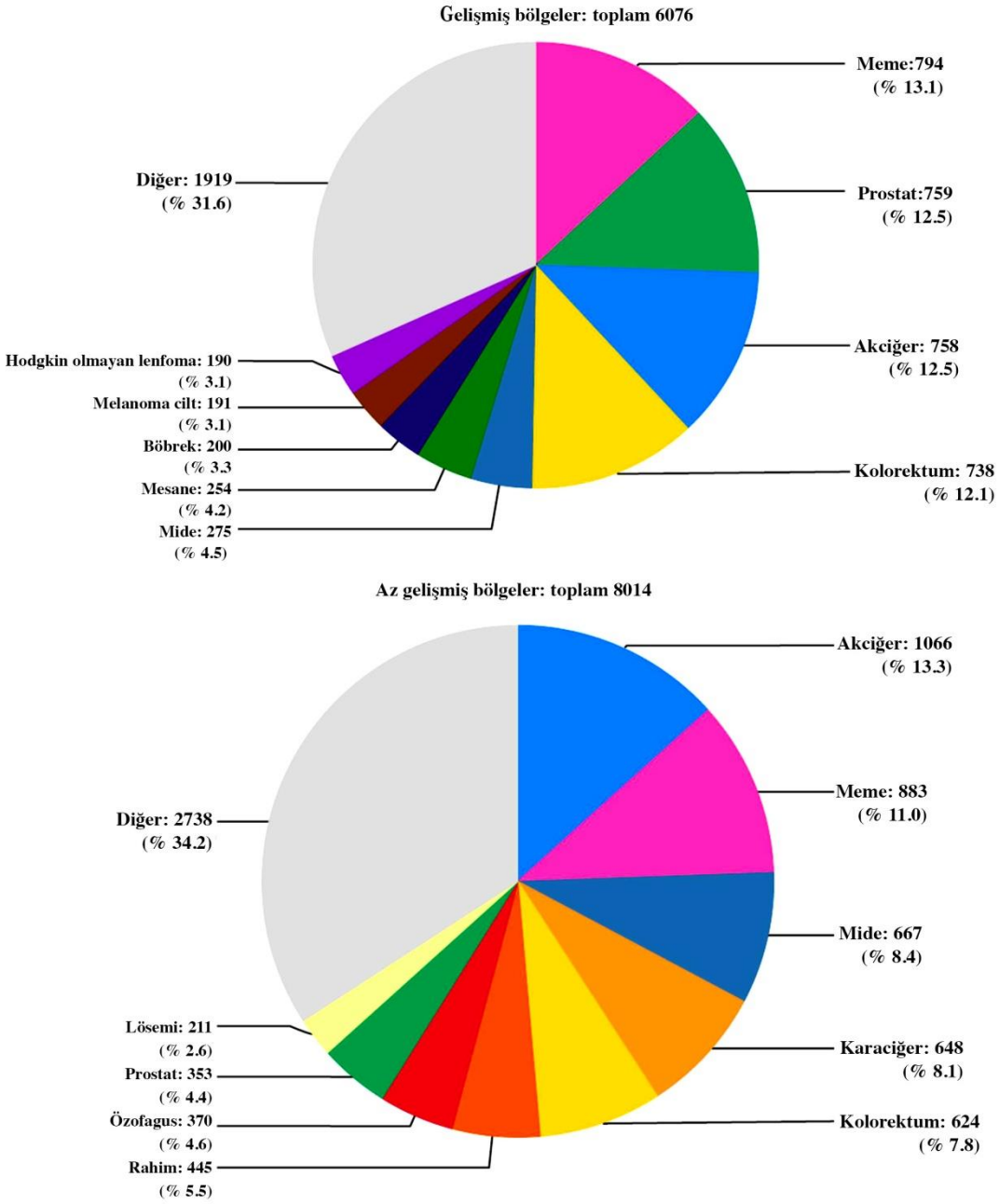
Bu tez çalışmasında, 3'ü Türkiye'ye endemik olan 7 metanolik bitki ekstresinin Vero [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı], HeLa (insan serviks kanseri epitel hücre hattı), A549 (insan akciğer kanseri epitel hücre hattı), Mcf-7 (insan meme kanseri epitel hücre hattı) ve PC-3 (insan prostat kanseri epitel hücre hattı) hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) Kolorimetrik Yöntemi ve xCELLigence RTCA DP sistemi ile belirlenip potansiyel antikanser aktiviteye sahip olan ekstrenin/ekstrelerin apoptotik aktivitesi/aktiviteleri biyokimyasal (Flow sitometri analizi), florometrik (Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonu analizi) ve moleküler (qRT-PCR analizi) olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilecek sonuçların yeni antikanser ilaçlarının geliştirilmesine ve kanser için daha etkili tedavi stratejilerinin bulunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser dünya çapında milyonlarca insanın ölümüne yol açan önemli hastalıklardan biridir. Dünya sağlık örgütü, 2005 ile 2015 yılları arasında 84 milyon insanın kanserden öldüğünü tahmin etmektedir [5]. Geleneksel kanser tedavisinin amacı, normal hücreleri mümkün olduğu kadar etkilemeden tümör hücrelerini öldürmektir. Bununla birlikte, kemoterapötik ilaçların çoğu sadece kanser hücrelerine değil aynı zamanda sağlıklı hücrelere de sitotoksiktir. Bu ajanların klinik kullanımı doz sınırlayıcı toksisiteleri ve ilaç direnci nedeniyle daralmaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında, daha az yan etkileri olan etkili maddelerin keşfi kemoterapide acil bir ihtiyaçtır. Doğal ürünlerin, özellikle de kanser tedavisindeki kullanımı, düşük toksisite profili ve uygulama kolaylığı nedeniyle ortaya çıkan bir eğilimdir [6].

Her yıl, Amerikan Kanser Derneği, içinde bulunulan yılda ABD'de meydana gelecek yeni kanser vakaları ve ölüm sayılarını tahmin etmekte ve kanser insidansı, ölüm oranı ve hayatta kalma ile ilgili en güncel verileri derlemektedir. 2016 yılı için, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.685.210 yeni kanser vakası ve 595.690 kanser ölümünün meydana geleceği tahmin edilmiştir [7]. 2011 yılı için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tahminlerine göre, kanser tüm koroner kalp hastalıklarından veya kalp krizlerinden daha fazla ölüme neden olmuştur. Şekil 2.1'de WHO tarafından belirlenen 2012 yılı için yeni kanser vakalarının küresel sayıları yer almaktadır. Devam eden küresel demografik ve epidemiyolojik geçişler sebebiyle, özellikle 2025 yılına kadar yılda 20 milyondan fazla yeni kanser vakası beklenmekte ve düşük ve orta gelirli ülkelerde önümüzdeki on yıllarda artan bir kanser frekansına işaret etmektedir[8].



Şekil 2.1: Gelişmiş ve daha az gelişmiş bölgeler için, her iki cinsiyetten, 2012 için oranlara sahip yeni vakaların tahmini küresel sayıları. Dairenin alanı, yeni vakaların sayısıyla orantılıdır [8].

Akciğer kanseri, dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin çoğunu oluşturan ölümcül bir yetişkin kanseri olup ortaya çıkma sıklığı yıldan yıla artmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tüm vakaların % 80'inden fazlasını temsil etmektedir. Akciğer kanseri tedavisi için terapötik stratejiler arasında ameliyat, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik ve kombine terapiler bulunmaktadır. Her ne kadar, çoğu çalışmada bazı bileşiklerin potansiyel

kemoterapötik etkileri ortaya konulmuş olsa da, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisi için kanıtlanmış etkinliğe ve minimal toksisiteye sahip yeni ajanlara halen acil ihtiyaç duyulmaktadır ve ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri mevcut tedavilere yanıt vermemektedir [9].

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık teşhis edilen ikinci kanser türü olup, 2012 yılında 1.1 milyon yeni vaka ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde prostat kanseri en sık görülen kanserdir ve erkekler arasında kansere bağlı ölümlerin en önde gelenidir. Küresel nüfusun büyümesi ve yaşlanması nedeniyle 2030'a kadar 1.7 milyon yeni prostat kanseri vakası ve 499.000 yeni ölüm olacağı tahmin edilmektedir. Alternatif ve uygun maliyetli tedavilerin araştırılması bu nedenle büyük önem taşımaktadır [10].

Meme kanseri, kadınlarda sağlık sorunlarının başında yer almaktadır. Orta yaşta (40-50 yaş) kadınların ölüm nedenlerinden biridir. Toplam kanser tanılarının yaklaşık % 23'ü ve kadınlarda ölümlerin % 14'ü meme kanseri ile ilgilidir. Bu nedenle, meme kanseri vaka oranı Asya'da 35 kişiden 1'i ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 8 kişiden biridir. Son zamanlarda, meme kanserinin tespiti, teşhisi ve tedavisinde önemli bir iyileşme olduğu görülmektedir. Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan stratejilerden biridir. Ne yazık ki, kemoterapötik materyallere karşı direncin gelişmesi, meme kanserinin tedavisinde karşılaşılan önemli bir engeldir. Öte yandan, mevcut tedaviler (ameliyat, kemoterapi ve/veya radyoterapi) iştah kaybı, saç dökülmesi, enfeksiyonlara karşı direncin azalması, halsizlik, kanama, erken menopoz gibi önemli yan etkilere sebep olmaktadır. Bu nedenle, meme kanserine karşı yeni ve etkili tedaviler keşfetmek günümüzde bir bilimsel zorluk olup bitkilerden doğal bileşikler bularak alternatif bir kanser tedavisi ortaya konulabileceği düşünülmektedir [11,12,13].

Serviks kanseri, meme kanserinden sonra kadınlara özgü kanserin ikinci en yaygın nedenidir. Bu durum, hem toplam kanser vakalarının yaklaşık % 8'ini hem de kadınlarda toplam kanser ölümlerini açıklamaktadır. Günümüzde cerrahi, radyoterapi ve sisplatin (CIS) bazlı kemoterapi, serviks kanserinin tedavisi için uygulanan başlıca yöntemlerdir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinin kemoterapiye karşı ilaç direnci geliştirmesi, klinik uygulama ve tedavilerin etkinliğini azaltmaktadır ve bu nedenle, ilaç direncini tersine çevirmek için hedefe yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir [14].

Kanser biyolojisinin anlaşılması, rasyonel olarak tasarlanmış bir terapi geliştirmek ve önleyici seçenekler sunmak için kritik öneme sahiptir. On yıllardır, kanser hücrelerinin normal hücrelerden nasıl farklı olduklarının açıklanması ile ilgili bilgi ortaya konulmak üzere araştırmalar yürütülmektedir. İnsan genomunun spesifikasyonu, çeşitli tipte tümör hücrelerinin, somatik mutasyonlar ve değiştirilmiş gen ekspresyonu (bu, sıklıkla DNA metilasyon paternlerindeki değişiklikler gibi epigenetik değişim yoluyla belirlenir) dahil olmak üzere, birçok parametrede normal hücrelerden nasıl farklı olduğunun tanımlanmasını sağlamıştır. Mutasyon veya epigenetik değişim, diğer etkilerin yanı sıra, değişime bağlı uyaranlara tepki olarak değişmiş metabolizma veya modifiye hücre içi sinyallemeye aracılık edebilmektedir [15].

2.2. HÜCRE SİKLUSU KONTROL NOKTALARI

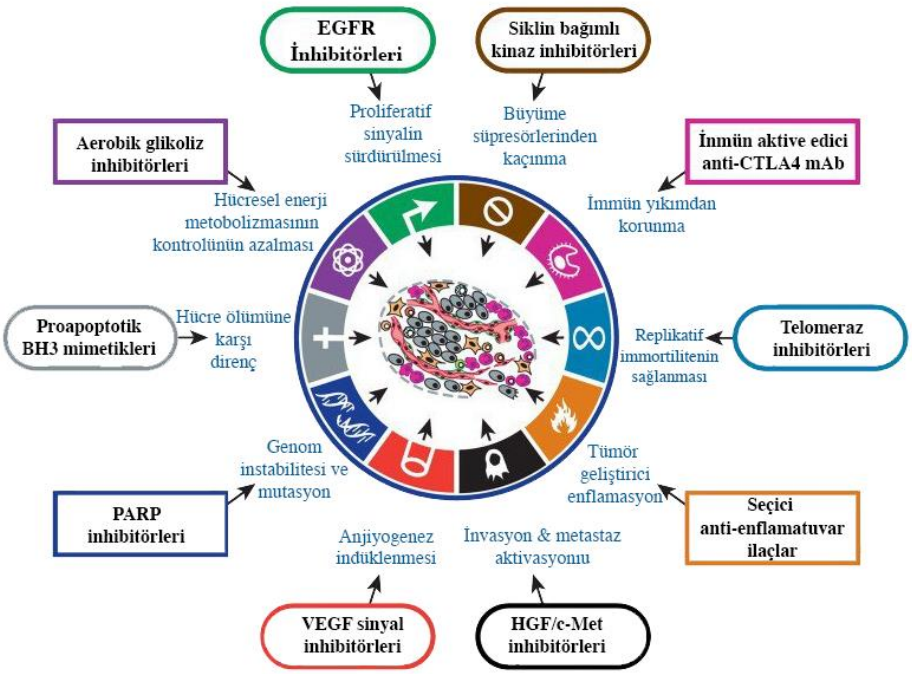
Normal gelişim ve hücre farklılaşması, genlerle düzenlenen ve yönetilen biyolojik bir süreçtir. Genetik değişim sonucu bu regülasyon bozulduğunda, son nokta malignant görünümün ortaya çıkmasıdır. Bu nedenle kanseri ve kansere neden olan mekanizmaları anlamak için öncelikle normal hücre döngüsü ve regülasyonunu gözden geçirmekte yarar vardır. Hücre siklusu regüle edilebilen bir evreden diğerine geçişler gösterir. Hücrenin fiziksel durumunu belirleyen substratları modifiye eden bir kinazın aktive veya inaktive edilmesi hücre siklusu evreleri arasında geçişi sağlar. Kontrol noktalarının hücre içi ve dışı şartlar yerine getirilene kadar geçişleri geciktirebilmektedir [16].

Çeşitli hücre sinyal yollarındaki değişiklikler, apoptozun düzenlenememesine ve kansere yol açabilmektedir. *P53* tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünü düzenleyen ve insan tümörlerinin oluşumunda en yaygın mutasyona uğramış gen olan bir transkripsiyon faktörüdür. *P53*'ün kritik rolü, tüm insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında mutasyona uğradığının ortaya konulması ile anlaşılabilmektedir. DNA hasar gördüğü zaman DNA tamir proteinlerini aktive edebilir, DNA hasarının tanınması üzerindeki G1/S regülasyon noktasında hücre döngüsünü tutabilir ve DNA hasarının onarılmaz olduğunu kanıtlarsa apoptozu başlatabilir. *P53* geni hasarlı ise, tümör baskılama ciddi şekilde azalır [17].

Hücre siklusundaki iki kontrol noktasından biri G1'de diğeri de G2'nin sonundadır. G1 esnasında alınan bir uyarı ile replikasyon döngüsüne girilir. İki mitotik bölünme arasındaki periyot somatik hücre döngüsü olarak tanımlanmaktadır. Bir mitozun bitip diğerinin

başlamasına kadar geçen evreye interfaz, görünür mitoza tekabül eden bölünme periyoduna da M fazı denilmektedir. G1, RNA ve protein sentezinin olup DNA replikasyonunun olmadığı fazdır. DNA replikasyonunun başlaması G1 fazının bitip S fazına girildiğini göstermektedir. S fazının sonunda DNA miktarı 4n'dir. G1 ve G2 fazları hücre döngüsünün DNA sentezinin olmadığı gap (boşluk) evrelerini oluşturmaktadır. RNA ve protein sentezi ise interfazın üç evresinde de (G1, S, G2) devam etmektedir. Hücre döngüsünde evreden evreye geçişin kontrol edildiği noktalar vardır. Kontrol noktalarından biri G1'de, diğeri de G2'nin sonundadır. MPF (Maturation Promoting Factor, Olgunlaşma Teşvik Faktörü) de denen M-faz kinaz, farklı fonksiyonları olan 2 alt üniteden oluşmuştur. Hedef proteinlerin serin ve treonin bakiyelerini fosforile eden katalitik alt ünite p34 ve kinazın uygun substratla aktivasyonu için gerekli olan regülatör alt ünite p45'tir. M-faz kinazın aktivasyonu p34 katalitik alt ünitenin modifikasyonunu gerektirir. M faz kinaz, H1 histonları fosforile ederek golgi ve endoplazmik retikulum fragmentasyonu ve mikrotübül instabilitesi için diğer protein kinazları uyararak aktivite göstermektedir. Çeşitli tipte varyasyonları olan bu regülatör kinazların ortak özellikleri bir katalitik alt ünite ile bir regülatör (siklin) alt ünite içermeleridir. Siklinlerle kompleks oluşturan katalitik alt ünitelere siklin bağlı kinazlar (cdks=cyclin dependent kinases, siklin bağımlı kinazlar) denilmektedir. Siklin D'lerin sentezi hücrenin büyüme faktörü tarafından uyarılması ile aktive edilmektedir. Siklin D'lerin cdk2, cdk4 ve cdk5 ile kompleks oluşturması ile hücre G_0'dan çıkıp siklusa girer ve G1/S restriksiyon noktasını aşar. Siklin D'lerin ekstraselüler sinyallare cevabı diğer siklinlere benzememektedir. Yarı ömrü kısa olup büyüme faktörünün yokluğunda seviyeleri çabucak düşmektedir. Siklin D tiplerinin (D1, D2, D3) hücre döngüsü inhibitörlerine hassasiyetlerinde farklılıklar vardır. Cdk2-siklinE kompleksi S fazına giriş için gereklidir. Cdk2-siklinA kompleksi G1/S fazı boyunca ve G2/M geçişinde gereklidir. DNA replikasyon inhibitörleri hücre siklusunu bloke edebilmektedir. Tümör baskılayıcılar, fonksiyon kaybı durumunda tümör oluşumuna sebep olduğu belirlenmiş genlerdir. *RB* (retinoblastoma duyarlılık geni) tümör süpressörünün ürünü cdk-siklinD kompleksinin substratıdır. G_0'daki bir hücrede *RB*, E2F transkripsiyon faktörüne bağlıdır. Bunun 2 etkisi vardır: birincisi, E2F'i bağladığı için S fazı başlayamaz, ikincisi; E2F-RB kompleksi, diğer hedef genlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Restriksiyon noktasında RB'nın cdk4,6-siklin D kinaz tarafından fosforilasyonu E2F'in serbest bırakılmasına neden olmaktadır. *Siklin D1*'in aşırı ekspresyonu, *RB*'nin inaktive olmasına ve E2F'nin serbest kalmasına yol açarak S fazını başlatmaktadır. P16 (ink 4), cdk4 ve cdk6'ya bağlanır fakat

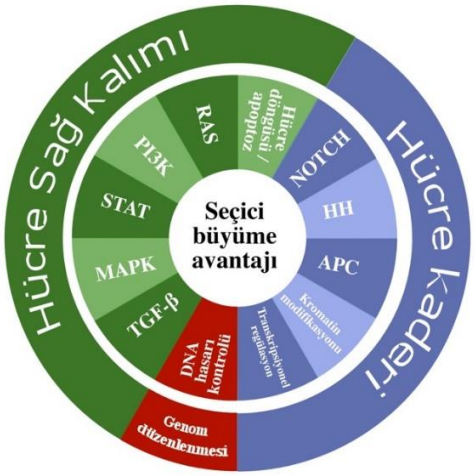
RB'nin yokluğunda tek başına hücre çoğalmasını önleyememektedir. P21 (cip1/WAF1), cdk 2,4,6'nın tüm komplekslerine bağlanabilen üniversal bir cdk inhibötürüdür. *P21*, Cdk-siklin dimerinin dışında DNA polimeraz S'nin alt ünitesi PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen; Çoğalan hücre nüklear antijeni)'yı da bağlayarak hücre çoğalmasını inhibe etmektedir. *P27* (Kip 1)'nin aşırı ekspresyonu S fazına girişi önlemektedir. *p21* ve *p27* cdk-siklin dimerlerinin CAK (Cyclin-dependent Activating Kinase; Siklin bağımlı aktive edici kinaz) tarafından fosforilasyonunu, katalitik alt ünitenin substratı olarak bloke etmektedirler. p16 ve TGF-ß (Tumor Growth Factor; Tümör Büyüme Faktörü) gibi diğer cdk-siklin kinaz inhibitörleri (cki), *RB* ve *siklin D1,2* tümör süpressörleri her evrede bulunmuştur ve kontrolsüz hücre büyümesinin baskılayıcılarıdır [16].



Şekil 2.2: Kanser işaretleri: kanser hücresi çoğalması ve ilerlemesi için gerekli olan faktörler [18].

Kanser gelişimi ve sürekliliği için gerekli olan sekiz belirleyici biyolojik faktör vardır: (1) sürekli çoğalma, (2) büyüme baskılayıcılarından kaçış, (3) ölüm direnci, (4) ölümsüzlük, (5) anjiyogenez, (6) invazyon ± metastaz , (7) enerji metabolizmasını yeniden programlama ve (8) bağışıklık sisteminden kaçış. Bu kabiliyetler hücre sağkalımı, hücre kaderi ve genom düzenlenmesini desteklemektedir. Bu çekirdek süreçler, 12 sinyalleme yolu ile sunulmaktadır.

Çekirdek süreçleri temel alan kansere özgü ilgili yolu bloke etmek, kanserin kalıcılığını ve ilerlemesini bozmaktadır.



Şekil 2.3: Hücre sağkalımı, Hücre kaderi ve Genom düzenlenmesini içeren kanserin 3 çekirdek fonksiyonundan sorumlu olan 12 sinyal yolu [18].

2.3. ÇEŞİTLİ SİNYAL İLETİM YOLLARI VE KANSER

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, çoğalmanın kontrolü ve farklılaşma gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanser gelişim sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellik kazanmaktadır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır [19].

2.3.1. Protein Kinazlar ve Sinyal İletimi

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu ve sonuçta aktivasyonunu veya inaktivasyonunu sağlamaktadırlar. Protein kinazlar, membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine (fosforilasyona uğrayan aminoasit türüne) göre tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılmaktadır. Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süper ailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF; epidermal büyüme faktörü, VEGF; vasküler endotelyal büyüme faktörü, PDGF; trombosit kaynaklı büyüme faktörü, FGF; fibroblast büyüme faktörü, NGF; sinir büyüme faktörü) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır. RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içermektedirler. İstirahat halindeki hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörlerine bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinler ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlamaktadır. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanmakta ve uyarının hücre içine iletimini sağlamaktadırlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homoloji-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinler arasında köprü görevi yapmaktadırlar. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşımakta ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulmaktadır. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur. Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, FAK (Fokal Adezyon Kinazı) ve JAK (Janus Ailesi Kinazları) proteinleri yer almaktadır. İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadırlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelmektedirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite (hareket gücü) ve invazyon artışı ile anjiyogenez (damarlanma) gibi malign fenotipe özgü hücresel olayları hızlandırmaktadır. Protein kinazlar dört mekanizma aracılığıyla onkojenik transformasyona yol açabilmektedirler:

1. Protoonkogenin retroviral transdüksiyonu,

2. Genomik yeniden düzenlemeler,

3. GOF(Gain of function; Fonksiyon kazandıran) mutasyonlar,

4. Protein kinazın aşırı sentezlenmesi [19].

2.3.2. MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu

MAP kinazlar, Mitojen aktive edici protein kinazlar süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında rol oynamaktadırlar. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılmaktadır:

1. p38 MAP kinaz ailesi,

2. ERK (Extracellular signal regulated kinase; Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz) ailesi,

3. JNK (c-Jun NH2- terminal kinaz) ailesi.

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışmaktadır. Kaskad sistemi hem sinyalin çoğaltılması hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşımaktadır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlamakta ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olmaktadır. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive ederek hücrenin biyolojik cevabının oluşmasını sağlamaktadır [19].

2.3.3. Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu ve Kanser

Hormonlar, büyüme faktörleri, farklılaşma faktörleri ve tümör oluşturucu maddeler bu sinyal yolunu kullanmaktadırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlamakta ve sırasıyla Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) ve Erk (MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerlemektedir. Ras ve Raf proteinleri protoonkogenlerdir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için

translasyon sonrası modifikasyondan (farnelizasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekmektedir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunmaktadır. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenmektedir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS ("Son of sevenless"; Guanin nükleotidini kodlayan gen seti) ve Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2; Büyüme faktörü reseptörü bağlı protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri, Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanmakta ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlamaktadırlar. Raf kinaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalar Faz I-II aşamalarında devam etmektedir. İnsan tümörlerinin % 30'unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur. Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşımaktadır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinositid-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarmalarında Ras'ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozu baskılamaktadır. İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken almaktadırlar. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozun baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturmaktadır. Ayrıca, onkojenik Ras uyarısı, transforme hücrelerde normal hücrelerden farklı genlerin ekspresyonunu da uyarabilmektedir [19].

2.3.4. PI-3 kinaz/Protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu ve Kanser

Fosfoinositid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inositol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinositol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. Protein kinaz B, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluşturmaktadırlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN (fosfataz ve tensin homolog) ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynamaktadır. Protein kinaz B uyarısı hücre içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan biri, mTOR (mammalian target of rapamycin; rapamisinin memeli hedefi)

proteinidir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. mTOR'un önemli fonksiyonları şunlardır:

1. S6 kinaz (S6K) aktivasyonu ile S6 ribozomal proteinini aktive ederek, 5'TOP mRNA'ların translasyonunu uyarmaktadır.

2. Ökaryotik başlatma faktörü 4E ile bağlanan proteini (4E-BP) inaktive ederek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlamaktadır. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin translasyonunu uyarmaktadır. 5'TOP mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının % 20'sini oluşturmakta ve translasyon işlevinde etkilidirler. 4E proteini de, bu mesajların translasyonunda etkilidir. Sentezlenen proteinlerin, büyüme faktörleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olması mTOR'un önemini ortaya koymaktadır. Rapamisinin, mTOR sentez artışı görülen tümörlerde antitümör etki gösterdiği bildirilmektedir [19].

Karsinogenezde etkili olan PI-3K sinyal yolu değişimleri şöyle sıralanmaktadır:

1. PI-3K'nın sentezi artabilmektedir.

2. PTEN tümör baskılayıcı proteini mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilmektedir.

3. PKB (Protein kinaz B) sentezi kanser hücrelerinde (meme, rahim, mide, pankreas ve prostat) artabilmektedir.

4. PTEN'in işlev kaybı veya PKB'nin aşırı sentezlenmesi sürekli mTOR aktivasyonuna yol açmaktadır.

5. 4E proteininin sentezi de artabilmektedir.

Bu noktalar göz önüne alındığında, karsinogenezde mTOR'un etkileri şu şekilde özetlenebilmektedir:

- PI-3K sinyal yolu aracılı karsinogenezde mTOR'un temel bir rolü vardır.
- Rapamisin, PKB aktivesine etki etmemektedir.
- S6K'nın aktivasyonu ve 4E-BP'nin inaktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilidir.

Protein kinaz B aktivasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkileri de karsinogenez sürecinde önem taşımaktadır. p21 proteini hücre döngüsünün erken G1 fazında siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) kompleksi üzerinde pozitif uyarıcı etki yapmaktadır. Protein kinaz B, p21'in stabil formunun oluşumunu tetiklemekte ve hücre döngüsünün ilerlemesine uyarıcı yönde etki etmektedir. Buna ek olarak, p21'in yıkımını uyaran proteini de inhibe etmektedir. Hücre döngüsünün inhibitör proteinlerinden p27'nin siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksine bağlanması için, sitoplazmadan hücre çekirdeğine yer değiştirmesi gerekmektedir. Onkojenik uyarı halinde (PTEN mutasyonu, HER2 veya EGFR aktivasyonu) bu protein fosforilasyona uğramaktadır. Bunun sonucunda, p27 sitoplazmaya geri dönmekte ve hücre döngüsündeki inhibitör etkisi ortadan kalkmaktadır. Protein kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücresel işlevlerden biri de apoptozdur. PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFκB uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir [19].

2.3.5. Nonreseptör Tirozin Kinazlar ile Sinyal İletim Yolu ve Kanser

Kanser gelişimi sürecinde Src tirozin kinazın anlatımı ve/veya aktivitesi artmaktadır. Hücrelerde inaktif halde bulunan endojen Src uyarılarla aktif hale geçince, hem kinaz aktivitesi hem de SH domainleri üzerindeki kısıtlayıcı etkenler ortadan kalkmaktadır. Aktive olan protein, periferik alandaki adezyon bölgelerine hareket eder. Src'nin katalitik aktivitesi ile tetiklenen sinyal iletimi mekanizması hücre büyümesi, adezyon ve migrasyon gibi fizyolojik işlevleri yürütmektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde Src aktivasyonunun kontrolünün ortadan kalkması tümör büyümesini hızlandırmakta ve hücrelerdeki invazyon potansiyelini uyarabilmektedir [19].

2.3.6. STAT Proteinleri ile Sinyal İletim Yolu ve Kanser

STAT (Signal transducer and activator of transcription; sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü) proteinleri 1990'lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlanmıştır. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde 7 farklı STAT proteini tanımlanmıştır. Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır. Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır. Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmakta (α alt birim) ve daha

sonra αα ya da αβ oligomerizasyonu gerçekleşmektedir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive etmektedir. Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile etmektedir. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlamaktadır. STAT proteinleri, daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelmekte ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. STAT proteinlerinin yapısında yer alan bölgelerin işlevleri şunlardır:

1. Oligomerizasyon bölgesi: Diğer proteinler ile etkileşmekte, STAT tetrameri oluşumunu sağlamaktadır.

2. DNA bağlanma bölgesi: DNA'ya özgün bağlanmadan sorumludur; ligand uyarısına özgül sinyal oluşumunu sağlamaktadır.

3. SH2 bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STAT-STAT etkileşimlerinden sorumlu bölgedir.

4. C-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğü ve kontrolünden sorumludur.

5. Tirozin aminoasiti: N-ucundan yaklaşık 700 aminoasit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu, bütün STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerini düzenlemektedir.

STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign dönüşümde rol oynamaktadır. STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogenezde etkili olmaktadır. Bunlardan biri STAT'ın sürekli aktivasyonudur. Diğeri ise proteinin C-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilmektedir. IL-6 ile devamlı STAT3 aktivasyonu uyarılan multip-l miyeloma hücrelerinde antiapoptotik proteinlerden Bcl-xL ve Mcl-1'in arttığı gösterilmiştir. STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; c-myc, siklin D1 ve Bcl-xL) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozu önleyerek karsinogenez sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Ayrıca, STAT aracılı sinyal iletiminin malign sürecin gelişiminde MAP kinaz yolunun aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir. Devamlı aktif STAT3 proteini ile hastalıksız sağkalım süresi arasındaki ters ilişki anlamlı bulunmuştur. STAT3 aktivitesi vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) düzeyinin artışına yol açarak, tümör

anjiyogenezisinde de rol oynamaktadır. Bcr-Abl kimerik proteini hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu indüklemektedir. Bu onkoprotein, JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla, Bcr-Abl ile ilişkili apoptoz direncinde STAT5 aktivitesinin rolü olduğu gösterilmiştir [19].

2.3.7. Adenovirüs Proteinlerinin Sinyal İletim Yollarında Etkileri ve Kanser

Adenovirüslerin replikasyon döngüleri sırasında, adenoviral erken genler E1A viral proteinlerini sentezlemektedirler. Bu proteinler, infekte hücrenin G1 fazından S fazına geçişini indüklemektedirler. S fazında viral genom da replike olmaktadır. Diğer taraftan, infekte hücreler viral infeksiyona cevap olarak *p53* genini aktive etmektedirler. Böylece hücrede G1 fazında duraklama ve/veya apoptoz uyarılmakta ve viral çoğalma engellenmektedir. Adenovirüsler ise sentezledikleri E1B proteinleri ile p53 tarafından yönlendirilen etkilerden kendilerini korumakta ve çoğalmaya devam etmektedirler. p53 blokajı yapamayan adenovirüsler ise normal hücrelerde replike olamamaktadırlar. Adenoviral tedavi de bu özellikten yola çıkarak tümör hücrelerini öldürmeyi hedeflemektedir; bunun için, E1B sentezi yapamayan mutant adenovirüsler geliştirilmiştir (ONYX-015). Tümör hücrelerinde *p53* mutasyonu sıklığı % 50'den fazladır. Dolayısıyla, bu mutant virüsler seçici olarak *p53* mutasyonu olan tümör hücrelerinde çoğalarak tümör lizisine yol açmaktadırlar [19].

2.4. HÜCRE ÖLÜM ÇEŞİTLERİ

Hücre ölümü, çok büyük hasarların bir sonucu olarak ortaya çıkmasına rağmen, hayvanlardaki hücre ölümlerinin çoğu, özel sinyal olaylarının bir sonucu olarak, aktif bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Literatürlerde tanımlanmış 12 farklı tipte hücre ölümü vardır ve bunlar sadece beş ana tipte toplanabilmektedir: apoptoz, nekroz, otofaji, paraptoz ve otoşizis (Şekil 2.4). Diğer ölüm şekilleri ise bu başlıklardan biri altında sınıflandırılmaktadır. Anoikis ve onkozis, sırasıyla apoptoz (hücre tutunmasının kaybı ile tetiklenir) ve nekroz formlarıdır. Farklı ölüm programları arasındaki iç içe giren ve paylaşılan sinyal yolları nedeniyle, bu hücre ölüm programlarının her biri için özel tanımlar sağlamak zordur. Bununla birlikte, bir tür hücre ölümünün inhibisyonunun bir diğerine yol açabileceğine dair kanıtlar vardır. "Programlanmış hücre ölümü" terimi, özellikle apoptozu tanımlamak için kullanılmış olsa da diğer hücre ölümü şekilleri de bu kategoriye girebilmektedir [20].

2.4.1. Nekroz

Nekroz, hücre şişmesi ve plazma membranın parçalanması, kromatin yoğunlaşması olmadan organellerin yapısının kaybı ile karakterizedir. Nekrozun onarılmaz hücre hasarının bir sonucu olarak ortaya çıkmasına rağmen, en az bir aktif nekroz yolu vardır. Bazen nekroptoz olarak adlandırılan bu hücre ölüm formu, hepsi reseptör etkileşimli protein kinaz 3'ün (RIP3) aktivasyonu ile sonuçlanan birçok sinyal yolu ile bağlanmaktadır. RIP3, ölüm reseptörleri (DR'ler), Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) ve T-hücresi reseptörü (TCR) gibi çeşitli hücre yüzeyi reseptörlerinden aşağı doğru olan makromoleküler komplekslere alınmasının ardından aktive edilmektedir. Ek olarak, DNA hasarı, hücre yüzeyi reseptörü ligasyonundan bağımsız olarak bir RIP3-aktivasyon platformunun oluşumunu doğrudan indükleyebilmektedir. Son olarak, RIP3'e bağlı nekroz, aynı zamanda interferonun (DAI) düzenleyici faktörlerinin DNA'ya bağımlı aktivatörü olan sitosolik DNA sensörü tarafından da tetiklenmektedir [20,21]. Bazı hücre ölüm formları, hem nekroz hem de apoptozun morfolojik özelliklerinin bir karışımına sahip olabilmekte ve "aponekroz" olarak adlandırılmaktadır [22].

2.4.2. Otofaji

Makrootofaji veya tip II programlı hücre ölümü olarak adlandırılan otofaji, sitoplazma ve organellerin otofajik vakuoller olarak adlandırılan çift veya multimembran yapılar tarafından ayrılması ve ardından bu vakuollerin içeriğinin hücrenin kendi lizozomlarına kaynaşması sonucu parçalanması ile karakterize edilmektedir (Şekil 2.4) [22]. Otofaji esas olarak metabolik bir krize (örn., düşük ATP seviyeleri ve besin veya amino asit yoksunluğuna) yanıt vermek veya hasarlı organelleri (örn., düşük membran potansiyeli olan mitokondri) ve protein agregatlarını uzaklaştırmak için kullanılan bir sağkalım sürecidir. Bir stres cevabı olarak, otofaji, çoğu senaryoda hücre ölümünü teşvik etmek yerine eşlik etmektedir. Yine de, otofajinin kesinlikle hücre ölümü için gerekli olduğu özel örnekler vardır. *Drosophila* metamorfozunda, orta gutand tükürük bezleri gibi eski larval dokular, steroid hormonu ekdisonu tarafından tetiklenen büyük otofajik hücre ölümü ile gerilemektedir. Bu özel durumda, otofajik sinyalleme yolunun genlerindeki bir eksiklik hücre ölüm programını değiştirmektedir. Düzensiz H-Ras aktivitesine yanıt olarak otofajik hücre ölümü de bildirilmiştir ve bu nedenle onkojenik transformasyona karşı bir koruma mekanizmasını temsil edebilmektedir [21]. Hücre ölümünde otofajinin kesin rolü açık olmamakla birlikte, uzun zamandır açlık halindeki hücrelerin, proteinler, lipidler, polisakkaritler ve nükleik asitler

gibi temel moleküllerin ayrılma ve bozulma yoluyla enerji üreten bir hücre hayatta kalma mekanizması olarak kabul edilmiştir. Bu bakımdan, otofajinin kanser hücrelerinin besin sınırlayıcı ve düşük oksijen koşullarında ve iyonize radyasyona karşı hayatta kalmasına yardımcı olabileceği savunulmaktadır. Bununla birlikte, otofaji geni olan *Beclin 1* (*Atg6*) 'in, meme ve yumurtalık kanserlerindeki heterolog bozulmasında otofajinin azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla otofajik makinelerin parçalanmasının kanserin gelişimine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, *Atg6* heterozigot fareler, spontan olarak tümör geliştirir, bu da *Atg6*'nın tümör baskılayıcı aktivitesini gösterir. Benzer şekilde, başka bir otofaji geninde eksik olan fareler, bir sistein proteazı olan Atg4C, kimyasal karsinojeneze karşı hassastır. Diğer çalışmalar otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkiye ışık tutmaktadır. Örneğin, *Atg7* ve *beclin 1*'in indirgenmesi, insan U937 hücresinde zVAD tarafından indüklenen ölümü ve Atg5 ve beclin 1 korumalı Bax/Bak çift nakavt hücrelerinin staurosporin veya etoposid kaynaklı nonapoptotik ölümünün indüksiyonunu inhibe etmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmalar apoptotik yolakları tehlikeye atılmış hücrelerde yapılmıştır. Bu nedenle, sağlam apoptotik işleyişe sahip hücrelerin otofaji ile öldürülüp öldürülmeyeceği ve otofaji genleri bulunmayan apoptoz mekanizması çalışmayan hücrelerin diğer ölüm uyaranlarına karşı dirençli olup olmayacağı incelenmelidir. *İn vivo* ortamda, otofaji ve apoptoz arasındaki karmaşık ilişki açıklığa kavuşturulmalıdır. Apoptoza benzer şekilde, hücreler, ubikitin benzeri genlerin ekspresyonunda bir artışla *de novo* gen ekspresyonunu gerektirmektedir. Ubikitin benzeri protein konjugasyon sistemi, lizozomların ve vakuollerin membrana yanaştırılmasını ve füzyonunu yönlendiren protein komplekslerinin oluşumu, otofajinin ana bileşenleridir. Bu işlem çeşitli kinazlar, fosfatazlar ve guanozin trifosfatazlar (GTPaz'lar) tarafından düzenlenmektedir [20,22].

2.4.3. Paraptoz

Paraptoz, mitokondri ve endoplazmik retikulumun şişmesi ile ilişkili geniş sitoplazmik vakuolleşme ile karakterize edilen bir hücre ölümü formu olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.4). Hücre ölümünün bu formu kaspaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmemiştir; ancak yeni protein sentezi için bir gereklilik olduğunu düşündüren translasyon ve transkripsiyon inhibitörleri, sikloheksimid ve aktinomisin D ile inhibe edilmiştir. Paraptozun, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesi TAJ/TROY ve insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF1) reseptörü tarafından tetiklendiği gösterilmiştir. TAJ/TROY ile indüklenen paraptotik hücre

ölümü, programlanmış hücre ölümü 5'in (PDCD5) aşırı ifadesiyle arttırılmıştır. Bu hücre ölüm formunun, mitojen aktifleştirilmiş protein (MAP) kinazlar tarafından aracılık ettiği ve kalsiyum bağlanma ölümüyle ilişkili protein ALG-2 ile etkileşime giren AIP1/ALIX ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Na^+/H^+ değiştirici inhibisyonu da paraptoza benzeyen hücre ölümüne yol açmıştır. Glukokortikoidlerin, paraptoz ile ilişkili mekanizmalarla retina toksisitesini indüklediği gösterilmiştir. Bu hücre ölümünün, çeşitli reaktifler tarafından uyarıldığı gösterilmiş olmakla birlikte, tam moleküler mekanizma açık olmaktan uzaktır. Paraptozda görüldüğü gibi sitoplazmik vakuolleşmenin, kendiliğinden veya çeşitli uyarıcıların neden olduğu geniş bir hücre hatları aralığında meydana geldiği gösterilmiştir. Bir hücrenin vakuolleşmesi, hücre tipine bağlı olmaktadır. Vakuolleşme işlemi, belirli bir modeli takip etmekte, vakuol sayısı ve boyutu kademeli olarak artmaktadır. Hücreler belirli bir eşiğe kadar olan vakuolleşmeden sonra geri kazanabilmektedirler. Sitoplazmik vakuolleşme geçiren bir hücrenin ölüme gitmesi gerektiğine karar veren belirli bir temel programın varlığı şu anda bilinmemektedir. Bununla birlikte, kesin olarak vakuolleşmiş bir hücrenin hücre ölümüne maruz kaldığı, bazı temel programların varlığını gösteren örnekler vardır. Kurt sineği larvalarının (*Calliphora vomitoria*) metamorfozunda tükürük bezi gelişimi sırasında, hücreler belirli bir düzende yoğun bir vakuolleşme işlemiyle ortadan kaldırılmaktadırlar. Ayrıca, bir cıvık mantar türü olan *Dictyostelium discoideum*'da, saplı hücreler, programlanmış hücre ölümüne doğru ilerlerken, geniş sitoplazmik vakuolleşmeye maruz kalmaktadırlar. Ek olarak, lobüler ve duktal meme karsinomunun aspiratlarında sitoplazmik vakuolleşme de gözlenmiştir. En çok çalışılan sitoplazmik vakuol oluşumu ile indüklenen hücre ölümü otofaji olup bu çalışmalar ayrıca sitoplazmik vakuolleşme ile indüklenen hücre ölümünün fizyolojik bir role sahip olduğunu ve daha fazla araştırmayı gerektirdiğini vurgulamaktadır [22,23].

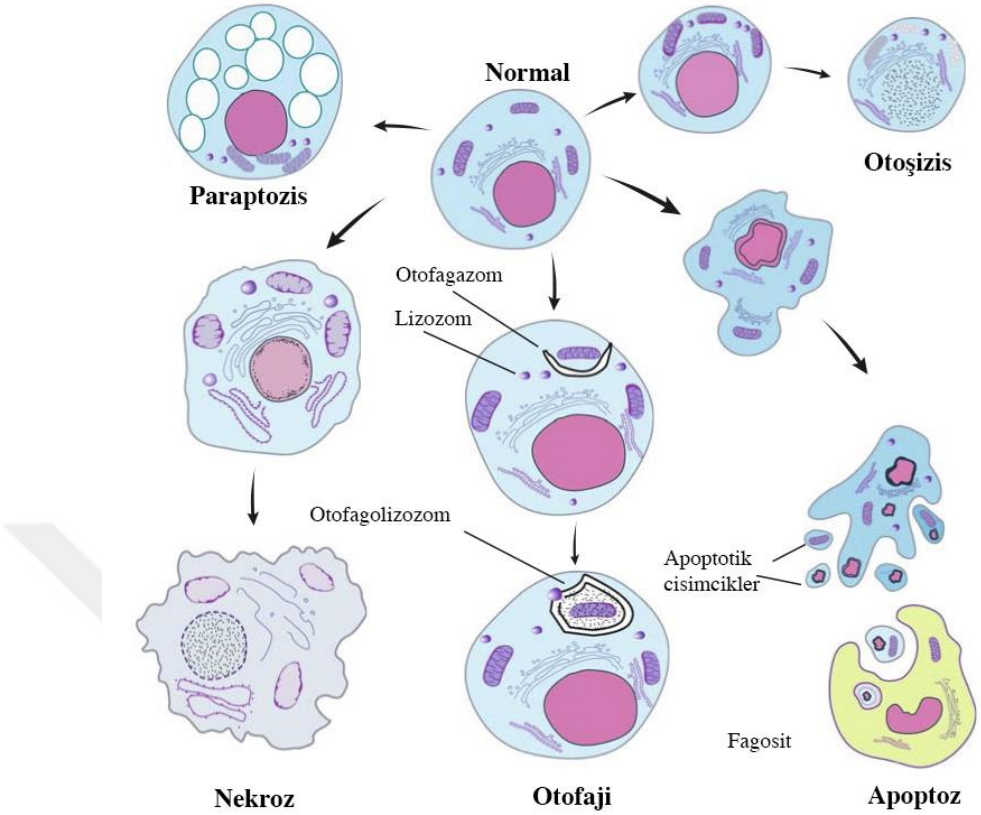
2.4.4. Otoşizis (Otoparçalanma)

Oksidatif stres tarafından tetiklenen yeni bir hücre ölümü formu olan otoşizis, apoptoz ve nekrozdan farklı olup sitoplazmanın kromatin ile nükleus etrafındaki dar bir çerçeveye indirgenmesi ile karakterizedir. Mitokondri ve diğer organeller, hücre iskeleti hasarının ve sitoplazmanın kaybının bir sonucu olarak çekirdeğin etrafında toplanmaktadırlar. İlginç bir şekilde, granüllü endoplazmik retikulum, hücre fragmanının ve nükleolusun yoğunlaştığı ve daha küçük parçalara ayrıldığı otoşizisin geç aşamalarına kadar korunmaktadır. Son aşamada, nüklear zarf hücre ölümünden sonra kalan organelleri ile dağılmaktadır. Bu ölüm türünde,

hücreler kendi kendine parçalanma ya da kendini kesme yoluyla sitoplazmayı kaybetmektedirler (Şekil 2.4). Otoşizis, genellikle *in vitro* ve *in vivo* olarak bitişik hücre gruplarını etkilemektedir; fakat aynı zamanda bazen lenf düğümlerinin alt kapsüler sinüslerinde tutulan dağınık bireysel hücreleri etkileyebildiği de ortaya konulmuştur [22].

2.4.5. Apoptoz

Apoptoz terimi, Kerr ve ark.'nın 1972'de yayımlanan makalesinden bu yana programlanmış hücre ölümü (PCD) için eş anlamlı olarak uzun süredir kullanılmaktadır. Apoptoz veya tip 1 hücre ölümü, çok hücreli organizmaların hücreleri için önemli bir terminal yoludur ve enfekte olmuş hücreleri çıkarmak için koruyucu bir strateji olarak, çoğalma/homeostaz, farklılaşma, gelişme ve zararlı hücrelerin eliminasyonu gibi biyolojik olayların çeşitliliğine neden olmaktadır. Apoptoz, insidansı, morfolojisi ve biyokimyasal kriterlere göre diğer hücre ölümlerinden temel olarak farklıdır. Apoptotik hücrelerin özel morfolojik değişiklikleri nüklear kondensasyon ve parçalanma, hücre büzülmesi, dinamik membran kabarcıklanma ve hücre dışı bölgeler veya komşulara tutunma kaybını içermektedir. Apoptotik hücrelerin biyokimyasal değişiklikleri ise nükleozomal fragmanların oluşumu, fosfatidilserinin hücre zarının dış yüzeyine translokasyonu ve kaspaz olarak kabul edilen bir proteaz ailesinin aktivasyonu olarak sıralanabilmektedir. Küçük bir PCD disfonksiyonu, insanlarda kanserler gibi çeşitli patolojik bozukluklarla sonuçlanabilmektedir. Apoptoz, farklı yürütücü ve düzenleyici moleküller tarafından gerçekleştirilen önemli bir hücresel olgudur. Apoptozda meydana gelen fonksiyon kaybı tümörlerin gelişimine veya antikanser ilaç direncinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu nedenle apoptoz, özellikle kanser gibi hastalıklarda ilaç keşfi ve gelişimi için en önemli moleküler hedeflerden biri haline gelmiştir [20,21,24].



Şekil 2.4: 5 ana hücre ölüm tipinin morfolojik özellikleri.

Apoptoz: Tip I programlanmış hücre ölümü olan apoptozda hücreler küçülmekte ve yoğun sitoplazma içeren kabarcıklar geliştirmektedirler. Membran bütünlüğü hücre ölümüne kadar kaybolmamaktadır. Nüklear kromatin belirgin olarak yoğunlaşma ve parçalanma geçirmektedir. Sitoplazma, organelleri ve/veya nüklear enkaz içeren apoptotik birimleri oluşturmak için bölünmektedir. Son olarak, apoptotik hücreler ve fragmanlar fagositler veya çevre hücreler tarafından yutulmaktadır. **Otofaji:** Hücreler, otofajik veziküllerin (otofagozomlar ve otofagolizozomlar) birikimi ile karakterize edilen, tip II programlı hücre ölümüne göre ölürler. Apoptozu otofajik hücre ölümünden ayıran bir özellik, ölmekte olan hücre yıkımının çoğunda kullanılan lizozomal enzimlerin kaynağıdır. Apoptotik hücreler, bu işlem için fagositik hücre lizozomlarını kullanmakta olup, buna karşın otofajik morfolojiye sahip hücreler, ölmekte olan hücrelerin endojen lizozomal mekanizmasını kullanmaktadırlar. **Nekroz:** Nekrotik (tip III programlanmış hücre ölümü) ölümde hücrelerin organelleri karakteristik olarak şişmektedir. Plazma membran bütünlüğünün kaybı ve hücre dışı boşluk içine sitosol sızıntısı ile erken membran hasarı vardır. Erken kümelenmeye rağmen, nüklear kromatin lizise (karyoliz) uğrar. **Paraptozis:** Hücreler, geniş sitoplazmik vakuoleşme ve

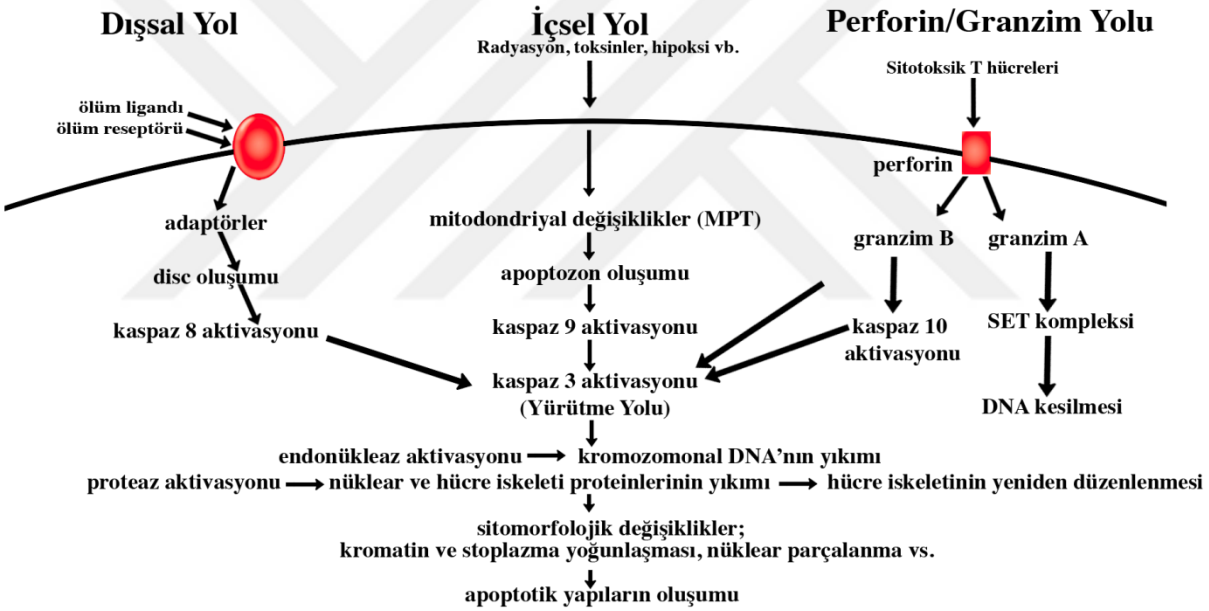
mitokondrilerin şişmesi ve kümelenmesi ile birlikte nüklear parçalanma, zar kabarcıklaşması veya apoptotik vücut oluşumu olmadan karakterize edilen, tip III programlanmış hücre ölümüyle ölür. **Otoşizis:** Bu hücre ölümü biçiminde hücre zarı, sitoplazmanın dışarı sızmasına izin veren kesikler veya parçalanmalar oluşturmaktadır. Hücre orijinal boyutunun yaklaşık üçte birine küçülmekte olup çekirdek ve organeller küçük bir sitoplazma şeridi tarafından çevrelenmektedir. Sonrasında karyolizis gerçekleşmektedir [22].

2.4.5.1. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz en önemli hücre ölüm formu olarak kabul edilmekte ve moleküler sinyal yolu iyi bilinmektedir. Apoptotik mekanizmaların tanımlanması kritiktir ve disfonksiyonel apoptozun bir sonucu olarak hastalıkların patogenezinin anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu durum, spesifik apoptotik yolakları veya genleri hedef alan yeni ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilmektedir. Memelilerde, iki merkezi apoptotik yol bulunmaktadır: Dışsal yol (Ekstrinsik; Ölüm reseptörü aracılı yol) ve içsel yol (İntrinsik; Mitokondriyel aracılı yol) (Şekil 2.5) Ayrıca, bu iki yolun yanı sıra, endoplazmik retikulum (ER) stresi ile aktive edilen apoptozda kaspaz-12 veya kaspaz-2'nin başlatıcı rolü de dahil olmak üzere daha az bilinen kaspaz aktivasyonunun ek yolları vardır. Üçüncü bir yol olan Perforin/granzim yolu (Şekil 2.6), T hücresi aracılı sitotoksisiteyi içeren başka bir yoldur. Bu yol, ya granzim A ya da granzim B ile apoptozu indükleyebilmektedir. Tüm bu apoptotik yollar (Dışsal, İçsel ve Perforin/granzim yolaklar) aynı terminal veya uygulama yolu üzerinde birleşmektedirler. Hem içsel hem de dışsal yollardaki kilit düzenleyici proteinler, kaspazlar olarak bilinmektedir [24].

Kaspaz, hücrenin apoptozunu uyaran moleküler mekanizmada önemli bir rol oynamaktadır. Kaspazlar, çok sayıda apoptoz yollarının buluşma noktasıdırlar. Kaspazların çoğu üyesi, apoptoz sürecinde önemli bir rol oynayan promotör veya efektördür. Kaskad tepkisinin yukarı ve aşağı kısmında kaspazların farklı pozisyon ve işlevine göre, kaspazlar üç kategoriye ayrılmaktadır. Birincisi; kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 dahil olmak üzere, kaskad tepkisinin yukarısında yer alan kaspazlar apoptozun promotörüdürler. Kendilerini aktive edebilen ve diğerlerinin katılımı ile aşağı akış kaspazlarını da aktive edebilen proteinlerdir. İkincisi; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 de dahil olmak üzere kaskad reaksiyonun aşağı akışında yer alan apoptozun efektör kaspazlarıdır. Aktivasyondan sonra bu kaspazlar, hücrenin biyokimyasal reaksiyonu ve morfolojik değişiklikleri gerçekleştirmesi için substrat spesifitesi için kullanılmaktadırlar. Daha sonra hücrenin apoptozu başlatılmaktadır.

Sonuncusu esas olarak hücre faktörünün aracılık ettiği enflamatuvar reaksiyonuna katılan kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-13 ve kaspaz-14'ü içermektedir. Aynı zamanda ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği hücrenin apoptozu yolunda destekleyici rol oynamaktadırlar. Ancak apoptozun kilit proteazı olarak kabul edilen kaspaz-3, bu yoldaki temel rolü oynamaktadır. Bir kez aktive edildikten sonra, aşağı akımın kademeli reaksiyonu, apoptozun kaçınılmaz hale getirilmesi için hemen gerçekleşmektedir. Kaspaz-3 "ölüm proteazı" olarak bilinmektedir. Normal durumda, sitoplazmada kaspaz-3, inaktif enzim formunda bulunmaktadır. Hücrede apoptoz sinyalinin ortaya çıkması, bölünmeye ve daha sonra çoklu proteolitik enzimlerin fonksiyonu kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olabilmektedir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu sonrasında hücre parçalara ayırılmaktadır [24,25].



Şekil 2.5: Apoptotik olayların şematik gösterimi.

Apoptozun dışsal, içsel ve perforin/granzim yollarının her birinde, moleküler olayların enerjiye bağımlı bir kaskadını başlatmak için spesifik tetikleme sinyalleri gerektirmektedir. Her yol, kendi başlatıcı kaspazını (kaspaz 8,9,10) aktive etmekte ve başlatıcı kaspaz da yürütücü kaspaz 3'ü aktive etmektedir. Bununla birlikte, granzim A kaspazdan bağımsız olarak çalışmaktadır. Yürütme yolu, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, sitoplazmik kabarcıklar, apoptotik yapıların (cisimlerin) oluşumu gibi karakteristik sitomorfolojik özellikler ve son olarak bitişik parankimal hücreler, neoplastik hücreler veya makrofajlar tarafından apoptotik yapıların fagositozu ile sonuçlanmaktadır [17].

Dışsal (Ekstrinsik; Ölüm ReseptörüAracılı) Yol: Ekstrinsik yoldan apoptotik sinyal verme, hücre dışı ligandların, örneğin tümör nekroz faktörü (TNF), Fas ligandı (Fas-L) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligandın (TRAIL) transmembran reseptörlerinin [ölüm reseptörleri, yani tip 1 TNF reseptörü (TNFR1), Fas (CD95/Apo-1 olarak da adlandırılmaktadır) ve TRAIL reseptörlerinin] hücre dışı alanına eklenmesiyle başlamaktadır. Ligandın reseptöre bağlanması üzerine, ölüm reseptörleri, Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve TNF reseptörüyle ilişkili ölüm domeni (TRADD) gibi adaptör proteinlerde karşılık gelen bir protein motifi ile hücre içi ölüm domenine bağlanmaktadır. Bu adaptör proteinleri ayrıca Ölüm Efektör Alanı (DED) olarak adlandırılan başka bir protein etkileşim alanına sahiptir. Prokaspaz-8 ayrıca FADD'nin DED'i ile etkileşime giren DED içermektedir. Bu sırada, prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonuna yol açan bir ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi (DISC) gelişmektedir[24]. DISC, kaspaz-8 monomerlerini, proteaz aktivitelerini tetikleyerek, birbirlerine yaklaştırmaktadır. Kaspaz-8 daha sonra hem büyük hem de küçük alt birimler arasında ve büyük alt birim ve prodomain arasında otomatik katalitik kesilme geçirir. İlk kesilme aktif dimeri stabilize eder (ve bu yoldaki homodimer aktivitesi için gereklidir); ikinci kesilme onu DISC'den serbest bırakılmasını sağlamaktadır. Bazı hücrelerde aktif kaspaz-8, kaspaz-3 ve kaspaz-7 kesilerek aktive olup apoptoz teşvik edilmektedir. Bununla birlikte, birçok hücre tipinde aktif yürütücü kaspazları, XIAP (X ilişkili apoptoz inhibitör proteini) tarafından inhibe edilmektedir ve bu nedenle apoptoz engellenmektedir. Böyle bir durumda, BH3 proteini gibi başka bir kaspaz-8 substratı devreye girmektedir. Kaspaz-8 aracılı kesilme, Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonunu (MOMP) teşvik etmek için Bax ve Bak'ı aktive etmektedir. IAP (apoptoz inhibe edici protein) antagonistleri Smac (ikinci mitokondri türevli kaspazların aktivatörü) ve Omi (mitokondride bulunan serin proteaz) daha sonra serbest bırakılmakta ve bu proteinler apoptozun devam etmesini sağlamak için XIAP'ı nötralize etmektedirler. TNFR1'den aşağı akışta bulunan sinyal yolları daha karmaşık ve potansiyel olarak üç farklı sonuca varmaktadır: hayatta kalma, apoptoz veya nekroz. TNFR1 ligasyonu üzerine, TNFR ile ilişkili bir ölüm alanı proteini (TRADD) olan farklı bir DD-içeren adaptör ilk kez yapıya alınır. TRADD, kaspaz-8'i doğrudan bağlamaz ya da aktive etmez, bunun yerine bir kinaz, reseptör etkileşimli protein1 (RIP1) ve TRAF2 ve cIAP1/2'yi içeren ubikitin ligazları ilave sinyal moleküllerini yapıya almak için bir membran yapı iskelesi görevi görmektedir. RIP1 de dahil olmak üzere bu kompleks, hem cIAP'lar hem de lineer ubikitin birleştirme kompleksi (LUBAC) tarafından gerçekleştirilen kompleks olmayan

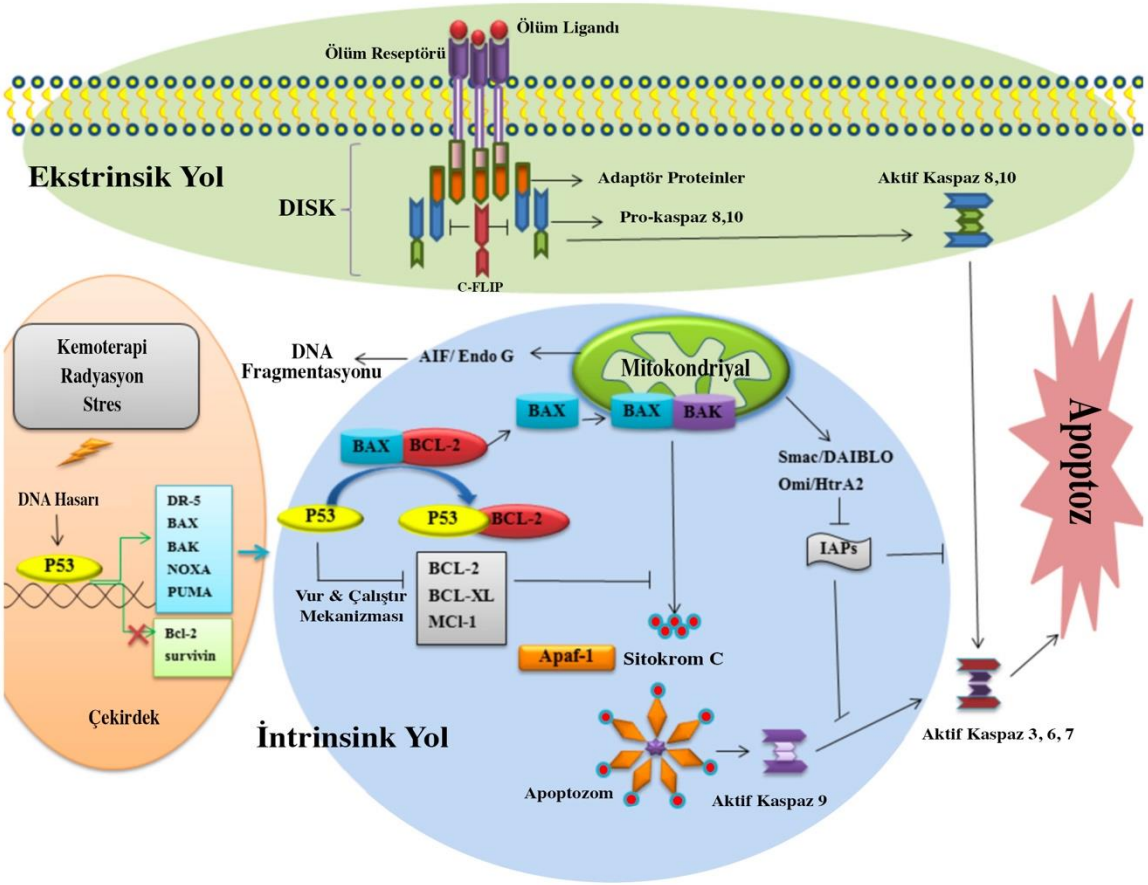
ubikitinleme olayları dizisi ile modifiye edilmektedir. Bu sinyalleme platformunun (kompleks I olarak anılacaktır) düzeneği ve ubikitinilasyonu, NF-κB sinyalleşme yolunun aktivasyonunda ve hücre ölümünden ziyade bir enflamasyon yanıtı ile sonuçlanmaktadır. TNFR1 ligasyonu, RIP1'in ubikitinlenmesi, kompleks I'de bulunan ubikitin ligazlarının (örn., CIAP1/2) inhibisyonu veya CYLD (Silindromatozis tümör baskılayıcı proteini, NF-κB negatif regülatörü) ve muhtemelen diğer sinyal olayları gibi enzimler tarafından RIP1'in doğrudan etkisizleştirilmesi yoluyla tehlikeye girdiğinde hücre ölümüne yol açmaktadır. Daha sonra RIP1 ve TRADD, hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümüne neden olma potansiyeline sahip bir dizi dinamik sitosolik sinyalleşme platformu (topluca kompleks II olarak anılır) oluşturmak üzere TNFR1'den salınmaktadırlar. Sitosolik TRADD, FADD'yi (DD-DD etkileşimi yoluyla) alır ve bu da kaspaz-8'e benzer şekilde DISC'ye bağlanabilmekte ve aktive olabilmektedir. Bu bağlamda, kompleks II oluşumu apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır. Bununla birlikte, birçok durumda, apoptoz, en azından kısmen, NFκB'nin aktivasyonu, kaspaz-8 benzeri protein olan FLICE-benzeri inhibe edici proteinin (FLIP) anlatımını indüklediği için, TNFR1 ligasyonu üzerinde ilerlememektedir. FLIP, kaspaz-8'inkine benzer bir alan yapısına sahiptir; fakat katalitik bir sistein içermemektedir. Tercihen FADD'ye (DED-DED etkileşimleri yoluyla) ve kaspaz-8'in bir monomerine bağlanmaktadır. Kaspaz-8-FLIP heterodimeri katalitik olarak aktiftir, ancak apoptozu teşvik etmemektedir. Sonuç olarak, kompleks NFκB sinyallemesi koşulları ve dolayısıyla FLIP ifadesi altında kompleks II'nin toplanması bir hayatta kalma sonucuna yol açmaktadır. Son olarak, kompleks II oluşumu nekrotik hücre ölümüne neden olabilmektedir. Kaspaz-8-FLIP heterodimerinin aktivitesi, aynı zamanda, bağlanmış TNFR1 ile bağlanan bu nekrotik hücre ölüm sinyalinin önlenmesi için de önemli olduğu düşünülmektedir [21].

İçsel (İntrinsik; Mitokondriyal aracılı) Yol: Apoptozun, intrinsik yol olarak da adlandırılan mitokondriyal yolu, omurgalılarda apoptozun en yaygın mekanizmasıdır. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu, ER stresi ve gelişimsel bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hücresel streslere yanıt olarak aktive edilmektedir. Bu yolda, yürütücü kaspazları, apoptozom olarak adlandırılan bir kaspaz aktivasyon platformu tarafından aktive edilen kaspaz-9 ile kesilip aktive edilmektirler. Bir dizi iç uyaran, mitokondriyal membran geçirgenliğinde bir artışa neden olmaktadır. Bu farklı stres faktörleri, Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonu (MOMP) ile sonlanan mitokondriye sinyal gönderen çeşitli hücre içi proteinler tarafından kabul edilmektedirler. MOMP, en sık olarak B-hücreli lenfoma 2 protein

(BCL-2) ailesinin çeşitli protein-membran ve protein-protein etkileşimlerine aracılık etmektedir. Bcl-2 protein ailesi, 25 pro- ve antiapoptotik üyeden oluşmaktadır ve hücre sağlığı bu pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye dayanmaktadır. Bcl-2 ailesi üyeleri bir veya daha fazla Bcl-2 homoloji (BH) alanı içermektedirler. Bunlar, dört BCL-2 homoloji alanlarına sahiptirler. BCL-2, MCL-1, A1 / Bfl-1, Bcl-B / Bcl2L10 ve BCL-XL (BCL ekstra büyük) pro-apoptotik karşılıklarını protein-protein etkileşimleri yoluyla inhibe ederek apoptozu engelleyen antiapoptotik proteinlerdir. Proapoptotik aile üyeleri, BAX, BAK ve BOK (BCL-2 ile ilgili ovaryan katil) veya bunların sadece BH3 domeni ihtiva edip etmedikleri gibi birden fazla BH domenine (efektör proteinleri) sahip olup olmadıklarına göre BID, BIM, PUMA, NOXA, BIK, BAD, HRK ve BMF'yi içeren iki alt gruba ayrılmaktadırlar [21,24].

Apoptotik uyaranları takiben, sadece BH3 proteinleri (BAX ve BAK) aktive olmakta ve sitokrom c ve diğer mitokondriyal proteinlerin serbest bırakılması için dış mitokondriyal membrana girmektedir. Bunlar arasında apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G, Smac/DIABLO (ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/ Düşük PI ile doğrudan IAP bağlayıcı protein) ve serin proteaz Omi/HtrA2 (Yüksek sıcaklık gereksinimli protein A2) yer almaktadır. Daha sonra sitoplazmada sitokrom c, apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ile etkileşmekte ve apoptozom olarak bilinen bir kompleksi oluşturmaktadır. Yedi kollu halka şekilli bir kompleksi içeren çok-proteinli bir platform olan apoptozom, başlatıcı kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açmaktadır (genellikle kaspaz-9), bu da yürütücü kaspaz-3'ü harekete geçirir ve sonuçta bir kaspaz kaskadını başlatmakta ve bu durum hücre yıkımıyla sonuçlanmaktadır. AIF ve endonükleaz G, kromatin yoğunlaşmasını ve nüklear DNA'nın bölünmesini tetikleyerek kaspazdan bağımsız hücre ölümünü destekleyebilmektedir. AIF'nin kaspazdan bağımsız hücre ölümündeki temel rolünün yanı sıra, hücre sağkalımı için önemli bir protein olarak kabul edilmektedir. Kaspaz aktivasyonu için ek bir mekanizma sağlayan sitosole salınan diğer mitokondriyal proteinler, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2'dir. Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2, apoptoz proteinlerinin inhibitörü (IAP) ile etkileşip antagonize ederek kaspaz aktivasyonunu desteklemektedir [21,24].

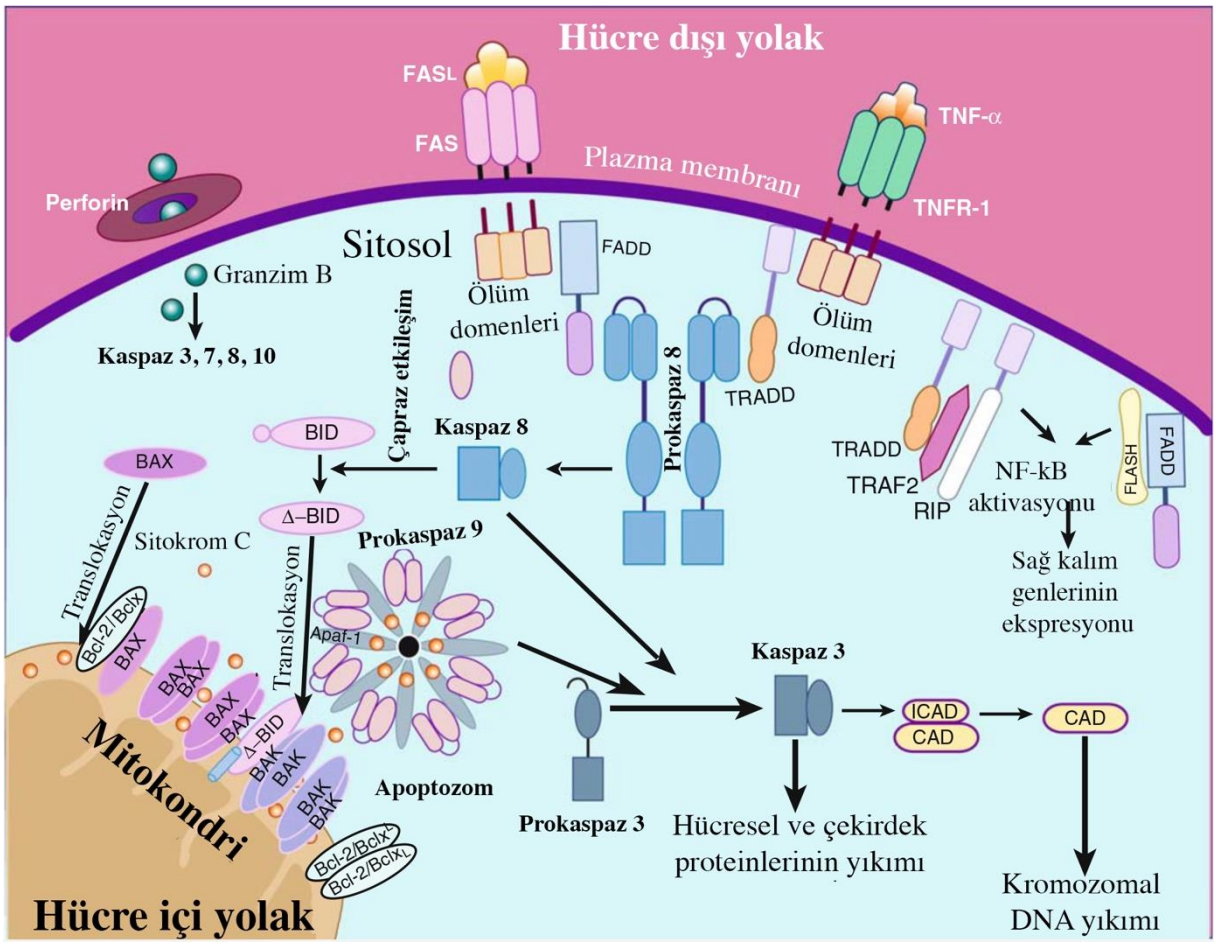
Perforin/Granzim Yolu: T hücresinin aracılık ettiği sitotoksisite, hassaslaştırılmış $CD8^+$ hücrelerinin antijen taşıyan hücreleri öldürdüğü tip IV hipersensitivitenin bir çeşididir. Bu sitotoksik T lenfositler (CTL'ler), dışsal yolla hedef hücreleri öldürebilir ve FasL/FasR etkileşimi, CTL kaynaklı apoptozun baskın yöntemidir. Bununla birlikte, aynı zamanda, sitotoksik etkilerini, tümör hücreleri ve virüsle enfekte edilmiş hücreler üzerinde, transmembran gözenek oluşturucu molekül perforininin salgılanmasını içeren, gözeneklerden ve hedef hücreye sitoplazmik granüllerin salımını içeren yeni bir yol vasıtasıyla da gösterebilmektedirler. Serin proteazları granzim A ve granzim B, granüller içinde en önemli bileşenlerdir. Granzim B, aspartat bakiyelerinden proteinleri kesmekte ve bu nedenle prokaspaz-10'u aktive ederek ICAD (Kaspaz ile Aktive Edilmiş DNAz İnhibitörü) gibi faktörleri kesebilmektedir. Granzim B'nin, spesifik olarak kesilmesi ve sitokrom c salınımının indüklenmesi ile ölüm sinyalinin çoğaltılması için mitokondriyal yolağı kullanabileceği de gösterilmiştir. Bununla birlikte, granzim B aynı zamanda kaspaz-3'ü doğrudan aktive edebilmektedir. Bu şekilde, yukarı akış sinyal yolları atlanmakta ve apoptozun yürütme aşamasının doğrudan indüksiyonu gerçekleşmektedir. Hem mitokondriyal yol hem de kaspaz-3'ün doğrudan aktivasyonu, granzim B ile indüklenen öldürme için kritiktir. Granzim A, sitotoksik T hücresi kaynaklı apoptozda da önemlidir ve kaspazdan bağımsız yolları aktive etmektedir. Granzim A, bir tümör baskılayıcı gen ürünü olan DNAz NM23-H1 yoluyla DNA'nın bağlanmasını aktive etmektedir. Bu DNAz, tümör hücresi apoptozunun indüksiyonu yoluyla kanseri önlemek için immün gözetimde önemli bir role sahiptir. Granzim A proteazı, SET kompleksi kesmekte ve böylece NM23-H1 inhibisyonu ortadan kalkmaktadır. Bu durum da apoptotik DNA yıkımı ile sonuçlanmaktadır. NM23-H1'i inhibe etmesinin yanı sıra SET kompleksi kromatin yapısı ve DNA onarımında önemli fonksiyonlara sahiptir. Bu kompleksi oluşturan proteinler (SET, Ape1, pp32 ve HIMG2) kromatin ve DNA yapısını korumak için birlikte çalışmaktadır. Bu nedenle, bu kompleksin granzim A ile inaktivasyonu, büyük olasılıkla DNA ve kromatin yapı bütünlüğünün korunmasını engelleyerek apoptoza katkıda bulunmaktadır [17].



Şekil 2.6: Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik diyagramı.

Apoptoz, iki merkezi apoptotik yolla, dışsal ve içsel yollarla gerçekleştirilmektedir. Her iki apoptotik yol, aynı terminalde veya yürütme yolunda birleşmektedir. Dışsal yol, hücre dışı ligandların transmembran reseptörlerinin hücre dışı alanına eklenmesiyle başlamaktadır, oysa mitokondriyal apoptoz, birkaç hücre içi uyaran tarafından başlatılmaktadır. Her iki yolun başlatıcı kaspazı (kaspaz 8 ve 9, 10), bir kaspaz kaskadının başlatılmasına ve sonuç olarak hücrenin yıkılmasına neden olan efektör kaspazların (kaspaz 3, 6, 7 gibi) proteolitik olgunlaşmasını katalize edebilmektedir. DNA hasarı, DR-5, BAX, BAK, NOXA, PUMA'nın transkripsiyonunu indükleyen ve aynı zamanda Bcl-2 ve survivin gibi antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu inhibe eden tümör baskılayıcı protein p53'ün aktivasyonu ile apoptozu tetiklemektedir. P53'ün mitokondrideki antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri ile sitoplazmik etkileşimi, mitokondriyal dış zardan sitokrom c gibi apoptotik faktörlerin salınmasına neden olmaktadır. Ek olarak, p53 doğrudan Bak ve/veya Bax ile etkileşime girebilmekte ve bunları

dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu başlatan bir "vur ve çalıştır" mekanizması ile aktive edebilmektedir [24].



Şekil 2.7: Apoptotik sinyal yollarının şematik gösterimi.

Hücre dışı yolak: Tümör nekrozis faktörü (TNF) veya Fas ligandı (FASL) gibi peptitlerin bağlanmasını takiben, reseptörler oligomerize olmakta ve adaptör proteinlerini [Fas ilişkili ölüm domeni (FADD), tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkilidir. Ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksleri oluşturmak için ölüm alanı (TRADD)], efektör kaspazlarını (örneğin kaspaz-3) sırayla aktive eden başlatıcı kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olmaktadır. Diğer adaptör proteinleri (FLASH), inhibitör proteinler (FLIP) ya da ölüm mekanizmaları (reseptör etkileşimli protein, RIP) yanı sıra hayatta kalma yollarında yer alan proteinler yaşamı ya da ölümü belirleyen karmaşık mekanizmalara katılabilmektedir. TNF-TNFR1 kompleksi, antiapoptotik genlerin NF-κB aracılı yukarı regülasyonu ile sonuçlanan TRAF2'yi alarak bir antiapoptotik yanıtı da ortaya çıkarabilmektedir. Sitotoksik T-lenfosit

kaynaklı ölümde, perforin tarafından oluşturulan membran kanalları boyunca hücreye giren granzim B, kaspazları doğrudan veya dolaylı olarak keserek aktive etmektedir. **Hücre içi yolak:** Sağkalım uyaranlarının (büyüme faktörünün, hipoksinin, genotoksik maddelerin, vs.) geri çekilmesinin, zayıf tanımlanmış mekanizmalarla apoptotik sinyaller üreteceği düşünülmektedir, bu da Bax gibi proapoptotik proteinlerin dış mitokondriyal membrana translokasyonuna yol açmaktadır. Bazı durumlarda, p53'ün aracılık ettiği transkripsiyonun Bax gibi proteinleri indüklemesi gerekebilmektedir. Transloke Bax, sitokromu c'yi mitokondriden sitosole sızdıran oligomerik yapılar (gözenekler) oluşturmak için dış zarda konformasyonel değişikliklere uğramaktadır. Sitokrom c, adaptör protein Apaf-1 ve başlatıcı kaspaz 9'un oluşturduğu üçlü bir kompleks apoptozom olarak adlandırılan yapıyı oluşturmakta ve bu yapı kaspaz 9'un aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ardından kaspaz 3 gibi efektör kaspazların ardışık aktivasyonu gerçekleşir. Kaspazlar, endonükleazlar ve muhtemelen diğer enzimlerin etkileri hücresel parçalanmaya yol açmaktadır. Örneğin, endonükleaz CAD (kaspazla aktive edilmiş DNAz), bir efektör kaspaz ile ICAD'nin kesilmesi üzerine inhibitör, ICAD'den serbest bırakıldığında aktive olmaktadır. Bcl-2 ve Bcl-xL gibi antiapoptotik proteinler Bax ve diğer proapoptotik proteinlerin membran permeabilize edici etkilerini inhibe etmektedir. Hücre dışı ve hücre içi yollar arasındaki çapraz-konuşma, kaspaz-8 aracılı Bid bölünmesiyle gerçekleşmektedir. Bu da mitokondriye göç eden ve sitokrom c'yi serbest bırakan bir 15 kDa proteini ortaya çıkarmaktadır. Böylece kaspaz-9 yoluyla apoptoza yol açan hareket olayları ortaya çıkmaktadır [22].

2.4.5.2. Kaspaz Aktivasyonu, İşlevi ve Düzenlenmesi

Kaspazlar (Cysteine Aspartate Specific ProteASE- CASPASE), substratlarında aspartik asit kalıntılarına özgü olan sistein proteazlarıdır. Cellat kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) yıkımı etkilemekte ve protein etkileşim alanlarından yoksun olan inaktif dimerler olarak üretilmektedirler. Aktivasyon, olgun enzimin büyük ve küçük alt birimleri arasında olan proteolitik kesilmeden kaynaklanmaktadır. Kesilmenin ardından, yeni uçlar dimer ara yüzüne katlanmakta ve olgun proteazda iki aktif bölge oluşturmak için konformasyonel değişiklikleri teşvik etmektedir. Kaspaz-6'nın kesimi kaspaz-3 ve kaspaz-7 aracılıyken, kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu genellikle "başlatıcı" kaspazların işlevidir. Bu başlatıcı kaspazlar ve bunların aktivasyonu, apoptotik sinyal yollarını tanımlamaktadır. Aktivasyonu takiben, yürütücü kaspazlar, özellikle kaspaz-3 ve kaspaz-7, en az 1000 protein işleyebilmekte

(aktifleştirmekte ya da inaktifleştirmekte) ve nihayetinde apoptoz ile ilişkili hücresel değişikliklere yol açmaktadırlar. Özellikle, kaspaz proteolizisi temel fizyolojik süreçlerin bileşenlerini inaktive etmektedir. Örneğin, elektron taşıma zincirinin kompleks I'inin p75 alt biriminin kaspaz bölünmesi, apoptoz sırasında mitokondriyal transmembran potansiyelini, elektron taşınmasını ve ATP üretimini bozmaktadır. Tersine, kaspaz kesilmesi aynı zamanda spesifik yolları da aktive edebilmektedir. Bu durum, inhibitör iCAD, kaspaz-3 ile kesildiğinde, nükleozomlar arasında kromatini kesen bir DNAz olan kaspaz ile aktive edilmiş nükleaz (CAD) için geçerlidir. Ek olarak, kaspazlar, bazı bileşenlerinin yapısal aktivasyonu yoluyla sinyal yollarını etkilemektedirler. Örneğin, apoptotik hücrelerin karakteristik morfolojisi, çeşitli aktin hücre iskelet modülatörlerinin kaspaz aracılı aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Örneğin; gelsolin, p21 ile aktive olan kinaz 2 (PAK2) ve Rho ile ilişkili kinaz (ROCKI). Gelsolin, kaspaz işleminden sonra yapısal olarak aktif hale gelmektedir. PAK2 ve ROCK I, aktin polimerizasyonu ve aktin miyosin kontraktilitesini düzenleyen Rho GTPaz ailesinin (Rac1, Cdc42 ve Rho) serin-treonin kinaz efektörleridirler. Kaspaz bölünmesi üzerine, kinaz aktivitesi GTPaz'lardan bağımsız hale gelmektedir. Böylece aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve apoptotik hücrelerde gözlemlenen karakteristik membran kabarcıklanmasına neden olmaktadır. Cellat kaspazlardan farklı olarak, başlatıcı kaspazlar hücrelerde inaktif monomerler olarak bulunmakta ve bölünme ile aktive edilmemektedirler. Bunun yerine, kaspaz aktivasyon platformlarına monte edilen adaptör molekülleri, bu başlatıcı kaspazları almakta, monomerleri yakınlaşmaya zorlamakta ve aktif kısımların oluşumuyla sonuçlanan konformasyonel değişikliklere neden olmaktadırlar. Kaspaz aktivasyon platformları ve kaspazlar arasındaki etkileşimler, proteinlerin ölüm katlanma alanlarını içermektedirler. Bu ölüm katlanma elemanları arasında adaptör proteinler ve kaspazlar da bulunmaktadır: kaspaz-alım bölgesi (CARD) ve ölüm efektör alanı (DED). Diğer ölüm katlanma alanları, ölüm domeni (DD) ve pirin (PYR) domeni, kaspazlar üzerinde bulunmayan bazı kaspaz aktivasyon platformlarının birleşmesinde yer almaktadır. Ölüm katlanma alanları genellikle homotipik etkileşim yoluyla protein-protein etkileşimine aracılık etmektedir. Dizi benzerliğini paylaşmazlar ancak altı amfipatik bir sarmaldan oluşan benzer yapılara sahiptirler [21].

2.4.5.3 Apoptozun Genetik Kontrolü

2.4.5.3.1. Antiapoptotik proteinler

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını almaktadırlar. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirmektedirler. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir. Bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiği ortaya konulmuştur. Omurgalılarda apoptozu düzenleyen genler *c-myc*, *p53* ve *bcl-2* ailesi (*bcl-2*, *bax* ve *bcl-x*) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır [26].

p53: Apoptozu düzenleyen tümör baskılayıcı gen, *p53* genidir. p53 proteini nükleusta yer almakta ve çoğu genin transkripsonunu kontrol etmektedir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu *p53* aracılı DNA onarımını ve apoptozu başlatmaktadır. DNA hasarı oluştuğu zaman *p21* genini aktif hale getirerek G1'den S fazına geçişi engellemektedir. Tamir genlerini indükleyerek hasar onarımı sürecini başlatmaktadır. Hücreler DNA tamiri için zaman kazanmakta, eğer tamir mümkün değilse hasarlanmış hücreler apoptoz ile yok edilmektedir [26].

c-myc: Bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin çoğalmasına ve apoptoza uğramasına neden olmaktadır. *C-myc* protoonkogeni bir hücrenin büyümesini programlamaktadır. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durmakta, her ikisi de yeterli ise çoğalma olmakta ve c-myc olduğu halde büyüme faktörleri yoksa apoptoz görülmektedir [26].

Bcl-2* ve *Bcl-xl: Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verilmesinde etkendir. Bcl-2 ailesi proteinleri güçlü bir ölüm inhibitörüdür ve etki yeri mitokondridir. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, endoplazmik retikulum ve nüklear membranlarda bulunmaktadır. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanmaktadır. Bcl-xl, mitokondri membranının dışında yer almaktadır. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korumaktadırlar.

Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bad) inhibe ederek apoptozu engellemektedirler. Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, Apaf-1 üzerinden önlemektedir. Bax ve bad proteinleri etkilerini diğer bir protein ailesi; kaspazlar üzerinden gerçekleştirmektedirler. Bunların sayısı da bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlardır, aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkmaktadır. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilmektedir. Kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNFα gibi sitokinler tarafından aktive edilmektedir [26].

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP: Antiapoptotik protein ailesinden apoptoz protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; *XIAP*, *cIAP1*, *cIAP2*, *NAIP*, *Bruce*, *Survivin*, *pIAP* olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a doğrudan bağlanıp inhibe ederek gerçekleştirmektedir [26].

2.4.5.3.2. Proapoptotik proteinler

Bax, Bad* ve *Bid: Sağlıklı hücrede bax sitosolde bulunmaktadır. Apoptotik uyarı ile sitosolik bax mitokondriye yönelmektedir ve çeşitli değişimler sonucunda bax'ın hidrofobik C terminal ucu açığa çıkmakta ve bu durum sitokrom-c salınımına neden olmaktadır. Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunmaktadır. Apoptoz sırasında bax değişime uğramakta ve N terminal ucu açığa çıkarken bcl-xl, bad'dan ayrılmaktadır. Bid, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktifleştirmek üzere mitokondriye yönelmektedir. Endojen bid'in yarısı sitosolde diğer yarısı ise hücre içi membranlarda özellikle de endoplazmik retikulumda bulunmaktadır [26].

2.4.5.4 Apoptozun Kanserdeki Rolü

Uygun apoptotik sinyalleme, hücre ölümü ve hücre sağkalımı arasında sağlıklı bir dengenin sağlanması ve genom bütünlüğünün korunmasında temel olarak önemlidir. Apoptozdan kaçışın ortaya çıkması kanserin önemli bir işareti olarak kabul edilmektedir. Apoptotik yollar kanser hücreleri tarafından transkripsiyonel, translasyonel ve post translasyonel olarak değiştirilebilmektedir. Hücrede proapoptotik veya antiapoptotik aktivite uygulayan birkaç protein belirlenmiştir. Bu proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin oranı, hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta ve malign hücrelerde apoptozu azaltarak karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Örneğin, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 proteinleri arasındaki dengesizlik kanser hücresi sağkalımını destekleyebilmektedir. Bu,

proapoptotik proteinlerin ve antiapoptotik proteinlerin düşük veya aşırı anlatımına veya her ikisinin bir kombinasyonuna bağlı olabilmektedir. Farklı insan kanserlerinde, Bcl-2 ailesinin çeşitli proapoptotik üyelerinin genetik ve epigenetik değişiklikleri bildirilmiştir. Proapoptotik Bcl-2 aile proteinlerinin inaktivasyonunun yanı sıra, yüksek seviyelerde antiapoptotik aile üyelerinin varlığı, kanserde apoptoz disregülasyonunun belirgin bir mekanizmasıdır. Antiapoptotik proteinler, stres sinyallerinin üstesinden gelmek için kanser hücrelerinde çok fazla sentezlenmektedir. Antiapoptotik Bcl-2 aile proteinlerinin aşırı ifadesi sıklıkla nüksetme, kötü prognoz ve kanser terapisine direnç ile ilişkilidir [24]. Genetik ve epigenetik değişikliklere ek olarak, mikroRNA'ların (miRNA'lar) disregülasyonunun farklı insan kanserleriyle ilişkili olduğuna ve miRNA'ların onkojenler ve tümör baskılayıcıları olarak işlev görebileceğine dair kanıtlar vardır. miRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen anlatımlarını düzenleyen ve hedef mRNA'ları susturan bir kodlamayan RNA sınıfıdır. miRNA'lar, apoptotik yolaklara, özellikle Bcl-2 aile proteinlerine dahil olan farklı mRNA'ları hedefleyerek antiapoptotik veya proapoptotik düzenleyiciler olarak hareket etmek üzere yerleşmektedirler. Örneğin; miR-15/16 antiapoptotik faktör olan Bcl-2'yi hedeflemesi ve miR-15/16 tümör baskılayıcı kaybının veya azaltılmış anlatımının, bazı tümörlerde Bcl-2 seviyesinin yükselmesine sebep olması bu ilişkiyi açıklayabilmektedir. Ayrıca, proapoptotik miR-34 aile üyeleri ve miR-125b antiapoptotik proteinleri aşağı regüle etmekte ve hücre çoğalmasında azalmaya ve apoptoz artışına yol açmaktadır. Diğer yandan, bazı miRNA'lar, miRNA-21, miRNA-17/92 kümesi, miRNA-272/273 ve miRNA-221/222 dahil olmak üzere onkojenik fonksiyonlara sahiptir, bu da kanser hücresi çoğalmasını hızlandırmak için apoptotik aktiviteyi negatif olarak kontrol etemekte ve ilaç direncine katkıda bulunmaktadır. Farklı kanser türlerinde, sürekli olarak düzenlenen miRNA, antiapoptotik miRNA-21'dir. miRNA-21'in programlanmış hücre ölümü 4 genini (*PCD 4* geni veya *PDCD4*), tropomiyosin 1'i (TPM1) ve fosfataz ve tensin homoloğunu (PTEN) hedefleyerek apoptozu modüle edebileceğine inanılmaktadır. Deneysel kanıtlar, antimikroRNA'ların veya miRNA taklitlerinin kullanılmasının, kanserde mevcut olan anahtar moleküler yolları inhibe etmek için güçlü bir terapötik strateji olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. miRNA'ların yanı sıra, kanser hücreleri normal hücreler ve dokularla karşılaştırıldığında belirli tümör türlerinde farklı uzun kodlamayan RNA'ların (lncRNA'lar) değiştirilmiş anlatım modellerini göstermektedirler. Bu nedenle, kanser hücrelerindeki modülasyonları (spesifik lncRNA'ya göre aşırı anlatım veya aşağı regülasyon) genellikle apoptotik tedavilere karşı hücreleri

hassaslaştırmaktadır ve sonuç olarak apoptozu indüklemektedir. Dolayısıyla, bu durum kanser hücrelerinde apoptozu modüle etmek için lncRNA'ları hedeflemenin kanser tedavisi için kullanılabileceğini göstermektedir [24].

Hücresel-FLICE inhibitör protein (c-FLIP), Fas, TNF-R1, DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği apoptotik yolun kritik bir negatif düzenleyicisidir. Aynı promotörden transkribe olan üç c-FLIP proteini izoformları (c-FLIPL, c-FLIPS ve c-FLIPR) vardır. Yüksek anlatım seviyelerinde, üç izoform, sistein proteazı ile yapısal benzerliğinden ötürü, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'un aktivasyonunu inhibe ederek, DISC seviyesinde işlev görmektedir. c-FLIP'in (uzun veya kısa izoform) artırılmış anlatımı bir çok kanser türünde tespit edilmiştir. Bu nedenle, c-FLIP, özellikle başka tedavilerle, örneğin TRAIL veya geleneksel kemoterapi ile birleştirildiğinde, kanser terapisi için umut verici bir hedef olarak kullanılabilmektedir. c-FLIP'in yüksek anlatım seviyelerinde antiapoptotik rolünün tersine, c-FLIPL'nin, kaspaz-8 aktivasyonunu arttırmak için DISC'i toplayarak düşük ve daha fizyolojik olarak ilgili anlatım seviyelerinde apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. c-FLIPL'nin normal dokularda bir proapoptotik ya da antiapoptotik faktör olarak bilinen ikili fonksiyonuna rağmen, c-FLIPL'nin, insan kanser hücrelerinde apoptozun temel bir negatif düzenleyicisi olarak harekete geçtiği tespit edilmiştir. c-FLIP, bir dizi transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel hedefidir. Bu transkripsiyon faktörleri arasından, *AP-1* (c-Fos ve *c-Jun*), *CREB, SP1* ve *NF-kB, c-FLIP* ekspresyonunu indüklemektedir. CD40 ligandı veya TNFα ile NF-kB'nin aktivasyonu, *c-FLIP*'in fazla anlatımı ile sonuçlanmaktadır ve TNFR1, Fas ve TRAIL reseptörlerinin engellenmesi apoptozu indüklemektedir. Benzer şekilde, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)/Akt gibi çeşitli yolakların büyüme faktörü stimulasyonu veya aktivasyonu, *c-FLIP* anlatımını teşvik edebilmekte ve ölüm reseptörleri tarafından uyarılan apoptozu inhibe edebilmektedir [24].

IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins; Apoptoz İnhibitörü Proteinler), hem içsel hem de dışsal apoptozu engelleyen ve ER stresi ve hücre dışı matrikse tutunma kaybı gibi hücresel stresler sırasında hücre sağkalımını arttıran bir protein ailesidir. Ayrıca, *IAP* ekspresyonu E6 ve Ras dahil olmak üzere güçlü onkojenler tarafından indüklenmektedir; Nüklear faktör (NF) κB gibi sağkalım sinyallemesi de IAP'yi indükleyebilmektedir. Özellikle, bu ailenin iyi bilinen üyeleri XIAP (X-bağlantılı IAP), BIRC5, cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3), Livin/MLIAP (BIRC7), Apollon (BRUCE, BIRC6), IAP benzeri protein 2 (BIRC8) ve NAIP (BIRC1)'i içermektedir.

Tüm IAP proteinleri, protein-protein etkileşimlerine aracılık eden bir ila üç bakulovirüs IAP tekrarı (BIR) alanının varlığı ile karakterize edilmektedir. Bu proteinler tarafından kaspaz aktivitesinin inhibisyonu kaspazların aktif bölgelerinin IAP'nin korunmuş BIR domeni ile etkileşmesi ile meydana gelmektedir ve kaspazları substratlarından uzak tutarak aktif kaspazların yıkılmasına neden olmaktadır. Kaspazların apoptozun başlatılmasında ve yürütülmesindeki önemi nedeniyle kaspaz fonksiyonundaki ya da düşük seviyeli kaspazlardaki bozukluğun apoptoz ve karsinogenezin azalmasına yol açabileceğini düşünmek mantıklıdır. Kaspazların aşağı regülasyonu çeşitli kanserlerde gözlenmiştir; örneğin, kaspaz-9'un aşağı regülasyonu kolorektal kansere yol açabilmektedir ve negatif klinik sonuçlarla ilişkilendirilebilmektedir. Ek olarak, Devarajan ve ark. (2002) yumurtalık, meme ve servikal kanserlerde kaspaz 3 düzeylerinin azaldığını gözlemlemişler ve meme kanseri hücrelerinde (Mcf-7) kaspaz-3 anlatımının geri kazanılmasının, bu hücrelerin antikanser ilaçlarına veya diğer apoptotik uyaranlara yanıt olarak apoptoza maruz kalma hassasiyetinin artmasına neden olduğunu saptamışlardır. Özellikle, tümör gelişmesine katkıda bulunan birden fazla kaspazın aşağı regülasyonunu gösteren bazı kanıtlar da bulunmaktadır [24].

2.4.5.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz, birden fazla noktada sıkı bir şekilde düzenlenmiş karmaşık bir sinyalleşme kaskadıyla gerçekleştiği için, dahil olan proteinlerin aktivitesini değerlendirmek için birçok olanak mevcuttur. Bu kaskadın aktivatörleri, efektörleri ve düzenleyicileri aydınlatılmaya devam ettikçe, apoptotik hücreleri tespit etmek ve saymak için çok sayıda apoptoz analizi tasarlanmaktadır. Bununla birlikte, apoptoz ve nekrozun birçok özelliği çakışabilmekte ve hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleştiğini doğrulamak için iki veya daha fazla farklı deneyi kullanmak oldukça önemlidir. Bir analiz, erken (başlatma) apoptotik olayları algılayabilmekte ve farklı bir test daha sonraki (yürütme) bir olayı hedefleyebilmektedir. Apoptozu doğrulamak için kullanılan ikinci deney, genellikle farklı bir ilkeye dayanmaktadır [17]. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir:

- Sitomorfolojik değişiklikler
- DNA fragmentasyonu
- Kaspazların, kesilmiş substratlarının, regülatörlerin ve inhibitörlerin saptanması
- Membran değişiklikleri
- Mitokondriyal testler

Sitomorfolojik Değişiklikler

Işık mikroskobu ile hematoksilin ve eozin boyalı doku kesitlerinin veya hücre örneklerinin değerlendirilmesi apoptotik hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır. Bu yöntemle tek bir apoptotik hücre tespit edilebilmesine rağmen, diğer yöntemlerle doğrulama gerekli olabilmektedir. Apoptozun morfolojik olayları hızlı olduğundan ve fragmanlar hızla fagosite olduğundan, histolojik olarak belirgin hale gelmeden önce bazı dokularda ciddi apoptoz görülebilmektedir. Ek olarak, bu yöntem apoptozun daha sonraki olaylarını tespit etmekte, bu nedenle apoptozun erken fazında hücreler tespit edilememektedir. Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) apoptozu doğrulamak için altın standart olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni, hücrenin bazı morfolojik özellikler içermesi durumunda apoptotik bir hücrenin sınıflandırılmasının reddedilememesidir. TEM'ın temel dezavantajları, maliyet, zaman ve bir seferde sadece küçük bir bölgenin analiz edilebilmesi olarak sıralanmaktadır [17].

DNA Fragmentsayonu

DNA merdivenleme (laddering) tekniği, apoptozun endonükleaz bölünme ürünlerini görselleştirmek için kullanılmaktadır. Bu analiz, DNA'nın bir lizisli hücre homojenatından ve ardından agaroz jel elektroforezinden ekstraksiyonunu içermektedir. Bu, merdiven içinde her bir bandın yaklaşık 180 baz çiftiyle ayrıldığı karakteristik bir "DNA merdiveni" ile sonuçlanmaktadır. Bu yöntemin uygulanması kolay olup, $1x10^6$ hücre hassasiyetine sahiptir (yani, algılama seviyesi 1.000.000 hücre kadar azdır) ve doku kütlesi veya hacmi başına yüksek sayıda apoptotik hücreye sahip dokular ve hücre kültürleri için kullanışlıdır. TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labelling) yöntemi, endonükleaz parçalanma ürünlerini DNA iplikçik kırılmalarını enzimatik olarak sonlandırarak analiz etmek için kullanılmaktadır. Terminal transferaz, DNA fragmanlarının 3' ucuna etiketli dUTP eklemek için kullanılmaktadır. dUTP daha sonra ışık mikroskobu, floresan mikroskobu veya flow sitometri ile tespit edilmesini sağlamak için çeşitli problarla etiketlenebilmektedir. Bu analiz aynı zamanda çok hassastır ve tek bir hücrenin floresan mikroskobu aracılığıyla veya ~100 hücre gibi az sayıdaki hücrenin flow sitometre aracılığıyla saptanmasına izin vermektedir. Aynı zamanda hızlı bir tekniktir ve 3 saat içinde tamamlanabilmektedir. Dezavantajları maliyet ve bu yöntemle apoptozun tespiti için kaç DNA iplik kopuşunun gerekli olduğunun bilinememesidir. Bu yöntem aynı zamanda DNA onarımı ve gen transkripsiyonu sürecinde

nekrotik hücrelerden gelen yanlış pozitif sonuçları da gösterebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, başka bir test ile eşleştirilmelidir [17].

Kaspazların, Kesilmiş Substratların, Regülatörlerin ve İnhibitörlerin Saptanması

Çeşitli kaspaz aktivitesi analizleri kullanılarak tespit edilebilen 13'ten fazla bilinen kaspaz (prokaspazlar veya aktif sistein kaspazları) vardır. PARP gibi bölünmüş substratları ve fosforile histonlar gibi bilinen hücre modifikasyonlarını tespit edebilen immünohistokimya testleri de mevcuttur. Floresan olarak konjuge kaspaz inhibitörleri, hücreler içindeki aktif kaspazları etiketlemek için de kullanılabilmektedir. Kaspaz aktivasyonu, western blot, immün presipitasyon (çöktürme) ve immünohistokimya dahil olmak üzere çeşitli yollarla tespit edilebilmektedir. Poliklonal ve monoklonal antikorların her ikisi de hem prokaspazlar hem de aktif kaspazlar için mevcuttur. Apoptoz PCR mikrodizi, apoptozda en az 112 genin anlatımını izlemek için gerçek zamanlı PCR kullanan nispeten yeni bir yönemdir. Bu PCR mikrodizileri, kilitli ligandları, reseptörleri, hücre içi modülatörleri ve programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde yer alan transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin anlatım profilini belirlemek için tasarlanmıştır. Antiapoptozda rol oynayan genler de bu yöntem ile değerlendirilebilmektedir. Hücre veya dokularda gen anlatımının karşılaştırılması, test örnekleri ve kontroller arasında gerçekleştirilebilmektedir. Genlerin hiyerarşik küme analizi, transkripsiyonel aktivasyon ve/veya baskının farklı zamansal ifade kalıplarını ortaya çıkarabilmektedir. Bununla birlikte, sonuçların yorumlanması çok sayıda analiz edilen gen ve metodolojik karmaşıklıkla zorlaşabilmektedir. Bu yöntem, 96 kuyucuklu bir plaka ve total RNA'nın 5 ng'ından azını kullanmaktadır. Her mRNA veya transkript, floresan boya gibi bir işaretleyici ile işaretlenmektedir. Anlatım profili için gerçek zamanlı bir PCR cihazı kullanılmaktadır. Ortaya çıkan sinyallerin yeri ve yoğunluğu, örnekteki her transkript miktarını tahmin etmektedir. Mikrodizi testi apoptozu doğrulamak için farklı bir yöntem ile birleştirilmelidir [17].

Membran Değişiklikleri

Fosfatidilserin kalıntılarının, apoptotik hücrelerin plazma membranının dış yüzeyine transloke olması, dokularda, embriyolarda veya kültüre hücrelerde Annexin V yoluyla tespit edilebilmektedir. Apoptotik hücreler, FITC etiketli Annexin V ile bağlandıktan sonra, floresan mikroskobu ile görüntülenebilmektedir. Bu yöntemin avantajı hassasiyeti olup (tek bir

apoptotik hücreyi tespit edebilir) başlatıcı kaspazların aktivitesini de doğrulayabilmektedir. Dezavantajı, nekrotik hücrelerin zarlarının da etiketlenmiş olmasıdır. Membran bütünlüğünün kaybı nekrotik hücre ölümünün patognomonik (özgül belirtisi) bir özelliğinden ötürü, nekrotik hücreler propidyum iyodür ve tripan mavisi gibi spesifik zar geçirgenliği olmayan nükleik asit boyaları ile boyanacaktır. Benzer şekilde, apoptotik hücrelerin zar bütünlüğü, bu boyaların dışlanmasıyla gösterilebilmektedir. Fosfatidilserinin, hücre zarının dışına aktarılması, belirli boyaların, hücreye tek yönlü bir şekilde taşınmasına da izin vermektedir. Hücrede boya biriktikçe ve hacim içinde küçüldükçe, hücre boyası içeriği daha konsantre hale gelir ve ışık mikroskobu ile görüntülenebilir [17]. Flow sitometre yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor (FITC etiketli Annexin V) kullanılarak apoptotik hücrelerde membranın iç tarafından dış tarafına doğru translokasyona uğrayan bir hücre yüzey lipidinin (Fosfatidilserin) saptanması ile apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından apoptozun saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak kompleks bilgisayar işlemleri ile hücre boyutu ve içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre populasyonu tayin edilebilmektedir. Floresan mikroskobuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınabilmektedir [26]. Bu yöntemler de apoptozu doğrulamak için farklı bir yöntem ile eşleştirilmelidir.

Mitokondriyal Analizler

Mitokondriyal analizler ve sitokrom c salınımı, apoptozun içsel yolunun erken evresindeki değişikliklerin saptanmasını mümkün kılmaktadır. Lazer taramalı konfokal mikroskopi (LSCM), zamanla bozulmamış tek hücredeki birkaç mitokondriyal olayın izlenmesi için kullanılabilen canlı hücreler aracılığıyla mikron altı ince optik dilimler oluşturmaktadır. Mitokondriyal geçirgenlik geçişi (MPT), iç mitokondriyal membranın depolarizasyonu, Ca^{2+} akışları, mitokondriyal redoks durumu ve reaktif oksijen türleri bu yöntem ile izlenebilmektedir. Ana dezavantaj, bu metodolojinin izlediği mitokondriyal parametrelerin nekroz sırasında da ortaya çıkabilmesidir. Mitokondriyal dış membran (MOM) boyunca bulunan elektrokimyasal gradyan, apoptoz sırasında düşmekte ve bir floresan katyonik boya ile tespit edilebilmektedir. Sağlıklı hücrelerde bu lipofilik boya mitokondride birikmekte ve spesifik bir floresan yayan agregatlar oluşturmaktadır. Apoptotik hücrelerde MOM,

elektrokimyasal gradyanı muhafaza etmemekte ve katyonik boya, toplanmış formdan farklı bir floresan yaydığı sitoplazmaya yayılmaktadır. Hücrelerdeki mitokondrinin redoks potansiyelini veya metabolik aktivitesini ölçen diğer mitokondriyal boyalar da kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, bu boyalar hücre ölüm mekanizmasını ele almamakta ve kaspaz deneyi gibi diğer apoptoz tespit yöntemleri ile birlikte kullanılmalıdır. Mitokondriden sitokrom c salımı canlı veya sabitlenmiş hücrelerde floresan ve elektron mikroskobu kullanılarak da test edilebilmektedir. Bununla birlikte, sitokrom c sitoplazmaya bırakıldıktan sonra kararsız hale gelmektedir. Bax, Bid ve Bcl-2 gibi apoptotik veya antiapoptotik düzenleyici proteinler de floresan ve konfokal mikroskopi kullanılarak tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte, floresan protein etiketi, doğal proteinin diğer proteinler ile etkileşimini değiştirebilmektedir. Bu nedenle, sonuçları doğrulamak için diğer apoptoz analizleri kullanılmalıdır [17].

2.4.6. Etnomedikal Bitkiler ve Kanser

Küresel olarak kanser, insan popülasyonunu ciddi biçimde etkileyen bir hastalıktır. Hayati tehlike arz eden bu hastalığı tedavi etmek ve önlemek için yeni terapilerin geliştirilmesi oldukça önemsenmektedir. Kemoterapi gibi mevcut tedavilere kıyasla daha az toksik yan etkileri olduğu düşünüldüğünden, bitkisel bileşiklerin keşfine yönelik çalışmalar oldukça artmıştır. Uzun yıllardan beri bitkisel ilaçlar kullanılmaktadır ve gelişmekte olan ülkelerde halen medikal tedavinin birincil kaynağı olarak başvurulmaktadır. Bitkiler, doğal antiseptik özellikleri için tıpta uzun yıllardır kullanılmışlardır. Günümüzde kanser gelişimini tedavi etmek veya önlemek için birçok bitki türü zaten kullanılmaktadır. Çoğu araştırmacı, gelişmekte olan ülkelerde halk tıbbında kullanılan bitkilere odaklanıp antikanser özellikleri gösteren bitki türlerini tanımlamaktadır. Bitki alemine özgü olan ve bitkinin hayatta kalması için ve organizmanın devamı için gerekli olan bileşikler, büyümeyi inhibe etme ve kanserli hücrelerin apoptozunu başlatma yetenekleri nedeniyle araştırılmaktadır. Normal hücreler üzerindeki muhtemel toksik olmayan etkileri veya düşük toksisiteleri ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri sebebiyle bitki kökenli olan ilaçlar klinik denemeler için talep görmektedirler. Araştırılan bitki türlerinin birçoğu, bitkisel tedavilerin uygulandığı Afrika ve Asya'daki gelişmekte olan ülkelerden seçilmekte ve bu bitkiler halen tıbbi bitkiler olarak bu ülkelerde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2007 yılında bitkisel ilaçların ticaretinin 100 milyar ABD doları değerinde olduğunu tahmin etmiştir. Ticaretin 2050 yılına kadar 5 trilyon

ABD dolarına ulaşması beklenmektedir. Kimyasal olarak türetilmiş ilaçlar ve diğer kanser tedavileri eskiden beri var olmuştur. Bununla birlikte, kemoterapi gibi mevcut yöntemlerin hedeflenmemiş dokular üzerindeki toksik etkileri nedeniyle sınırlamaları vardır. Vinka alkaloidlerinden türetilen ilaçlar, kullanılabilecek ilk bileşiklerden bazılarıydı ve Paklitaksel ve diğer antikanser ajanları ile birlikte klinik Faz III çalışmalarında yer almaktadırlar. Bu bileşikler doğal ortamdan kolaylıkla temin edilebilmekte ve sağlıklı insan hücreleri için nispeten toksik değildirler. Ayrıca, antikanser bileşikleri ve terapilerinin uygulanmasında kullanılacak olan nanopartiküller gibi yeni teknolojilerin kullanıldığı gelişmeler bulunmaktadır. Bu gelişmelerin, sürekli ilaç salımını kontrol etmek için uygulanabileceği ve tedavilerin ciddi yan etkilerini azaltarak dokuya özgü ilaçların yaratılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, arzu edilen kaynak olan bitkilerden doğal olarak türetilen antikanser ajanlar ile alternatif etkin tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç ve aynı zamanda yoğun bir talep vardır [27].

2.4.6.1. Klinikte Antikanser Ajan olarak Kullanılan Bitkiler

Klinik kullanıma giren ilk ajanlar, Madagaskar menekşesinden izole edilen vinka alkaloidler, vinblastin ve vinkristin olup, *Catharanthus roseus* (Pervane çiçeği) bitki materyalinin antikanser ajan olarak kullanılması yeni bir dönemin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Vinblastin ve vinkristin, lösemi, lenfoma, ilerlemiş testis kanseri, göğüs ve akciğer kanserleri ve Kaposi sarkoması gibi çeşitli kanserlerin tedavisi için öncelikle diğer kanser kemoterapötik ilaçlar ile birlikte kullanılmıştır. Paklitaksel'in *Taxus brevifolia* Nutt. (Pasifik Porsuk) kabuğundan keşifi, doğal ürün ilaç keşfindeki başarının bir başka kanıtıdır. *Taxus baccata*'nın Hint Ayurveda tıbbında kanser tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir. Paklitaksel yumurtalık kanserine, gelişmiş meme kanserine, küçük ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı önemli ölçüde aktiftir. Çin *Cephalotaxus harringtonia* (Yalancı porsuk) ağacından izole edilen Homoharringtonine, klinik kullanımda olan başka bir bitki türevi maddedir. Combretastatinler, Güney Afrika ağacı, *Combretum caffrum* (Irmak söğüdü) kabuğundan izole edilmiştir. Combretastatin lösemi, akciğer ve kolon kanserlerine karşı aktiftir ve bu molekülün şimdiye kadar izole edilen en sitotoksik fito molekülü olduğu bilinmektedir. Çin süs ağacı, *Camptotheca acuminate'den* izole edilen Camptothecin, 1970'lerde Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından klinik çalışmalara kadar geliştirilmiş ancak ciddi mesane toksisitesi nedeniyle vazgeçilmiştir. Bitkilerden çok sayıda biyoaktif bileşik izole edilmiştir.

Bazıları şu anda klinik çalışmalarda veya klinik öncesi denemelerde veya halen devam etmekte olan ileri çalışmalarda yer almaktadır. İki yeni alkaloid, schischkinnin ve montamin *Centaurea schischkinii* ve *Centaurea montana* tohumlarından izole edilmiştir. Her iki alkaloid, insan kolon kanseri hücrelerine karşı önemli sitotoksisite sergilemiştir. Schischkinnin ve montaminin benzersiz yapısal özellikleri nedeniyle, gelişmiş antikanser aktivitesi olan bileşiklerin üretilmesi için bir şablon olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, antikanser ajanlar olarak kullanımları için daha fazla araştırma gereklidir. Sonuç olarak, antikanser aktiviteye sahip bitki ekstreleri ve bunların içinde bulunan biyoaktif bileşikler muhtemel potansiyelleri için taranmalıdır [1,28].

2.4.6.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Etnomedikal Bitkiler

Bu tez çalışmasında kullanılan bitkilere ait bilgiler Tablo 2.1'de ve bitkilerin genel görünümleri Şekil 2,7'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1: *İn vitro* antikanser ve apoptotik aktiviteleri değerlendirilen etnomedikal bitkilerle ilgili genel bilgiler.

*ISTE: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu

Kodu	**Botanik Adı**	**Türkçe Adı**	**Aile**	**Bitkinin Kullanılan Kısmı**	**Toplandığı Bölge**	**ISTE* no**
E1	*Crataegus orientalis* Pall. ex M.Bieb.	Alıç	Rosaceae	Yapraklar	Mersin	98194
E2	*Centaurea kilaea* Boiss.	Kilyos Düğmesi (Endemik)	Asteraceae	Toprak üstü kısımları	Tekirdağ	68296
E3	*Centaurea hermannii* F.Herm.	Kulindor (Endemik)	Asteraceae	Toprak üstü kısımları	Kırklareli	80922
E4	*Crataegus monogyna* Jacq.subsp. *monogyna*	Alıç	Rosaceae	Yapraklar	Tekirdağ	109080
E5	*Kitaibelia balansae* Boiss.	Akhatmi (Endemik)	Malvaceae	Yaprak ve çiçekler	K.Maraş	115453
E6	*Plantago lanceolata* L.	Damarlıca, Dar Yapraklı Sinirli Ot	Plantaginaceae	Yapraklar	Edirne	106794
E7	*Centaurea behen* L.	Zerdali Dikeni	Asteraceae	Toprak üstü kısımları	Malatya	98997

Şekil 2.8: *İn vitro* antikanser ve apoptotik aktiviteleri değerlendirilen etnomedikal bitkilerin görünümleri.

Malvaceae, 1500'e yakın türü bulunan bitki ailesidir. *Kitaibelia* cinsi 2 tür içerir; *Kitaibelia balansae* (Akhatmi) ve *Kitaibelia vitifolia*. *K. balansae* ise *Kitaibelia* cinsinin tek Türk temsilcisidir. Bu endemik bitkinin özünün geleneksel olarak insanlar tarafından çeşitli iç ve

dış ağrıların tedavisi için bitkisel ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Literatür taramalarında bu bitkinin sadece antimikrobiyal etkinliğine ait çalışmaya rastlanmıştır [29]. Antikanser etkinliğinin araştırılması ilk defa bu tez çalışması tarafından gerçekleştirilecektir.

Plantago, Plantaginaceae familyasının en önemli cinsidir ve farklı amaçlar için dünya çapında geleneksel tıpta kullanılmaktadır. *P. lanceolata* enflamasyon, hücresel rejenerasyon ve ülserler için kullanılmıştır ve antikanser, antimikrobiyal, nematosidal, antioksidan aktivitelere ve fagositoz indüksiyonu, interferon üretiminin artması gibi etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur. *P. lanceolata*'nın yaprak kısımları, bronşiyal nezle ve farinksin mukoza zarındaki iltihaplanmayı tedavi etmek için de kullanılmaktadır [30,31,32,33,34].

Crataegus, Rosaceae ailesine aittir ve Avrupa, Doğu Asya ve Kuzey Amerika gibi kuzey bölgelerinde yetişir. *Crataegus* cinsinin Türkiye'de yaklaşık 21 tür içerdiği bildirilmiştir. *Crataegus orientalis* M Bieber. (aynı zamanda Anadolu alıcı olarak da bilinir) Akdeniz bölgesi, Kırım, Türkiye ve Batı İran'a özgüdür. Alıç yapraklarından, çiçeklerinden ve/veya meyvelerinden hazırlanan ekstreler veya tentürler eskiden beri geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bitki, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [35]. Alıç yaprakları, çiçekleri ve meyveleri, kardiyovasküler etkili olduğu bildirilen çeşitli biyoflavonoid kompleksleri içermektedir [36]. Ek olarak, farmakolojik çalışmalar dikkate alındığında, alıç ekstraktları antienflamatuvar ve antioksidan ajanlar olarak da kullanılabilmektedir. Alıç meyvelerinin yüksek flavonoid, C vitamini, glikozit, antosiyanidin, saponin, tanen ve antioksidan düzeyleri olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar, alıç ekstresinin bakterisit etkilerinin olduğunu göstermiştir. *C. orientalis* ekstresinin ratlarda periodontal enflamasyon ve alveolar kemik kaybı üzerinde inhibitör etki gösterdiği ortaya konulmuştur. *Creategus monogyna* subspp. *monogyna* ise sedatif, tansiyon düşürücü, diüretik, müshil olarak halk tıbbında kullanılmaktadır. Ayrıca antitümoral etkinliği de ortaya konulmuştur [37,38].

Centaurea L., Asteraceae familyasında 500 ila 600 tür arasında en geniş cinslerden biridir. *Centaurea* türleri halk tıbbında antikanser, antimikrobiyal, uyarıcı, tonik, antidiyabetik, diüretik ve antiromatizmal özelliklerinden ötürü kullanılmaktadır. *Centaurea*'da tanımlanan en önemli bileşikler seskiterpen laktonlar, flavonoidler, lignanlar ve alkaloidlerdir. *C. behen* geleneksel olarak sarılık, kistik fibrozis, mide problemleri ve menstruasyonun başlaması için kullanılmaktadır [39]. *Centaurea kilaea* Boiss. Türkiye'de yetişen *Centaurea* cinsinin 205

taksonundan biri olup endemik bir türdür. Geleneksel tıpta, *Centaurea* türleri ateş, menstrual bozukluklar, vajinal kandidiyaz, karaciğer, böbrek ve ülser gibi mide hastalıkları, tonik, iştah açıcı, antidiyabetik, antipiretik, aynı zamanda diüretik ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadırlar. *Centaurea* türlerinin flavonoidler ve seskiterpen laktonlar açısından zengin olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda, *Centaurea* türlerinin antiproliferatif aktivitesi üzerine çalışmalar sıklıkla yapılmaktadır. Farklı *Centaurea* türleri üzerinde yapılan önceki antiproliferatif aktivite çalışmalarında, flavonoidler ve terpenoidler açısından zengin olan bu türlerin kloroform ekstrelerinin genel olarak antikanser aktivitelerinin olduğu bulunmuştur. *C. kilaea*'nin antitümoral aktivitesi daha önce yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [40,41]. *Centaurea hermannii*, Türkiye ve Bulgaristan için endemik olup Türkiye'de sadece Çatalca Yarımadası ve Ömerli havzasında bulunmaktadır [42]. *C. hermannii* bitkisinin diğer *Centaurea* türleri gibi seskiterpen laktonlar açısından zengin olduğu ortaya konulmuş olup biyolojik aktivitesine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİLERİN ELDESİ VE EKSTRELERİN HAZIRLANMASI

Bu tezde çalışılan bitkilerin toplanması, metanolik ekstrelerinin hazırlanması İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalında gerçekleştirilmiş olup, ekstreler Doç.Dr. Çağlayan GÜRER'den temin edilmiştir.

Kurutulmuş bitki materyalleri (*Crataegus orientalis* Pall. ex M.Bieb., *Centaurea kilaea* Boiss., *Centaurea hermannii* F.Herm., *Crataegus monogyna* Jacq.subsp. *monogyna, Kitaibelia balansae* Boiss., *Plantago lanceolata* L., *Centaurea behen* L.*)* oda sıcaklığında metanol (% 95) ile perkole edildi. Metanol ekstreleri 40 ile 50 ºC'de kuruyana kadar döner evaporatörde bekletildi. Daha sonra metanol ekstreleri 72 saat -80 ºC'de bekletilip donduruldu ve bu süre sonunda liyofilizasyon ile çözücü olan metanol uçurularak kuru ekstreler haline getirildi. Toplam ekstre miktarları hassas terazide tartılarak belirlendi ve her biri ayrı bir deney tüpüne aktarılıp karanlıkta +4 ºC'de muhafaza edildi.

Tüm ekstrelerin stok konsantrasyonları 10 mg/mL olacak şekilde vorteks ve ultrasonikatör ile su içinde tam olarak çözünmeleri sağlandı. Ana stoklar 45 µm çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Hazırlanan ekstre ana stokları (10 mg/mL) Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ve Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) besiyerleri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve kültür ortamlarına aktarıldı.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI

Bu tez çalışmasında, normal transforme hücre hattı olan Vero [Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı] ve kanser hücre hatları olan; HeLa (insan serviks kanseri epitel hücre hattı), A549 (insan akciğer kanseri epitel hücre hattı), PC-3 (insan prostat kanseri epitel hücre hattı) ve Mcf-7 (insan meme kanseri epitel hücre hattı) kullanılmıştır.

Tam tabaka oluşturmuş Vero, HeLa, A549, PC-3 ve Mcf-7 hücrelerinin yeni kültür ortamlarına aktarılmaları için, öncelikle hücreler Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile üç kez yıkandı ve Tripsin/EDTA enzim çözeltisi (kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS içerisinde hazırlanmış % 0.1 Tripsin ve % 0.04 EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik asit çözeltisi)) ile 5-10 dakika süreyle 37 ºC'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine antibiyotik-antimikotik karışımı [penisilin (100 U/mL); streptomisin (100 µg/mL); amphoterisin B (0.25 µg/mL)] ve % 10 fetal bovine serum (FBS) içeren taze EMEM (Vero ve HeLa hücre hatları için) / RPMI 1640 besiyeri (A549, PC-3 ve Mcf-7 hücre hatları için) eklendi. Hücreler 1000 devir/dakikada, 5 dakika süreyle santrifüj edilerek toplandılar ve daha sonra taze EMEM/RPMI1640 ile yeniden süspanse edildiler. Hücreler hemositometrede sayılarak, yaklaşık $1x10^5$ hücre/mL olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarıldılar. Daha sonra kültür kapları % 90'dan fazla bağıl nem ve % 5 CO_2 sağlayan 37 ºC'lik etüve (Heraus B-5060 EK/CO_2) kaldırıldılar. Aynı işlemler haftada iki kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlanmıştır. Kontaminasyon risklerine karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak saklanmışlardır. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüjlenerek toplandılar. % 45 FBS, % 10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve % 45 EMEM/RPMI 1640 içeren saklama ortamında yaklaşık $1x10^7$ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları dondurulduldular ve - 80 ºC ile -196 ºC'de muhafaza edildiler.

3.3. BİTKİ EKSTRELERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMALARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Kimyasal ve biyolojik maddeler ya da fiziksel etkenler, hücreleri değişik derecelerde etkileyerek sitotoksisiteye yol açabilmektedirler. Bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da toksik olmayan etkisinin belirlenmesi gereklidir. *İn vitro* sitotoksisite testleri, ilaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm yöntemleridir. Bu testlerle çok sayıda maddenin kısa sürede analiz edilmesi mümkün olmakta ve yapılacak hayvan denemeleri için temel veriler elde edilebilmektedir. Sitotoksisite, incelenen maddenin konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik bir maddeye maruz kalınca apoptoz, otofaji ve nekroz

gibi olaylar sonucu ölebilmekte ya da sitostazis nedeniyle çoğalma (proliferasyon) özelliklerini kaybedebilmektedirler [43].

Sitotoksisite belirlemede kullanılan en yaygın metodlar genel olarak **kolorimetrik** (3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid; MTT testi, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum; MTS testi, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid; XTT testi ve 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum; WST testi gibi), **lüminesans** (Alamar mavisi testi, ATP biyolüminesans testi) ve **enzimatik** (Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi testi) yöntemlerdir (60). Bu tez çalışmasında sitotoksisite analizi için Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi (MTT) yöntemi ve xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) Sistemi kullanılarak ekstrelerin *in vitro* antikanser aktivite potansiyelleri ortaya konulmuştur.

3.3.1. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi

Deney gruplarının çoğalma hızları ve canlılıkları, hücre canlılığını tayin eden MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] yöntemi [44] ile belirlenmiştir. Bu yöntem, canlı hücrelerin MTT'yi mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile suda çözünmeyen mavi formazan kristallerine çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO ile çözündürülerek canlılıkla doğru orantılı olarak oluşan rengin spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçümü temeline dayanmaktadır.

Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1{,}5x10^5$ hücre/mL'lik hücre (Vero, A549, PC-3, Mcf-7 ve HeLa) stoğundan 200 µL/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara ön denemeler sonucunda belirlenen 5 farklı konsantrasyonda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik inkübasyonundan sonra kuyulardaki MEM/RPMI 1640 besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara (30 µL/kuyu) MTT (DPBS içinde hazırlanmış 5 mg/mL'lik stok) eklendi ve 3-4 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda her kuyuya 150 µL DMSO eklendi ve kültür kapları 20 dakika oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için karıştırıldı. Daha sonra oluşan renk 540 nm dalga boyunda BioTek Eon spektrofotometrede Gen5V2.04 yazılımı ile ölçüldü. Absorbsiyon değerlerinden kontrole göre karşılaştırılarak %

cinsinden hücrelerin canlılığı aşağıdaki formüllere göre hesaplanarak belirlenmiştir. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

% Canlılık = (Örnek absorbansı / Kontrol absorbansı) x 100

% İnhibisyon = (1- Örnek absorbansı / Kontrol absorbansı) x 100

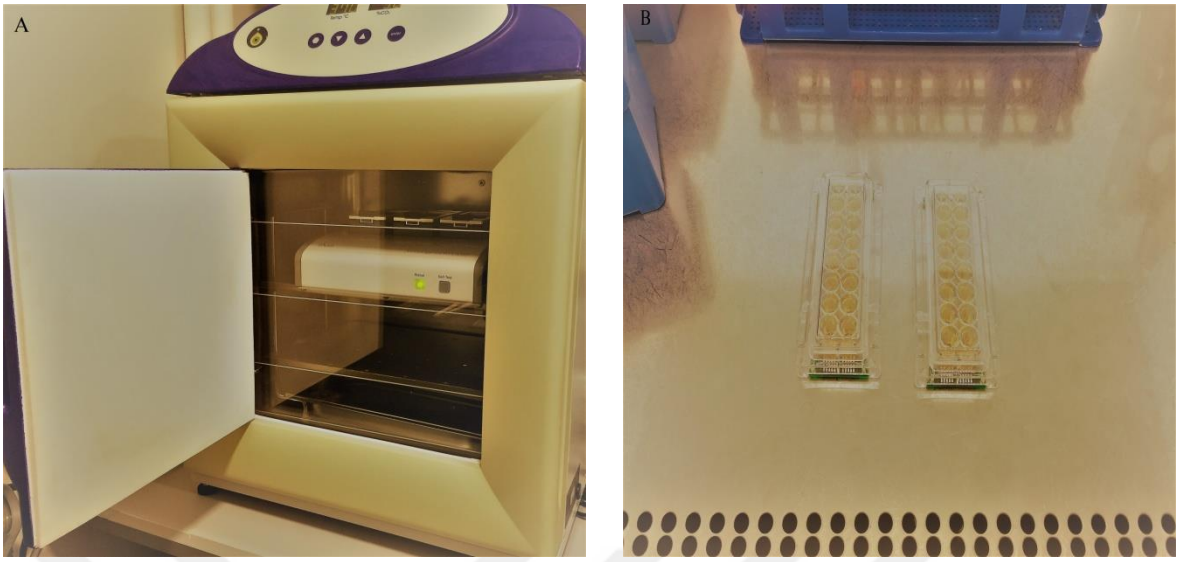
3.3.2. Sitotoksisitenin Morfolojik olarak Değerlendirilmesi

Centaurea hermannii ekstresinin ve kemoterapötik ajan Doxorubicin'in çeşitli konsantrasyonları uygulanan HeLa ve Vero hücrelerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişiklikler 24 ve 48 saat sonunda Nikon Eclipse Ti-E invert mikroskobu aracılığıyla X10 (ölçek uzunluğu 100 µm) büyütmede incelenerek konsantrasyon ve zamana bağlı genel morfolojik değişiklikler belirlenmiştir.

Bu amaçla, 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1,5x10^5$ hücre/mL'lik hücre (Vero ve HeLa) stoğundan 200 µL/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara farklı konsantrasyonda ekstre/ilaç içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 24 ve 48 saatlik inkübasyonundan sonra kuyulardaki MEM/RPMI 1640 besiyerleri uzaklaştırıldı ve X10 büyütmede incelerenerek görüntüler alındı.

3.3.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi

Kültüre hücrelerdeki çoğalma ve ölümleri, gerçek zamanlı ve devamlı bir şekilde, hücrelerin elektrik akımına karşı gösterdikleri direncin belirlenmesi xCELLigence RTCA DP sistemi ile mümkündür. Bu sistemin temel prensibi, alt yüzeyinde altın elektrotlar bulunan E-plate yüzeyine yapışan hücre miktarının artması ile akıma karşı oluşan direncin artması ve yüzeye yapışan hücre miktarının azalması ile de direncin azalmasına dayanmaktadır. xCELLigence RTCA DP sistemi aracılığı ile hücre çoğalması ve hücre ölümü gerçek zamanlı ve sürekli olarak kaydedilebilmekte ve kaydedilen veriler grafikler halinde bilgisayar ekranına aktarılmaktadır [45].



Şekil 3.1: A) xCELLigence RTCA DP cihazı (Acea Biosciences), B) E-plate 16 kuyucuklu (Acea Biosciences).

Potansiyel antikanser aktiviteye sahip *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin ve kemoterapötik ajan Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini doğrulamak amacıyla xCELLigence RTCA DP sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi xCELLigence RTCA DP (Acea Biosciences) kullanılarak elde edilecek hücre indeksi parametrelerinin değerlendirilebilmesi için 16 kuyucuklu E-Plate (Acea Biosciences) kullanıldı. Öncelikle E-Plate'in her bir kuyucuğuna 100 µL besiyeri eklendi ve xCELLigence RTCA-DP cihazında arka plan ölçümleri yapıldı. Daha sonra Vero ve HeLa hücreleri için 100 µL besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim işleminin ardından E-Plate'ler 20 dakika boyunca steril çalışma kabini içerisinde oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından xCELLigence RTCA-DP cihazına yerleştirilerek 37 ^{o}C ve % 5 CO_2 ortam koşullarında inkübasyon devam ettirildi. E-Plate'lere hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra cihaza her 15 dakikada bir ölçüm alması için komut verildi. Hücre ekiminden yaklaşık 20 saat sonra hücrelerin çoğalma fazının 1/3'lük diliminde E-Plate'lerdeki besiyeri üzerine 100 µL farklı konsantrasyonlardaki *Centaurea hermannii* bitki ekstresi ve Doxorubicin ilacı eklendi. Kontrol gruplarına 100 µL EMEM/RPMI 1640 besiyeri eklendi. 72 saat boyunca 15 dakikalık aralıklarla ölçüm alınmaya devam edildi. Konsantrasyona ve zamana bağlı hücre indeksi değerlerine ait grafikler RTCA Software 2.0 ile çizildi.

3.4. APOPTOZUN FARKLI YÖNTEMLERLE TAYİNİ

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn: aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. Apoptozun belirlenmesine yönelik geliştirilen yöntemler genel olarak morfolojik görüntüleme yöntemleri, immünohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleri olarak sıralanmaktadır [26]. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan farklı yöntemlerden 3'ü bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Kullanılan yöntemlerle apoptoz biyokimyasal (flowsitometri), florometrik (kaspaz3,7 ve 9 aktivasyonu) ve moleküler (qRT-PCR) olarak değerlendirilmiştir.

3.4.1. Apoptozun Flow sitometri (Hücre Akış Ölçer) İle Tayini

Apoptoz, evrimsel olarak korunmuş, genetik olarak kontrol edilen, hücrelerin kendisini öldürmeye karar verdiği ve bunun için çok sayıda yeni protein sentezlerine yöneldiği aktif ve dinamik bir olaydır. Fosfolipidler, fosfotidilkolin ile birlikte, plazma membranının iç ve dış kısmında asimetrik olarak yerleşmektedir. Apoptoza giden hücrelerde plazma membranındaki fosfolipid asimetrisi kaybolmaktadır. Plazma membranın iç yüzeyinde bulunan fosfotidilserin dış yüzeye çıkmaktadır. Bu olay hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken aşamalarında görülmektedir. Fosfotidilserinlerin ortaya çıkması ölmekte olan hücrelerin tespitinde güçlü bir işaret olarak kabul edilmektedir [46]. Annexin V (35 kDa hücreiçi proteini), kalsiyum varlığında fosfotidilserine seçici olarak güçlü bir şekilde bağlanır. Floresan (FITC) işaretli Annexin V ile apoptoza giden hücrelerin sayısını flow sitometri analizi ile tespit etmek mümkündür. Propidyum iyodür (PI) boyası ise ölü hücrelerin plazma membranından geçerek kromozomal DNA'ya bağlanabilme özelliğinde olup geç apoptotik ve ölü hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidiyum iyodür (kırmızı floresan) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin vermektedir [47].

Şekil 3.2: Flowsitometre sistemi (BD FACSCalibur™ Flow Cytometry).

Centaurea hermannii ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik aktivitesinin tayini ApoFlowEX® FITC kit (EXBIO Diagnostics) kullanılarak yapılmıştır. 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3,3x10^5 hücre/kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara farklı konsantrasyonda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik 37 ºC ve % 5 CO_2 ortam koşullarındaki inkübasyonundan sonra kuyulardaki ekstreli ve esktresiz besiyerleri deney tüplerine alındı. Kuyular 2 mL PBS ile yıkandıktan sonra kuyulardaki PBS aynı deney tüplerine aktarıldı. Ardından her kuyuya 500 µL tripsin/EDTA enzim çözeltisi ile 5-10 dakika süreyle 37 ºC'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Kuyulardaki hücre+tripsin+besiyeri karışımı aynı deney tüplerine aktarıldı. Hücreler 380x g'de 5 dakika santrafüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet soğuk PBS ile nazikçe karıştırılarak resüspanse edildi. Ardından tekrar 380x g'de 5 dakika santrafüj edildi. Pellet 1 mL 1X Annexin V bağlama tamponu ile resüspanse edildi. Hücre miktarı 5x10^5 hücre/mL olacak şekilde sayılarak ayarlandı. 100 µL hücre süspansiyonu üzerine 5 µL Annexin V FITC ve 5 µL Propidiyum iyodür eklendi ve nazikçe karıştırıldı. Hücreler 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 380x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 300 µL 1X Annexin V Bağlama tamponu içinde resüspanse

edildi ve hemen ardından flow sitometre cihazında (BD FACSCalibur™ Flow Cytometry) ölçüm yapıldı. Ölçümler önce canlı, Annexin V ile boyalı canlı ve PI ile boyalı ölü hücreler sonra kontrol ve deney grupları okutularak yapıldı (mavi lazer eksitasyon 488 nm'de, ışık emisyonu 525 nm'de (FITC) ve 617 nm'de Propidiyum iyodür). Elde edilen sonuçlar FlowJo yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.4.2. Kaspaz 3,7 ve Kaspaz 9 Aktivitesinin Spektroflorometre İle Tayini

Kaspaz aktivasyonu, apoptozun en önemli ayırıcı özelliklerindendir. Hücre ölümünde geri dönülmez bir nokta olarak kabul edilmektedir. Bu olayı tespit etmek için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Kaspaz floresan substratlarının kullanıldığı yöntemlerde kullanılan peptid substratlar renksizdir. Kaspaz etkinliği sonrası bu renksiz substratlar floresan ürünler haline dönüşmektedir. Kaspazların aktivasyonu FLICA (fluoro chrome labelled inhibtors of caspases)'ların kullanılmasıyla da gösterilebilmektedir. FLICA'lar kaspazların aktif enzim merkezlerinin ligandlarına benzer olarak tasarlanmışlardır. Bütünlüğü bozulmamış plazma membranından geçebilmeleri, aktif kaspazlara kovalent olarak bağlanabilmeleri nedeniyle canlı hücreler içerisindeki aktif kaspazlar değerlendirilebilmektedir [46].

Centaurea hermannii ekstresinin HeLa hücrelerindeki kaspaz 3,7 ve kaspaz 9'un aktivasyonuna etkisi MILLIPORE CaspaTag™ Caspase-3,7 *In Situ* Assay Kit, Fluorescein (LOT: LV1473068A) ve MILLIPORE CaspaTag™ Caspase-9 *In Situ* Assay Kit (LOT: PSO1538916) kitleri kullanılarak belirlenmiştir. 25 cm^2'lik kültür kaplarına $1x10^6$ hücre/mL olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kültür ortamlarına farklı konsantrasyonda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik inkübasyonundan sonra kaspaz 3,7 ve kaspaz 9 aktivasyonu tayini için ortak olan protokol aşağıdaki gibi uygulanmıştır. İndüklenmiş ve indüklenmemiş hücrelerin hepsi $1x10^7$ hücre/mL olacak şekilde konsantre edildi. 290 µL hücre steril deney tüpüne aktarıldı. Hücrelere taze hazırlanmış kaspaz 3,7 ve kaspaz 9'un 30X FLICA ajanlarından 10 µL eklendi ve tüpler hafifçe sallandı. Deney tüpleri 1 saat karanlıkta 37 ^oC ve % 5 CO_2 ortam koşullarında inkübe edildi. Bu süre içerisinde 2 defa hücreler karıştırıldı. 1X yıkama tamponundan 2 mL tüpe eklendi ve karıştırıldı. 380x g'de 5 dakika oda sıcaklığında hücreler santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet nazikçe vortekslendi. Yıkama işlemi bu defa 1X yıkama tamponundan 1mL kullanılarak tekrar edildi

ve 380x g'de 5 dakika oda sıcaklığında hücreler santrifüjlendi. Daha sonra hücreler 400 µL PBS ile resüspanse edildi. Siyah mikrotitre plate'e her hücreden 100'er µL yüklendi. Spektroflorometre eksitasyon dalga boyu 490 nm ve emisyon dalga boyu 520 nm olarak ayarlanıp son nokta (end point) okuma yapıldı. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Apoptozun Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemi ile Tayini

Gerçek zamanlı PCR teknolojisi, DNA ya da mRNA örneklerinin çoğaltılmasını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Floresan ışıma tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanıma girmesi ile birlikte bilinen PCR geliştirilerek oluşturulan teknik, gen anlatım çalışmalarının hızına ivme kazandırmıştır. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı ve floresanın, oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) olarak da isimlendirilmektedir. qRT-PCR'ın kullanım alanlarından bazıları patojen tespiti, onkolojik çalışmalar, genetiği değiştirilmiş organizmalar, doğum öncesi tanı çalışmaları olarak sıralanabilmektedir [48].

Centaurea hermannii ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik aktivitesinin flowsitometri ve kaspaz aktivitesi yöntemleri ile belirlenmesinden sonra bu bitki ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptoz, nekroz ve otofajiye özgü genlerin anlatım seviyelerini belirlemek amacıyla qRT-PCR analizi yapılmıştır.

3.4.3.1. Total RNA İzolasyonu

Jena Bioscience firmasının (Cat no: PP-210S) Total RNA Saflaştırma Kiti kullanılarak Total RNA izolasyonu protokolü uygulanmıştır. Bu protokol doğrultusunda, 6 kuyucuklu kültür kaplarına $3{,}3x10^5$ hücre/ kuyu olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 24 saat süreyle karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon periyodundan sonra ortamdan besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyulara farklı konsantrasyonda ekstre içeren ve içermeyen (kontrol) besiyerleri eklendi. Kültür kaplarının etüvde 48 saatlik 37 ^oC ve % 5 CO_2 ortam koşullarındaki inkübasyonundan sonra kuyulardaki ekstreli ve esktresiz besiyerleri deney tüplerine alındı. Kuyular 2 mL PBS ile yıkandıktan sonra kuyulardaki PBS aynı deney

tüplerine aktarıldı. Ardından her kuyuya 500 µL tripsin/EDTA enzim çözeltisi eklendi ve 5-10 dakika süreyle 37 ºC'de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Kuyulardaki hücre+tripsin+besiyeri karışımı aynı deney tüplerine aktarıldı. Hücreler 400x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellete 500 µL lizis tamponu eklendi. Pellet tamamen tampon içinde dağılana kadar vortekslendi. Tüm örnekler steril santrifüj tüplerine alındı ve bu işlem buz üzerinde gerçekleştirildi. Kolonlara (Spin Coloum) 100 µL aktivasyon tamponu eklendi ve 10.000x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Steril santrifüj tüplerine aktarılmış buzda bekletilen örneklerin üzerine 300 µL izopropanol eklendi ve 10 saniye kadar vortekslendi. Bu örneklerin tamamı kolonlara aktarıldı ve 10.000x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolonların alt tarafına geçen sıvı atıldı ve 700 µL etanol eklenmiş ilk yıkama tamponundan kolonlara eklendi ve 10.000x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolonların alt tarafına geçen sıvı atıldı ve 700 µL ikinci yıkama tamponundan kolonlara eklendi ve 10000x g'de 60 saniye santrifüj edildi. Kolonların alt tarafına geçen sıvı atıldı ve ardından etanolü uzaklaştırmak amaçlı kolonlar 10.000x g'de 2 dakika santrifüj edildiler. Kolonlar yeni bir DNaz/RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine alındılar ve kolon membranının tam ortasına 40 µL elüsyon tamponu eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 10.000x g'de 60 saniye santrifüj edildi. RNA'lar mikrosantrifüj tüplerine toplandığı için kolonlar atıldılar. Total RNA miktarı nano drop (NANODROP 2000, Thermo SCIENTIFIC) cihazında NANODROP 2000/2000c yazılımı kullanılarak ölçüldü.

3.4.3.2. Total RNA'lardan c-DNA Sentezi

Total RNA eldesinden sonra Jena Bioscience firmasının (Cat no: PCR511) script cDNA sentez kiti kullanılarak c-DNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. c-DNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 300 ng/ µL olacak şekilde eşitlendi. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Enzim eklemeden önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı. Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad Termal Cycler cihazına konularak c-DNA reaksiyonu sırasıyla 50 ºC'de 60 dakika, 42 ºC'de 10 dakika ve 70 ºC'de 10 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi. Reaksiyonun sona ermesi ile elde edilen c-DNA Real Time PCR işlemi için RNaz içermeyen su içerisinde -20 ºC'de muhafaza edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: c-DNA sentezinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

BİLEŞENLER	HER BİR ÖRNEK İÇİN HACİM
RNA örneği	2 µL
RNAz içermeyen su	10,5 µL
Script RT tamponu	4 µL
dNTP karışımı	1 µL
Oligo dT Primer	0,5 µL
DTT (dithiothreitol)	1 µL
RNAz inhibitörü	0,5 µL
Enzim	0,5 µL

3.4.3.3. qRT-PCR Uygulaması

Jena Bioscience firmasının (Cat no: PCR-369) qPCR GreenMaster with UNG Master Mix'i kullanılarak Real time PCR gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. Toplam hacim 20 µL olacak şekilde 6,8 µL PCR grade su, 10 µL Real Time Master Mix, 0,6 µL Forward primer, 0,6 µL Reverse primer (Tablo 3.2) ve 2 µL c-DNA örneği eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Daha sonra 96 kuyucuklu plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına (Şekil 3.3) konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

50 ºC'de → 2 dakika
95 ºC'de → 2 dakika
95 ºC'de → 15 saniye
60 ºC'de → 45 saniye
72 ºC'de → 30 saniye
} 45 siklus

Housekeeping genler olarak *ACTB* ve *GAPDH* genleri kullanıldı. Kat değişimi (Fold change; FC) değeri cihazdan alınan Ct değerleri kullanılarak $2^{\Delta\Delta}Ct$ ($^{\Delta\Delta}Ct$ = Örnek $^{\Delta}Ct$ – Kontrol $^{\Delta}Ct$) yöntemi [49] kullanılarak üç bağımsız deneyin ortalaması olarak hesaplandı.

Şekil 3.3: Biorad CFX Connect qRT-PCR cihazı.

Tablo 3.2: qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri.

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ
FAS Forward	AATGCACACTCACCAGCAAC
FAS Reverse	CTGTGCTTTCTGCATGTTTTCTG
HRK Forward	AGGCGGAACTTGTAGGAACG
HRK Reverse	TTTCTACGATCGCTCCAGGC
TNFSRF10A Forward	GCCCTTTGGGAGAGTTGTGT
TNFRSF10A Reverse	GTGGTGCAGGGACTTCTCTC
TNFRSF10B Forward	GCACCAGGTGTGATTCAGGT
TNFRSF10B Reverse	ATGATGCCTGATTCTTTGTGGAC
PARP1 Forward	GGTGGATGGGTTCTCTGAGC
PARP1 Reverse	ACCCCTTGCACGTACTTCTG
RIPK Forward	CGTGGCGTCACAAGCTACTAT
RIPK Reverse	GAGACACCTTCCCAAAGCCT
MLKL Forward	GCCTGTTTCACCCATAAGCC
MLKL Reverse	TTCCCAGAGGACGATTCCAAAG
ATG3 Forward	GGCATACCTACCAACAGGCA
ATG3 Reverse	ATCTACCCATCCGCCATCAC
ATG5 Forward	ACTCTGGATGGGATTGCAAAATG
ATG5 Reverse	GTGTGTGCAACTGTCCATCTG
BECN Forward	TCCGGGCTCCCGAGG
BECN Reverse	TCTGCGAGAGACACCATCCT

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Deneylere ait tüm sayısal veriler kontrole ve birbirlerine göre istatistiksel olarak GraphPad Prism yazılım programı (GraphPad Prism version 7.0, GraphPad Software, San Diego California USA, Anonim-c) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla elde edilen verilere tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Grupların kontrol grubuna göre anlamlılıkları Dunnett's testi ile değerlendirildi. $p<0,05$ seviyesi anlamlılık değeri olarak temel alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 7 farklı metanolik bitki ekstresi ve klinik kullanımı olan kemoterapötik bir ajan olarak Doxorubicin kullanılmıştır. İlk olarak tüm bitki ekstrelerinin potansiyel antikanser aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ekstrelerin sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri ortaya konulmuştur. Ardından antikanser aktivite potansiyeline sahip olan bitki ekstresinin seçicilik indeksi kemoterapötik ajan olan Doxorubicin'in seçicilik indeksi ile karşılaştırılmıştır. Verilerin doğruluğunu kontrol etmek için MTT yönteminden elde edilen veriler ile xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz'inden elde edilen veriler karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak, sitotoksisite invert mikroskop kullanılarak morfolojik olarak da ortaya konulmuştur. Potansiyel antikanser aktiviteye sahip bitki ekstresinin apoptotik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla flowsitometri, kaspaz aktivitesi ve gen ekspresyon analizleri yapılmıştır.

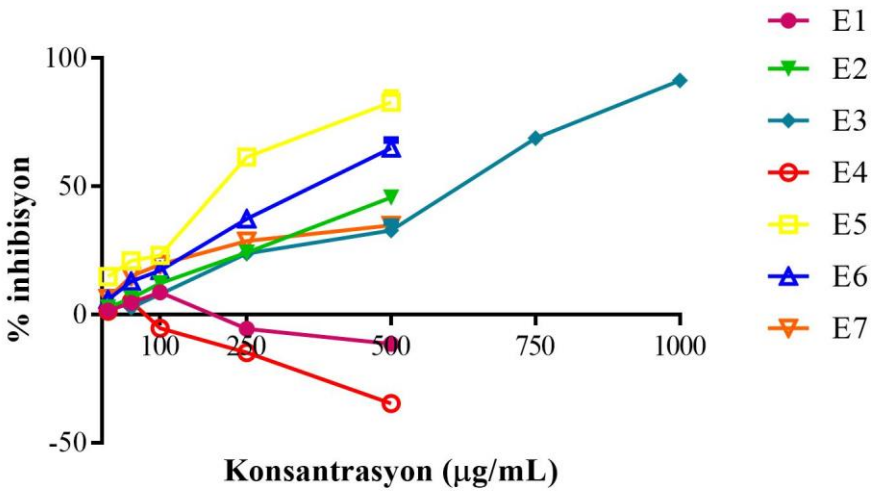
4.1. BİTKİ EKSTRELERİNİN SAĞLIKLI VE KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

4.1.1. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi

Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi yöntemi ile ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyon değerlerine göre 7 metanolik bitki ekstresinin Vero, HeLa, A549, PC-3 ve Mcf-7 hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerleri ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar % inhibisyon değeri olarak Tablo 4.1'de ve Şekil 4.1'de yer almaktadır.

Tablo 4.1: Ekstrelerin Vero hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri.

Vero	**Bitki ismi**	**% İnhibisyon± SD**				
		500 µg/mL	**250 µg/mL**	**100 µg/mL**	**50 µg/mL**	**10 µg/mL**
E5	*Kitaibelia balansae* (Endemik)	83,8±4,4	61,4±0,1	23,3±1	21,2±1,2	14,7±0,4
E6	*Plantago lanceolata*	65,9±3,8	37,7±1,7	17,7±2,2	13,2±1,2	6,1±0,9
E2	*Centaurea kilaea* (Endemik)	45,7±0,4	24,3±0,3	12,6±0,2	6,4±0,5	2,6±0,5
E7	*Centaurea behen*	34,5±1,3	28,4±1,5	19,6±0	14,7±1	6±1,1
E1	*Crataegus orientalis*	-11,8±1,9	-6,3±3,3	8,2±1,9	4,7±0,9	1,4±0,3
E4	*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna*	-34,4±0,9	-15,3±1,9	-5,1±1	4,8±0,7	1,2±0,2
E3	*Centaurea hermannii* (Endemik)	**1000 µg/mL**	**750 µg/mL**	**500 µg/mL**	**250 µg/mL**	**50 µg/mL**
		88,5±4,2	66,8±3	33,1±3	23,9±1	3,2±0,6

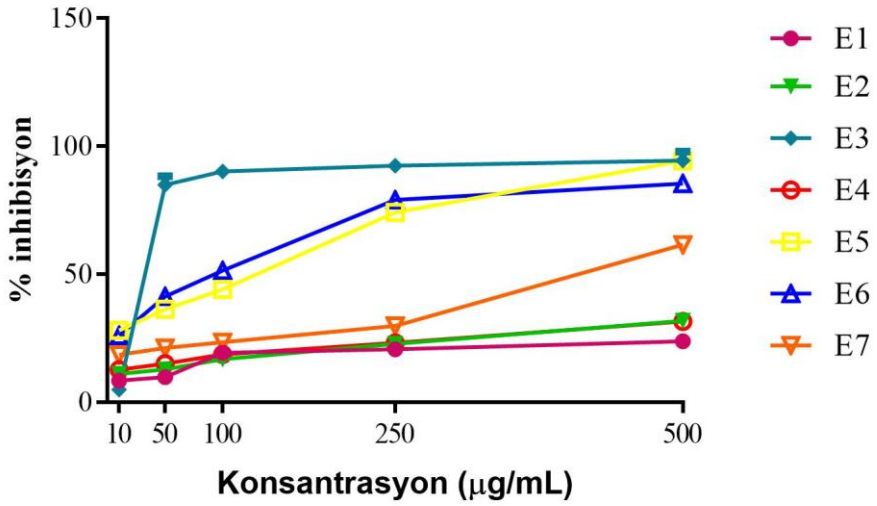


Şekil 4.1: Ekstrelerin Vero hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

Ekstrelerin Vero sağlıklı hücre hattı için Tablo 4.1'de % inhibisyon değerleri yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde verilmiştir. Sadece E3 ekstresinin düşük inhibisyon değerleri sebebiyle 500 µg/mL'nin üzerindeki iki konsantrasyonu da denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E1 ve E4 ekstreleri konsantrasyon ile ters orantılı olarak mitotik etki göstermektedir. E2, E3 ve E7 ekstreleri, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri (Hücrelerin % 50'sinin ölümüne neden olan µg/mL cinsinden ekstre konsantrasyonu) 500 µg/mL'nin üzerindedir. E5 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak yüksek toksisite profilini ortaya koymaktadır. E6 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 250 µg/mL'nin üzerindedir.

Tablo 4.2: Ekstrelerin HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri.

HeLa	Bitki ismi	% İnhibisyon ± SD				
		500 µg/mL	250 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
E5	*Kitaibelia balansae* (Endemik)	94,3±1	74,2±1,1	44±2,8	36,4±2,1	28±1,3
E3	*Centaurea hermannii* (Endemik)	92,5±4,3	90,8±2,9	89,3±2,2	84,8±2,4	6,8±3,5
E6	*Plantago lanceolata*	85,5±2,3	79,1±0,3	59,7±0,8	50,3±0,8	30,1±0,2
E7	*Centaurea behen*	61,6±2,4	29,8±2	23,4±1,4	21,1±0,3	18,5±0,4
E2	*Centaurea kilaea* (Endemik)	31,8±1,8	22,8±0	16,9±0,6	12,9±0,9	11±0,3
E4	*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna*	31,5±0,8	23,2±0,6	18,7±0,3	15,1±0,8	12,7±0,4
E1	*Crataegus orientalis*	23,9±0,9	20,7±1,6	19,3±0,6	9,8±1,5	8,5±1,5

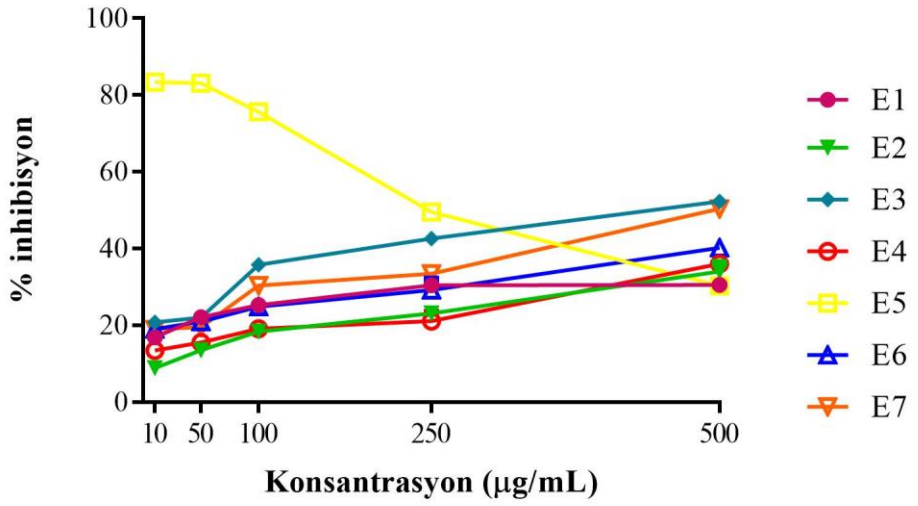


Şekil 4.2: Ekstrelerin HeLa hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

Ekstrelerin HeLa serviks kanser hücre hattı için Tablo 4.2'de % inhibisyon değerleri yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E1, E2 ve E4 ekstreleri 500 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonda bile oldukça düşük bir toksisite göstermekle birlikte E1 ve E4 ekstrelerinin Vero hücreleri üzerine mitotik etkisi yanında HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi anlamlı olarak değerlendirilmektedir. E3 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak oldukça yüksek sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 10 µg/mL'nin biraz üzerindedir. E5 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak yüksek sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 100 µg/mL'nin üzerindedir. E6 ekstresi, yüksek sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 100 µg/mL'dir. Son olarak E7 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 250 µg/mL'nin üzerindedir.

Tablo 4.3: Ekstrelerin A549 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri.

A549	**Bitki ismi**	**% İnhibisyon ± SD**				
		500 µg/mL	**250 µg/mL**	**100 µg/mL**	**50 µg/mL**	**10 µg/mL**
E5	*Kitaibelia balansae* (Endemik)	69,7±0,9	50,5±1,9	24,4±1,5	16,9±0,9	16,6±0,9
E3	*Centaurea hermannii* (Endemik)	52,2±0,9	42,6±1,8	35,8±1,3	22±1,4	20,8±0
E7	*Centaurea behen*	50,3±1,1	33,4±0,7	30,3±0,6	19,5±0,2	18,9±0,07
E6	*Plantago lanceolata*	40,1±0,4	29,2±2,7	24,8±0,09	20,9±0,9	19±0,9
E4	*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna*	36±0,01	20,4±1,2	20,1±0,4	17±0,6	15,6±1,6
E2	*Centaurea kilaea* (Endemik)	34±2,2	23,1±0,3	18,4±0	13,5±0,9	8,9±0,8
E1	*Crataegus orientalis*	30,5±0,4	30,4±0,5	25,3±1,5	22,1±0,6	16,8±0,9

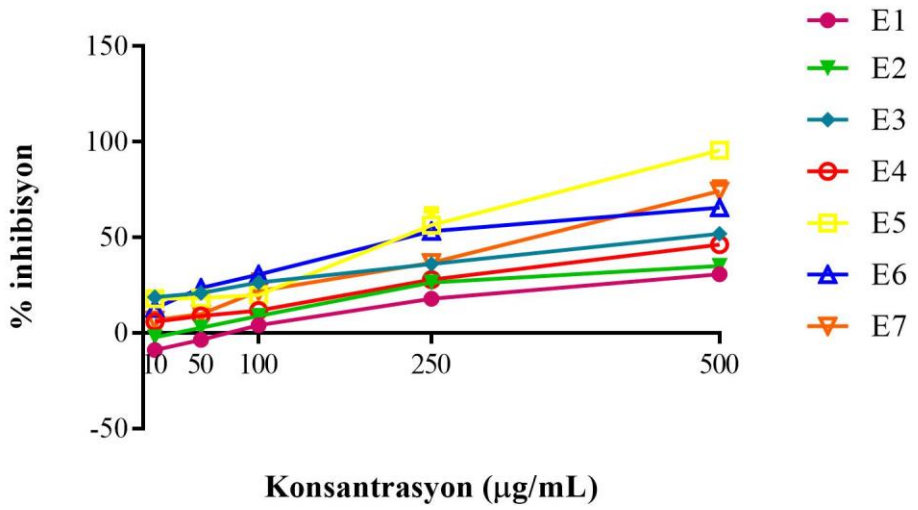


Şekil 4.3: Ekstrelerin A549 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

Ekstrelerin A549 akciğer kanser hücre hattı için Tablo 4.3'te % inhibisyon değerleri yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E1, E2, E4 ve E6 ekstrelerinin IC_{50} değerleri 500 µg/mL'nin üzerindedir ve düşük sitotoksisite profili göstermektedirler. E3 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri yaklaşık olarak 500 µg/mL' dir. E5 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 250 µg/mL'dir. E7 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 500 µg/mL'dir.

Tablo 4.4: Ekstrelerin Mcf-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri.

Mcf-7	Bitki ismi	% İnhibisyon ± SD				
		500 µg/mL	250 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
E5	*Kitaibelia balansae* (Endemik)	95,5±1,9	56,5±8,1	20±0,1	18,3±0,4	18±0,1
E7	*Centaurea behen*	74,3±4,2	36,7±1,1	21,9±7,8	9,9±0,2	6,7±0,7
E6	*Plantago lanceolata*	65,6±2,2	53,3±1,5	30,6±0,4	23,5±1,1	13±0,9
E3	*Centaurea hermannii* (Endemik)	51,9±0,2	36,2±2,8	26,4±1,6	21±1	18,8±0,1
E4	*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna*	46,3±3,7	27,8±8,1	11,7±0,9	9±0,6	5,9±0,4
E2	*Centaurea kilaea* (Endemik)	35,1±1,5	26,3±0,1	9±0,3	2,8±0,7	-2,3±0,3
E1	*Crataegus orientalis*	30,8±1,9	18±0,9	4,1±0,7	-3,5±0,8	-9±1,1

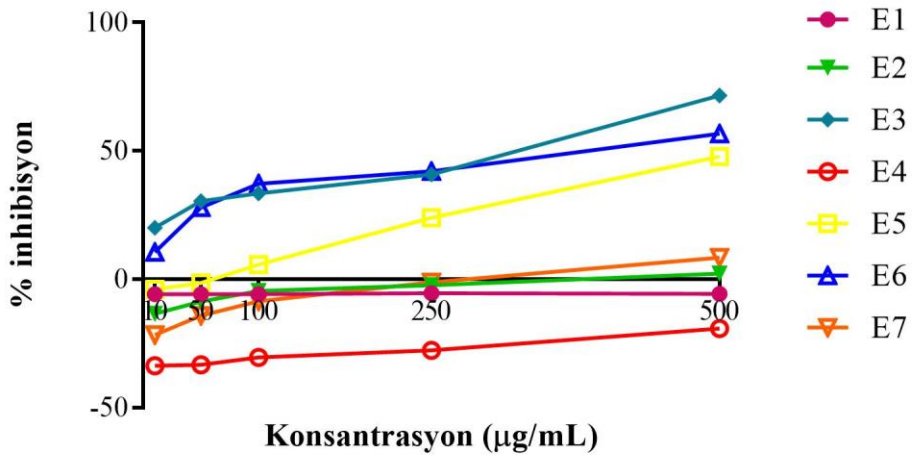


Şekil 4.4: Ekstrelerin Mcf-7 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

Ekstrelerin Mcf-7 meme kanser hücre hattı için Tablo 4.4'te % inhibisyon değerleri yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E1, E2 ve E4 ekstrelerinin IC_{50} değerleri 500 µg/mL'nin üzerindedir ve düşük toksisite profili göstermektedirler. E3 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri yaklaşık olarak 500 µg/mL' dir. E5 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri yaklaşık olarak 200 µg/mL'dir. E7 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 250 µg/mL'nin üzerindedir.

Tablo 4.5: Ekstrelerin PC-3 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin % inhibisyon değerleri.

PC-3	Bitki ismi	% İnhibisyon ± SD				
		500 µg/mL	250 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
E3	*Centaurea hermannii* (Endemik)	71,5±1,3	40,7±1,3	33,4±0,5	30,4±0,7	20,1±0,3
E6	*Plantago lanceolata*	56,6±0,2	42,1±0,1	37,1±1	27,9±0,6	10,6±0,8
E5	*Kitaibelia balansae* (Endemik)	47,8±0,2	23,9±0,9	5,7±0,1	-1,5±0,6	-3,9±0,4
E7	*Centaurea behen*	8,4±0,5	-1,2±0,3	-8,6±0,1	-14,2±0,3	-21,6±0,5
E2	*Centaurea kilaea* (Endemik)	2,1±0,3	-2,3±0,3	-4,6±0,7	-8,7±1,1	-13,4±0,4
E1	*Crataegus orientalis*	-5,7±0,4	-5,8±0	-5,8±0,7	-5,8±0,3	-5,8±0,1
E4	*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna*	-19,15±1,2	-27,7±0,9	-30,4±0,6	-33,3±0,6	-33,7±1



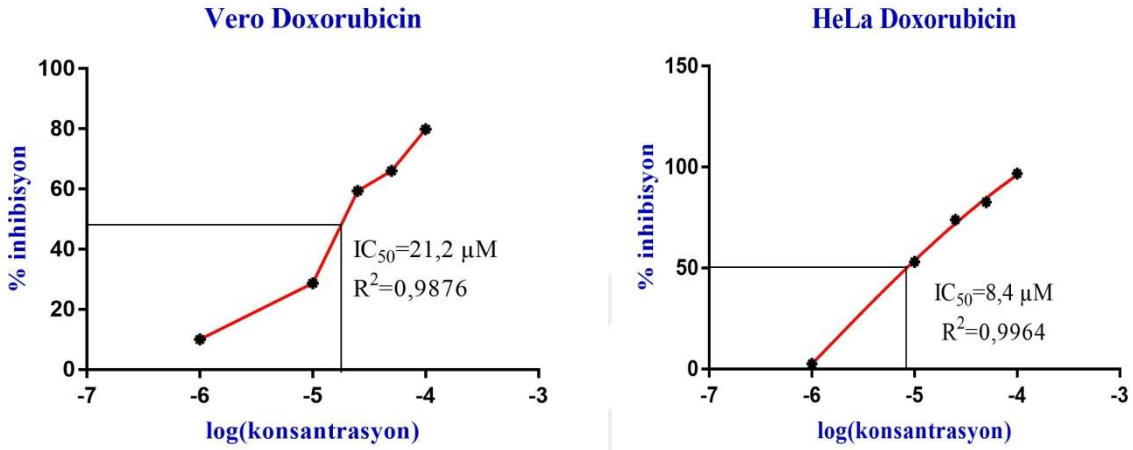
Şekil 4.5: Ekstrelerin PC-3 hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

Ekstrelerin PC-3 prostat kanser hücre hattı için Tablo 4.5'te % inhibisyon değerleri yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre E1, E2, E4 ve E7 ekstreleri konsantrasyonla doğru orantılı olarak mitotik etki göstermektedirler. E5 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak 100 µg/mL ve üzerinde sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 500 µg/mL'nin üzerindedir. E6 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri yaklaşık olarak 500 µg/mL'nın altındadır. E3 ekstresi, konsantrasyon ile doğru orantılı olarak sitotoksisite göstermiş olup IC_{50} değeri 250 µg/mL'nin üzerindedir.

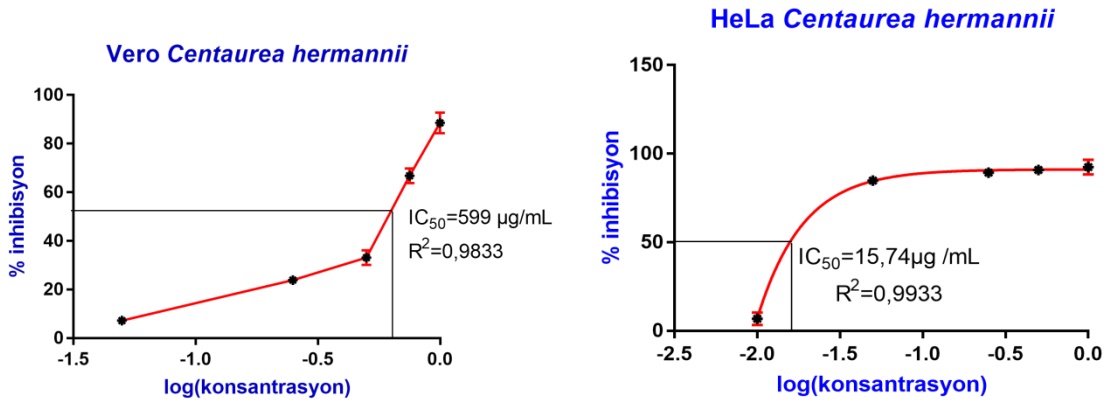
E1 ve E4 ekstreleri Vero hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda mitotik etki göstermekte ve konsantrasyon azaldıkça bu etki de azalmaktadır. Toksik etkileri 10 µg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda başlamaktadır. Bu iki ekstrenin IC_{50} değerleri HeLa, A549 ve Mcf-7 hücreleri için 500µg/mL'den daha yüksektir. Vero hücrelerindeki mitotik etkileri göz önüne alınınca kanser hücrelerindeki toksik etkileri anlamlı olmakla beraber 500 µg/mL gibi yüksek bir değer antikanser aktivite potansiyeli için arzu edilmemektedir. E6 (*Plantago lanceolata*) ekstresinin Vero hücreleri için IC_{50} değeri yaklaşık olarak 300 µg/mL iken HeLa hücreleri için 100 µg/mL'dir. E3 (*C. hermannii*) ekstresi HeLa hücrelerinden sonra en yüksek antikanser aktiviteyi PC-3, prostat kanser hücrelerinde göstermiştir.

MTT analizi ile 48. saate elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde E3 (*C. hermannii*) ekstresisinin sağlıklı hücre hattı Vero'daki düşük sitotoksisitesi ve serviks kanseri hücre hattı HeLa'daki seçici yüksek sitotoksisitesi ve PC-3 hücrelerindeki orta derecedeki sitotoksisitesi,

potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür taramalarından elde edilen sonuca göre HeLa hücrelerinde en yüksek antikanser aktiviteye sahip bu bitki türü Türkiye'ye endemik olup daha önce bu bitki ekstresinin biyolojik aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 4.6: Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücre hatları için IC_{50} değerleri.



Şekil 4.7: *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin Vero ve HeLa hücre hatları için IC_{50} değerleri.

Kemoterapötik ajan olan Doxorubicin'in ve *C. hermannii* bitki ekstresinin sitotoksik etkileri Vero ve HeLa hücre hatları üzerinde denenerek elde edilen verilerle IC_{50} ve SI değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri Vero hücre hattında *C. hermannii* için 599 µg/mL ve Doxorubicin için 21,2 µM, HeLa hücre hattında *C. hermannii* için 15,74 µg/mL ve Doxorubicin için 8,4 µM olarak bulunmuştur. SI değerleri ise sırasıyla *C. hermannii* için 38,1,

Doxorubicin için 2,5 olarak bulunmuştur. IC_{50} değerlerine göre hazırlanan grafikler Şekil 4.7'de gösterilmektedir. SI değerlerine göre hazırlanan sonuçlar ise Tablo 4.6'da verilmektedir.

Tablo 4.6: *C. hermannii* ve Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücreleri için MTT analizinden elde edilen IC_{50} ve SI değerleri.

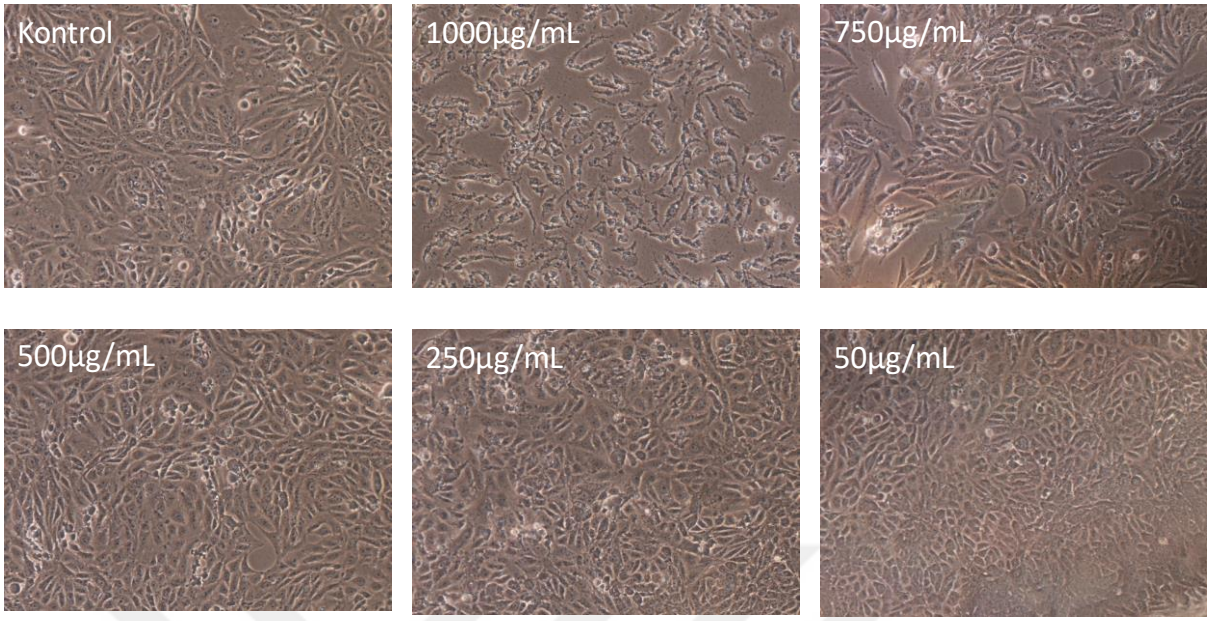
xCELLigence RTCA

Uygulanan ekstre ve ajan	**Vero IC_{50}**	**HeLa IC_{50}**	**SI***
Centaurea hermannii	557,8 µg/mL	18,3 µg/mL	30,5
Doxorubicin	19,2 µM	7,8 µM	2,5

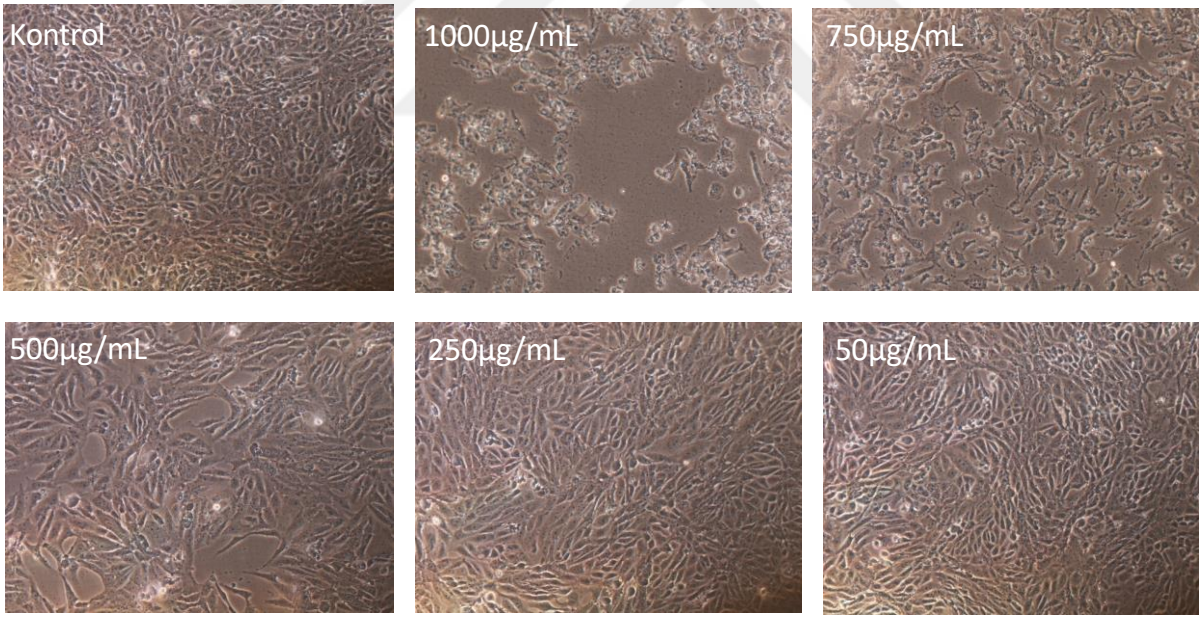
*SI=Vero IC_{50}/HeLa IC_{50}

4.1.2. Sitotoksisitenin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Centaurea hermannii bitki ekstresinin ve kemoterapötik ajan Doxorubicin'in MTT yöntemi ile belirlenen 5 farklı konsantrasyonu uygulanan HeLa ve Vero hücrelerinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişiklikler 24. ve 48. saat sonunda invert mikroskop aracılığıyla X10 (ölçek uzunluğu 100 µm) büyütmede incelendi. Elde edilen görüntüler Şekil 4.8-15'te yer almaktadır. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişiklikler MTT yönteminden elde edilen sonuçlarla tutarlı bulunmuştur.

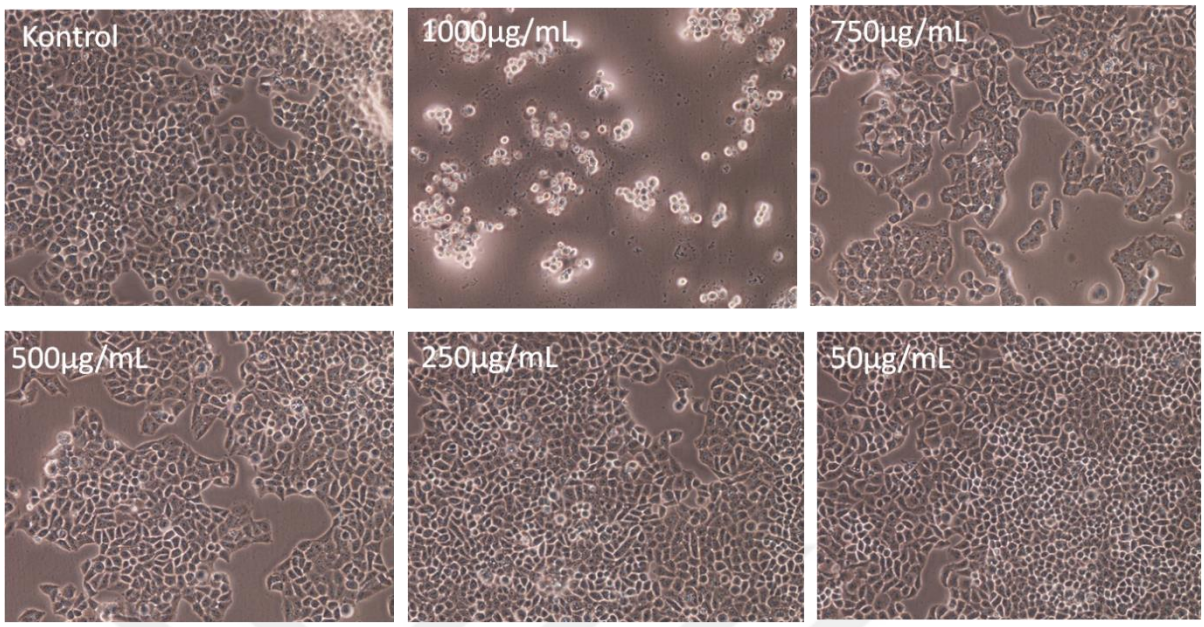


Şekil 4.8: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 24. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

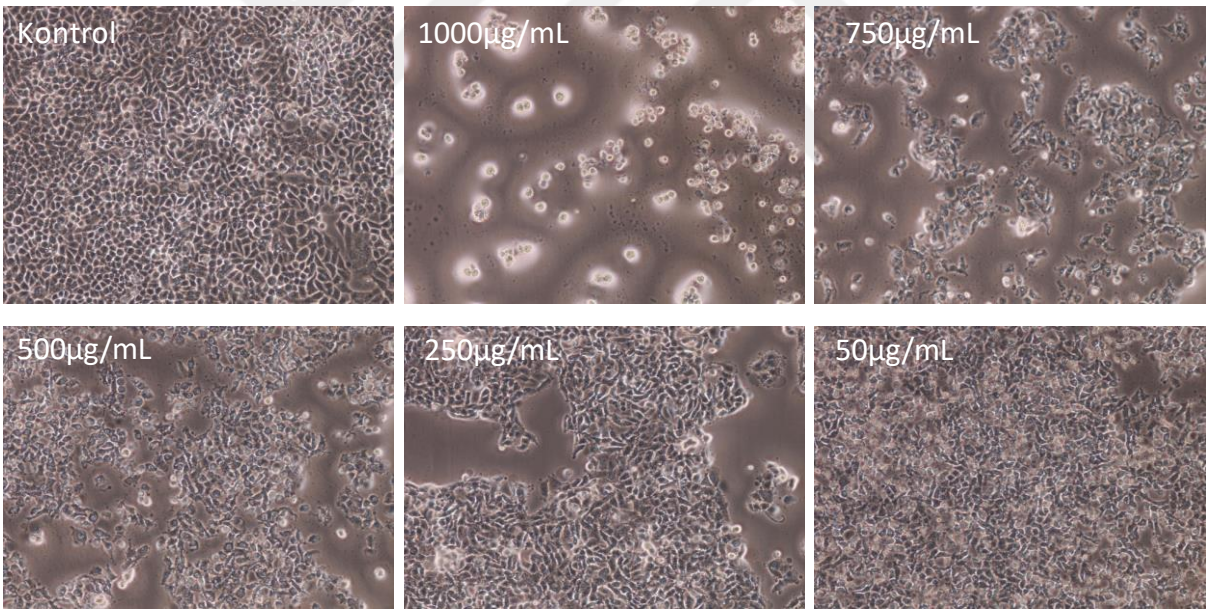


Şekil 4.9: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 48. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

C. hermannii ekstresinin Vero hücrelerine uygulanmasından sonraki 24. saatte kontrole göre kıyaslandığında 1000 µg/mL ve 750 µg/mL konsantrasyonlarında az sitotoksisite ve 48. saatte ise her iki konsantrasyonda artan bir sitotoksite gözlenmiştir.

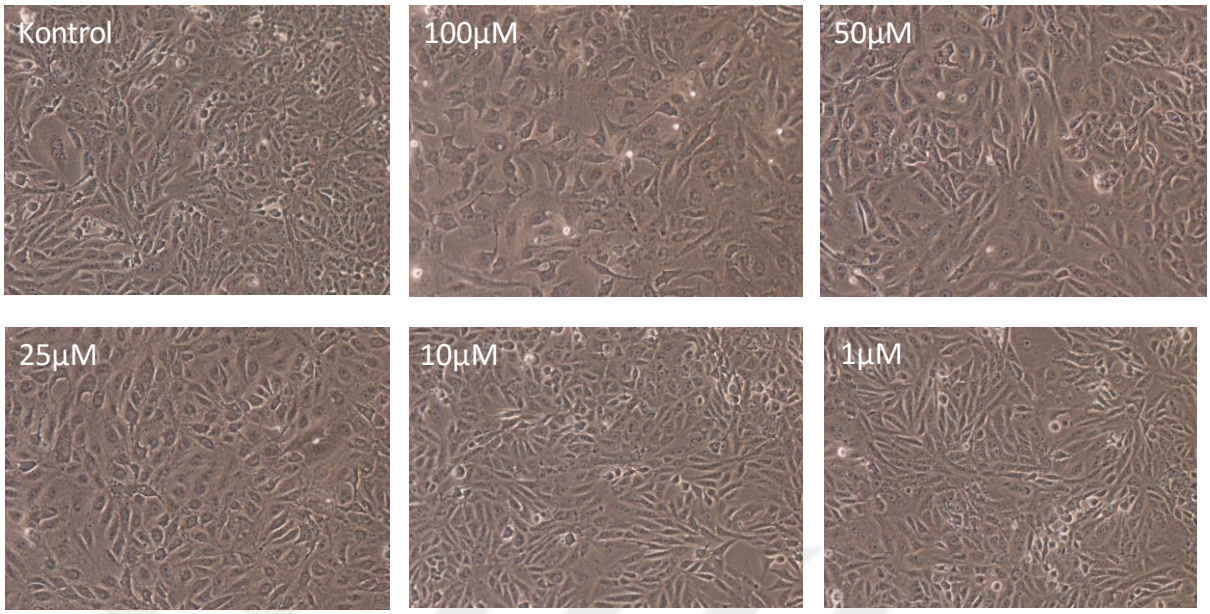


Şekil 4.10: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

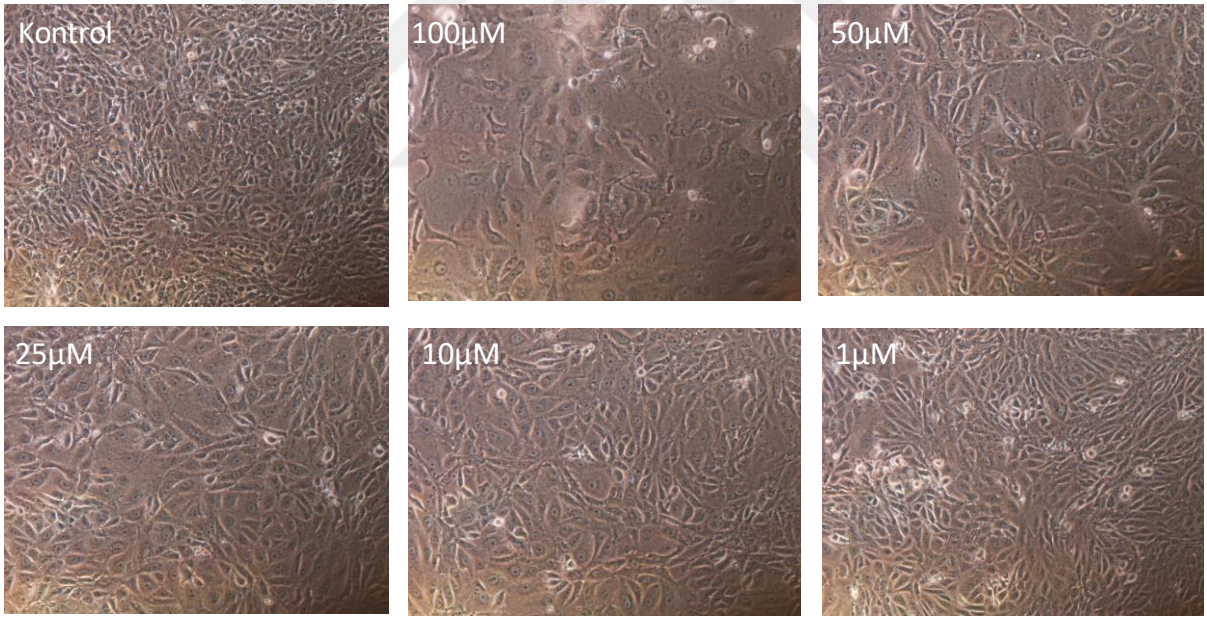


Şekil 4.11: *Centaurea hermannii* ekstresinin 5 farklı konsantrasyonu (1000, 750, 500, 250, 50 µg/mL) uygulandıktan sonraki 48. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

C. hermannii ekstresinin HeLa hücrelerine uygulanmasından sonraki 24. saatte kontrole göre kıyaslandığında 1000 µg/mL ve 500 µg/mL konsantrasyonlarında yüksek sitotoksisite ve 48. saatte ise 10 µg/mL konsantrasyonu hariç diğer tüm onsantrasyonlarda yüksek sitotoksite gözlenmiştir.

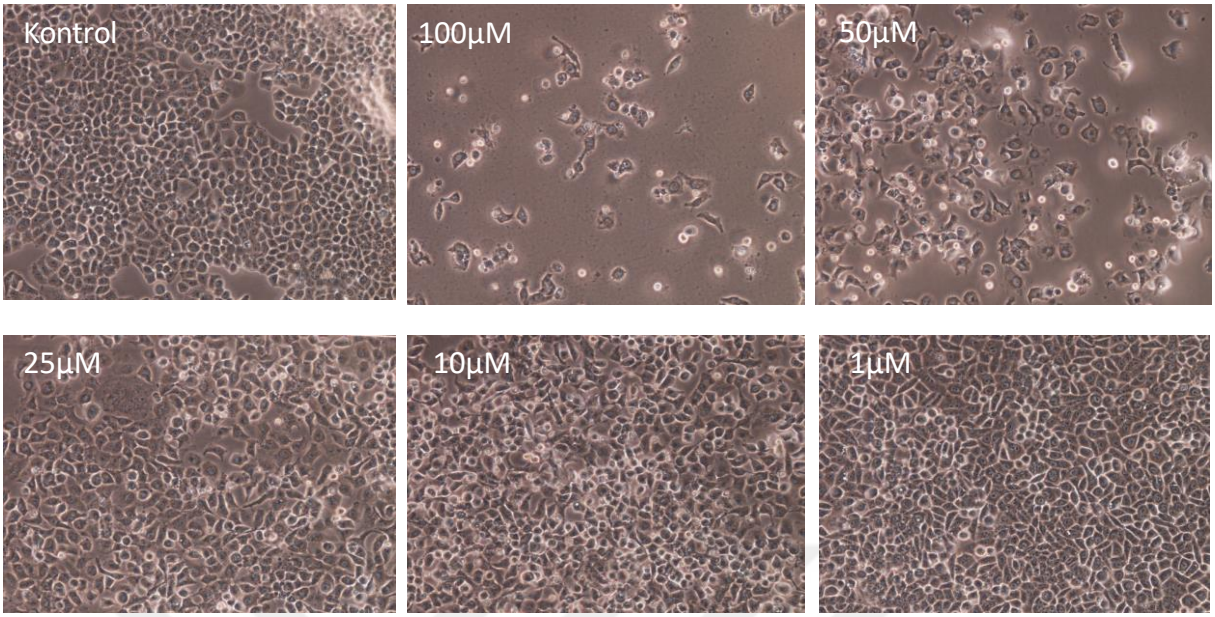


Şekil 4.12: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

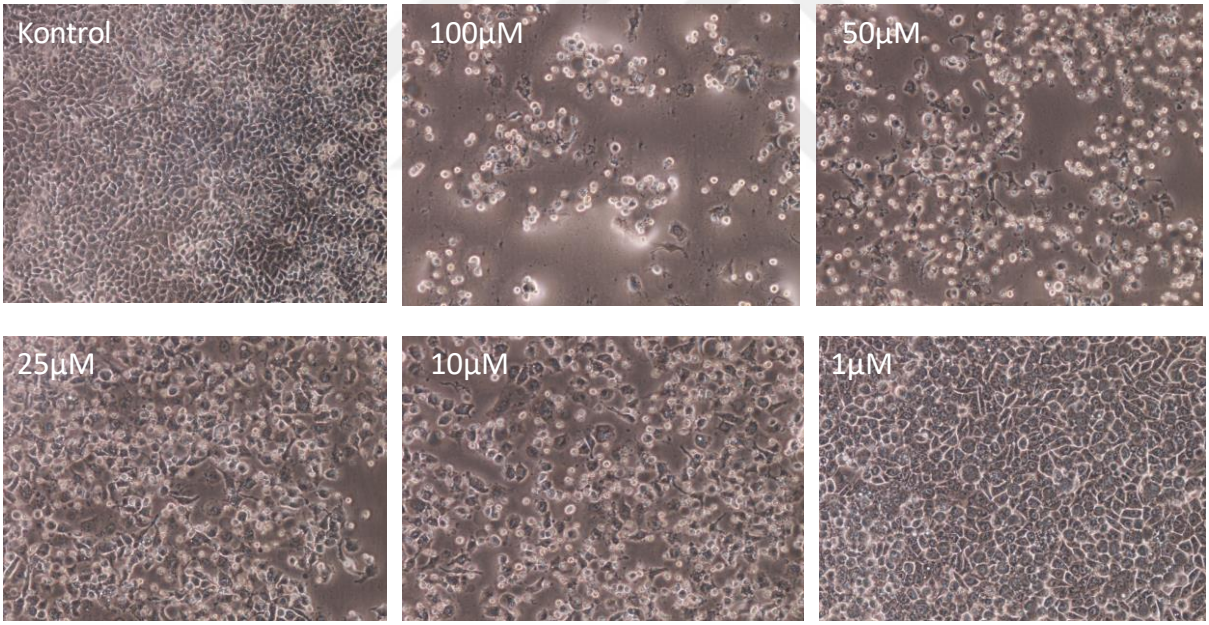


Şekil 4.13: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 48. saatteki Vero hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

Doxorubicin kemoterapötik ajanının Vero hücrelerine uygulanmasından sonraki 24. saatte kontrole göre kıyaslandığında 1000 µM, 50 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında az sitotoksisite ve 48. saatte ise her üç konsantrasyonda artan bir sitotoksite gözlenmiştir.



Şekil 4.14: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

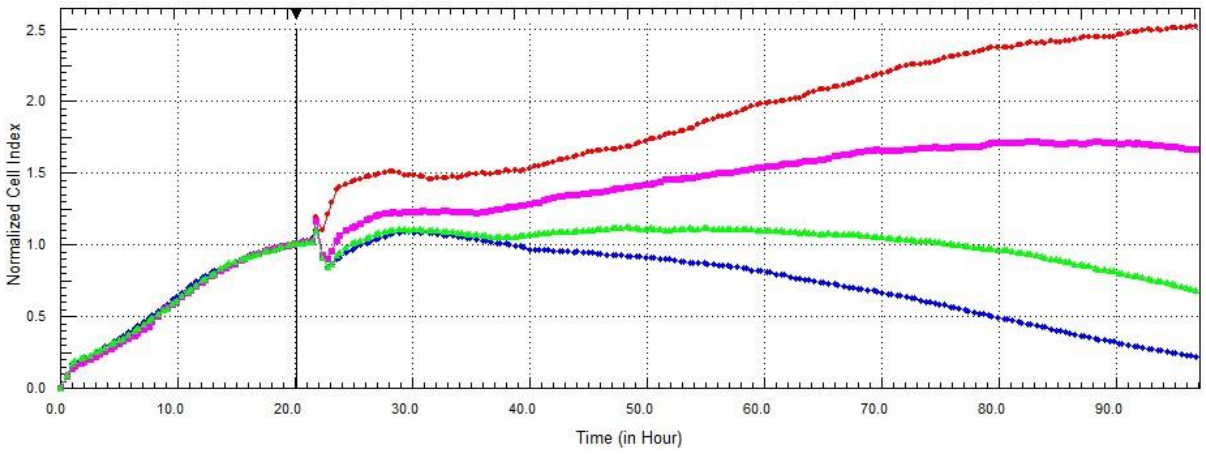


Şekil 4.15: Doxorubicin'in 5 farklı konsantrasyonu (100, 50, 25, 10, 1 µM) uygulandıktan sonraki 24. saatteki HeLa hücrelerinin invert mikroskobu görüntüleri (X10).

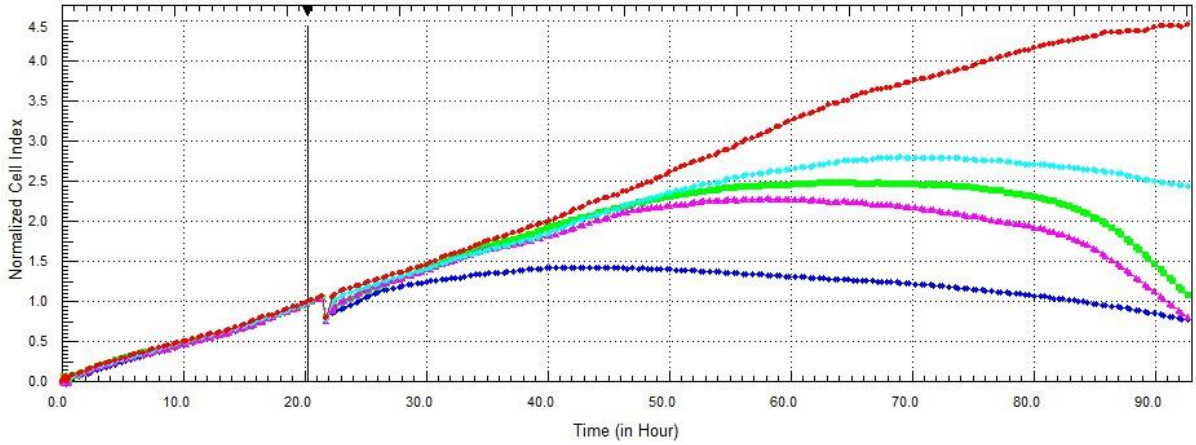
Doxorubicin kemoterapötik ajanının HeLa hücrelerine uygulanmasından sonraki 24. saatte kontrole göre kıyaslandığında 1000 µM, 50 µM, 25 µM ve 10 µM konsantrasyonlarında yüksek sitotoksisite ve 48. saatte ise her dört konsantrasyonda artan bir sitotoksite gözlenmiştir.

4.1.3. xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP Sistemi ile Hücre İndeksi Değerlerinin Belirlenmesi

Centaurea hermannii bitki ekstresinin ve kemoterapötik ajan Doxorubicin'in Vero ve HeLa hücre hatları üzerindeki MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini doğrulamak amacıyla xCELLigence RTCA DP sistemi ile hücre indeksi parametreleri belirlenmiştir. Hücre indeksi parametreleri ile hazırlanan grafikler Şekil 4.16-19'da gösterilmektedir. SI değerlerine göre hazırlanan sonuçlar ise Tablo 4.7'de verilmektedir.

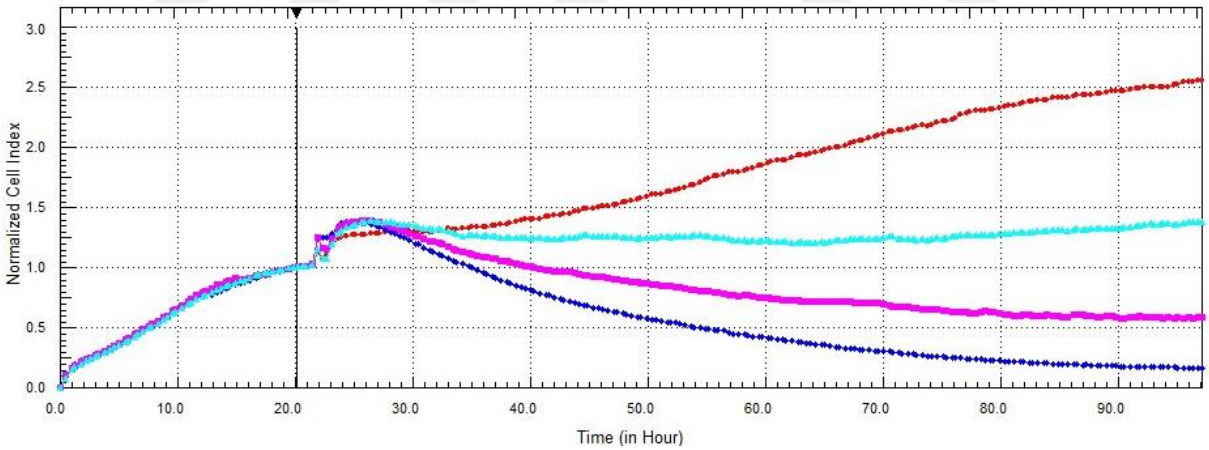


Şekil 4.16: Vero hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=557,8 µg/mL, R^2=0,990).



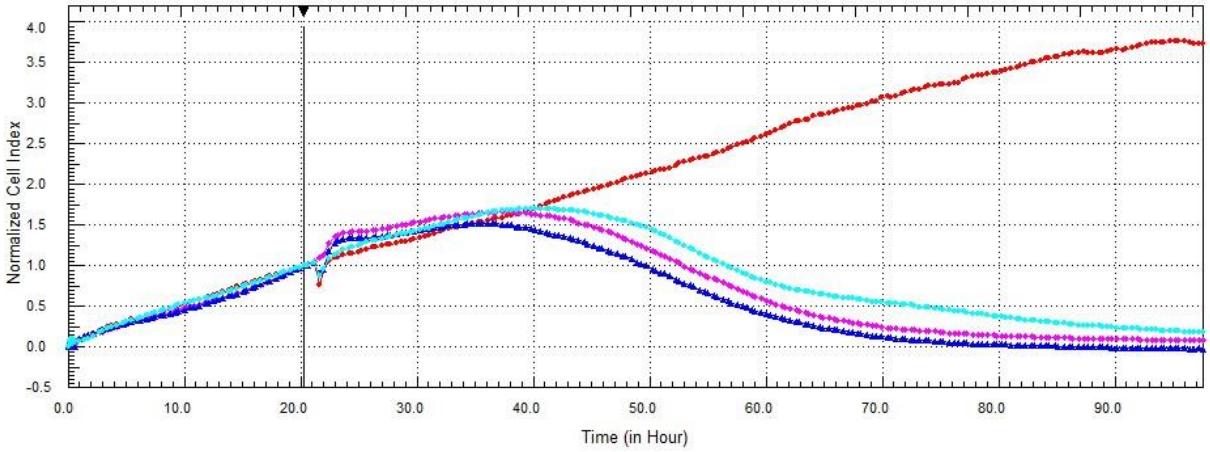
..... **Kontrol**
..... **10 µg/mL**
..... **25 µg/mL**
..... **50 µg/mL**
..... **300 µg/mL**

Şekil 4.17: HeLa hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=18,3 µg/mL, R^2=0,976).



..... **Kontrol**
..... **25 µg/mL**
..... **50 µg/mL**
..... **100 µg/mL**

Şekil 4.18: Vero hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda Doxorubicin kanser ilacının uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=19,2 µM, R^2=0,992).



..... Kontrol
..... 10 µg/mL
..... 25 µg/mL
..... 100 µg/mL

Şekil 4.19: HeLa hücrelerine 22. saat sonunda farklı konsantrasyonlarda Doxorubicin kanser ilacının uygulanması ile belirlenen IC_{50} konsantrasyonu (IC_{50}=7,8 µM, R^2=1).

Tablo 4.7: *Centaurea hermannii* ve Doxorubicin'in MTT analizi ve xCELLigence RTCA DP sistemi ile belirlenen IC_{50} ve SI değerleri.

	MTT Analizi		
Uygulanan ekstre ve ajan	**IC_{50} Vero**	**IC_{50} HeLa**	**SI**
Centaurea hermannii	599 µg/mL	15,74 µg/mL	38,1
Doxorubicin	21,2 µM	8,4 µM	2,5

	xCELLigence RTCA		
Uygulanan ekstre ve ajan	**IC_{50} Vero**	**IC_{50} HeLa**	**SI**
Centaurea hermannii	557,8 µg/mL	18,3 µg/mL	30,5
Doxorubicin	19,2 µM	7,8 µM	2,5

*SI=Vero IC_{50}/HeLa IC_{50}

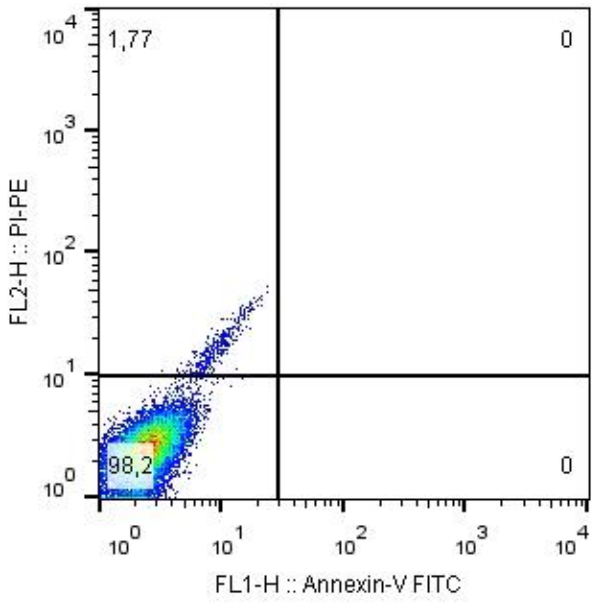
Bu analiz sonucunda IC_{50} değerleri Vero hücre hattında *Centaurea hermannii* için 557,8 µg/mL ve Doxorubicin için 19,2 µM, HeLa hücre hattında *Centaurea hermannii* için 18,3 µg/mL ve Doxorubicin için 7,8 µM olarak bulunmuştur. SI değerleri ise *Centaurea hermannii* için 30,5 iken Doxorubicin için 2,5 olarak hesaplanmıştır. MTT analizinden elde edilen veriler hem morfolojik değerlendirme ile hem de xCELLigence sistemi ile yapılan analiz sonuçlarıyla tutarlı olarak bulunmuştur.

4.2. APOPTOZUN FARKLI YÖNTEMLERLE TAYİNİ

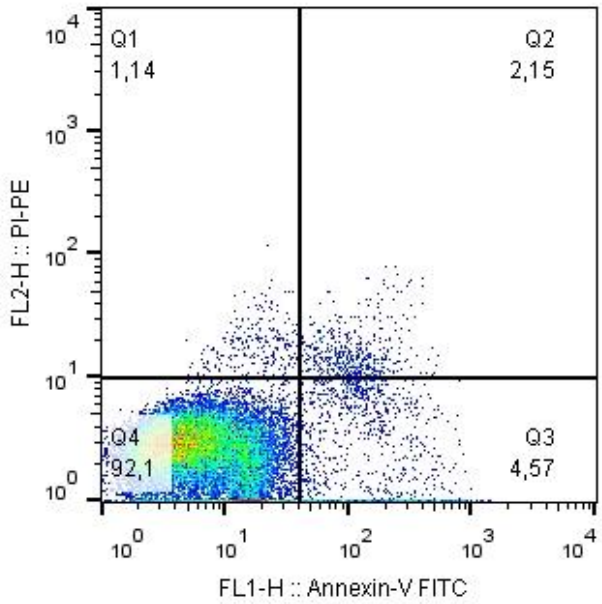
Potansiyel antikanser aktiviteye sahip *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik aktivitesinin tayini 3 farklı yöntemle ortaya konulmuştur. Deneylerde Vero hücreleri için toksik olmayan fakat HeLa hücreleri için toksik olan (100 µg/mL) ve HeLa hücreleri için yarı öldürücü olan (IC_{50}=15,74 µg/mL) iki konsantrasyon uygulanmıştır.

4.2.1. Flow sitometre Analizi Sonuçları

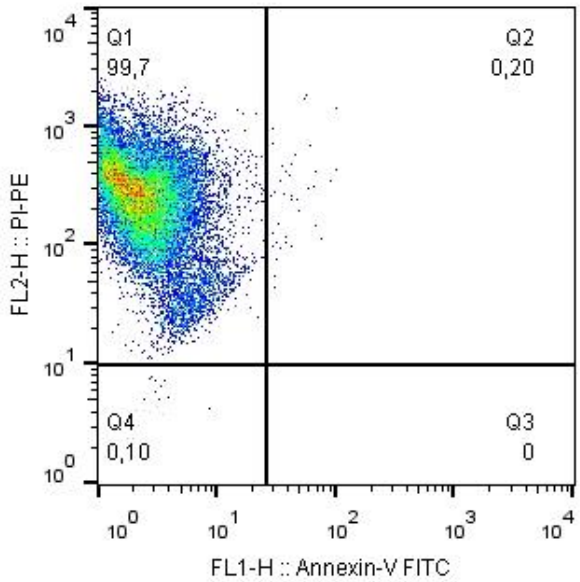
FITC işaretli Annexin V ile *Centaurea hermannii* ekstresinin uygulandığı apoptoza giden HeLa hücrelerinin sayısı flow sitometri analizi ile tespit edildi. Elde edilen veriler kontrole göre anlamlı olup sitotoksisite sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Flow sitometri analizi sonuçları Şekil 4.20-25'te ve bu analizden elde edilen verilere göre hazırlanan HeLa hücrelerinin popülasyonlarını % olarak gösteren grafik, Şekil 4.26'da yer almaktadır.



Şekil 4.20: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen boyasız HeLa hücreleri.

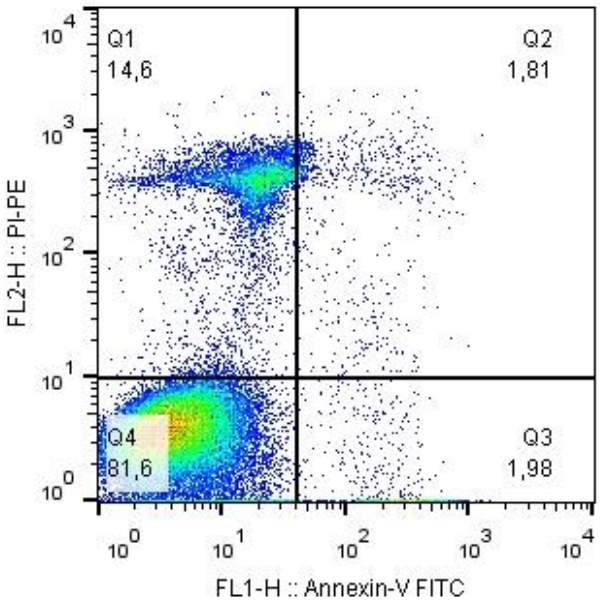


Şekil 4.21: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen Annexin V boyalı Canlı HeLa hücreleri.



Şekil 4.22: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen PI boyalı Ölü HeLa hücreleri.

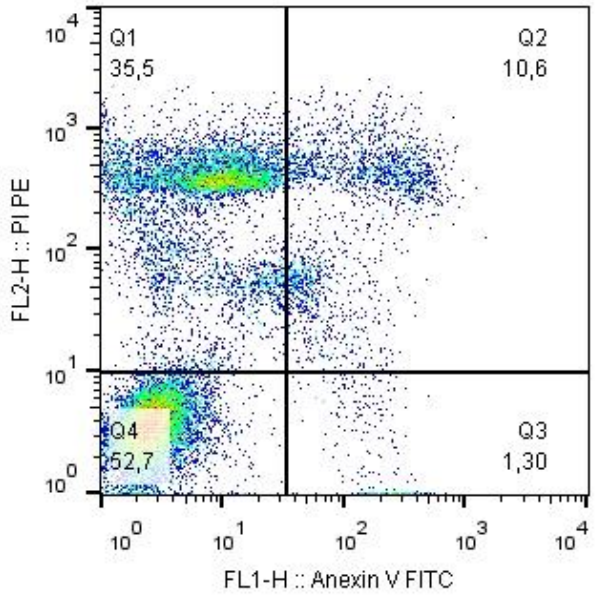
Şekil 4.20-22'de yer alan hücre sayıları Ölü, Canlı, Erken Apoptoz ve Geç apoptoz kadranlarının (Q1, Q4,Q3 ve Q2) oluşturulmasnı yönelik ölçümlerdir.



Q1: Ölü Q2: Geç apoptotik Q3: Erken apoptotik Q4: Canlı

Şekil 4.23: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen Kontrol grubundaki HeLa hücreleri (48. saat).

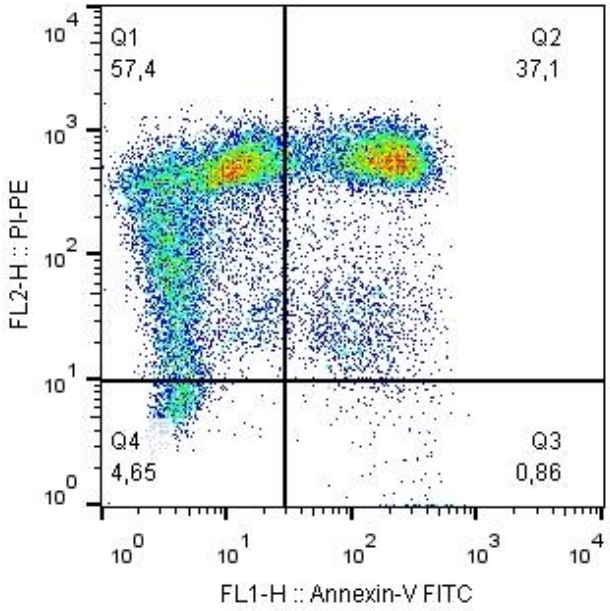
48. saat sonunda kontrol grubundaki hücrelerin % 81,6'sı canlı olup, % 14.6'sı ölüdür.



Q1: Ölü Q2: Geç apoptotik Q3: Erken apoptotik Q4: Canlı

Şekil 4.24: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin IC_{50} konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki HeLa hücreleri (48. saat).

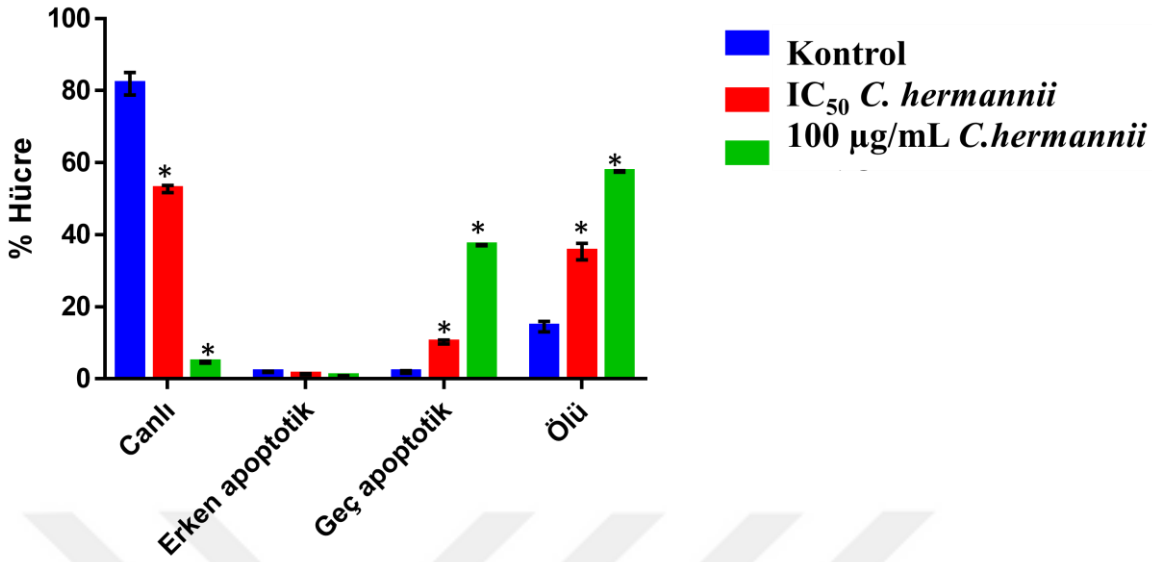
48. saat sonunda IC_{50} konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki hücrelerin % 52,7'i canlı olup, % 35.5'i ölü, % 10,6'sı geç apoptotik ve % 1,30'u erken apoptotiktir.



Q1: Ölü Q2: Geç apoptotik Q3: Erken apoptotik Q4: Canlı

Şekil 4.25: Flow sitometre cihazında sayısı belirlenen *Centaurea hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki HeLa hücreleri (48. saat).

48. saat sonunda 100 µg/mL konsantrasyonu uygulanan deney grubundaki hücrelerin % 4,65'i canlı olup, % 57,4'ü ölü, % 37,1'i geç apoptotik ve % 0,86'sı erken apoptotiktir.



Şekil 4.26: *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL ve IC_{50} konsantrasyonları uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki HeLa hücrelerinin % hücre değerlerinin gösterimi. *p<0,05Kontrole göre anlamlılık.

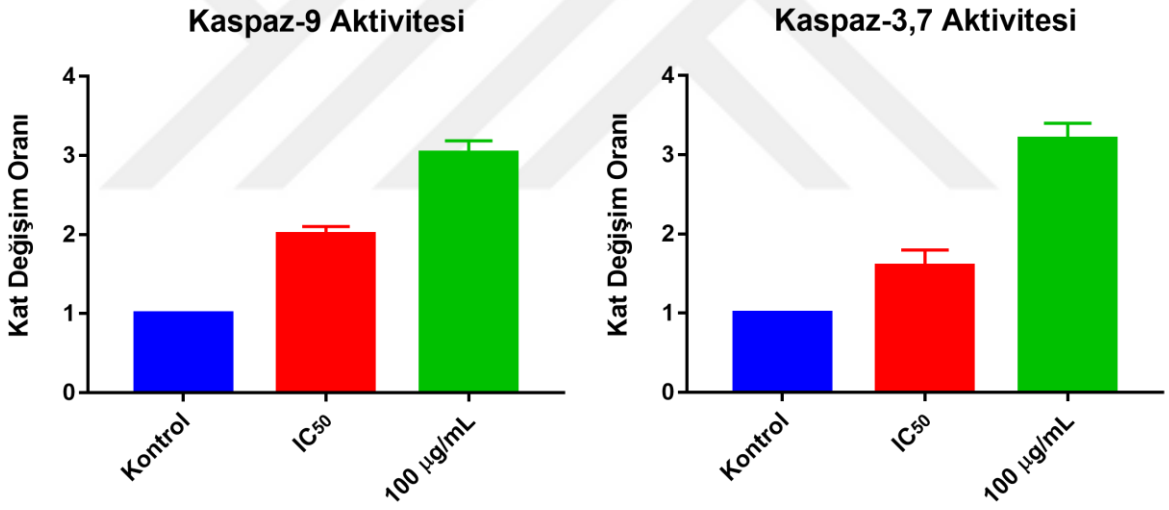
C. hermannii bitki ekstresinin 100 µg/mL ve IC_{50} konsantrasyonları uygulanan HeLa hücrelerinin canlı, ölü ve geç apoptotik popülasyonları kontrol grubuna göre anlamlı olup bu bitki ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğu flow sitometri analizi ile ortaya konulmuştur.

4.2.2. Kaspaz 3,7 ve Kaspaz 9 Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

C. hermannii ekstresinin HeLa hücrelerindeki antikanser aktivitesinin apoptoz ölüm yolu ile gerçekleştiği flow sitometri analizi ile belirlendikten sonra apoptotik aktivitenin belirlenmesi için önemli bir diğer yöntem olan kaspaz aktivitesi tayini ile *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerindeki kaspaz 3,7 ve 9'un aktivasyonuna etkisi belirlenmiştir. Spektrofloremetrik olarak ölçülen aktif kaspazların floresan ışıma değerleri Tablo 4.8'de ve aktif kaspazların kontrole göre kat değişim değerleri ise Şekil 4.27'de yer almaktadır.

Tablo 4.8: *C. hermannii* ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saatte kontrol ve deney gruplarındaki kaspaz 3, 7 ve 9' un floresan ışıma değerleri (±SD) *p<0,05 Kontrole göre anlamlılık.

	Kaspaz 9 aktivitesi	**Kaspaz 3,7 aktivitesi**
Kontrol	43±1,5	26±0,6
100 µg/mL	132*±0,3	92*±1,1
IC_{50}	82*±0,8	46*±1



Şekil 4.27: *C. hermannii* bitiki ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinin 48. saatte deney gruplarındaki kaspaz 3, 7 ve 9' un kontrole göre kat değişim oranları.

C. hermannii bitki ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik kaskadın başrol oyuncuları olan yürütücü kaspazlardan kaspaz 3,7 ve başlatıcı kaspazlardan kaspaz 9'un aktivasyonunu arttırdığı spektroflorometrik olarak belirlenmiştir.

4.2.3. RNA İzolasyonu Sonuçları

48 saat süreyle *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi için yapılan Nanodrop ölçüm sonuçları Tablo 4.9'da yer almaktadır.

Tablo 4.9: 48 saat süreyle *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinden izole edilen RNA örneklerinin nanodrop sonuçları.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/µL)	$A_{260/280}$
Kontrol	645,1	2,09
100 µg/mL	381,1	2,08
IC_{50}	435,5	2,11

c-DNA sentezi için yeterli konsantrasyonda ve saflıkta RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

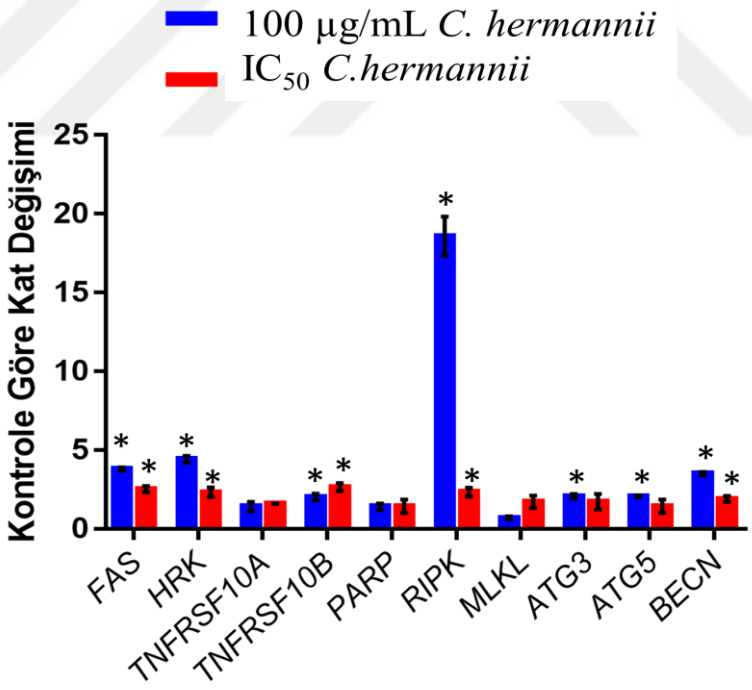
4.2.4. qRT-PCR Analizi Sonuçları

Son olarak, *Centaurea hermannii* ekstresinin uygulandığı HeLa hücrelerinde apoptoza, nekroza ve otofajiye özgü genlerin anlatım seviyeleri qRT-PCR analizi ile belirlenmiştir. Kat değişimi değerleri, Ct değerleri kullanılarak $2^{\Delta\Delta}$Ct yöntemi ile üç bağımsız deneyin ortalaması olarak hesaplanmıştır. Üç ölüm mekanizması ile ilişkili genlerin bazılarının deney gruplarında yukarı regüle olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da ve Şekil 4.28'de yer almaktadır.

qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen verilere göre apoptotik genlerden *FAS*, *HRK* ve *TNFRSF10B* genleri *C. hermannii* bitki ekstresinin her iki konsantrasyonunda da HeLa hücrelerinde yukarı regüle olmaktadır. Nekrotik genlerden *RIPK*, HeLa hücrelerinde *C. hermannii* bitki ekstresinin oldukça toksik olan 100 µg/mL konsantrasyonunda aşırı yukarı regüle edilmektedir. *RIPK*, *C. hermannii* bitki ekstresinin IC_{50} konsantrasyonunda da yukarı regüledir. Otofajik genlerden *BECN*, *C. hermannii* bitki ekstresinin her iki konsantrasyonunda da HeLa hücrelerinde yukarı regüle olup *ATG3* ve *ATG5* genleri ise sadece *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonunda yukarı regüle edilmektedirler.

Tablo 4-10: *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanmış HeLa hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve otofajik genlerin anlatım seviyelerindeki değişim (48. saat) * Kat değişimi ≥2.

Gen Adı	Kat Değişimi (100 µg/mL)	Kat Değişimi (IC_{50})	İlişkili Olduğu Ölüm Mekanizması
FAS	3.8*	2.6*	Apoptoz
HRK	4.4*	2.4*	Apoptoz
TNFRSF10A	1.5	1.6	Apoptoz
TNFRSF10B	2.1*	2.7*	Apoptoz
PARP	1.5	1.5	Nekroz
RIPK	19*	2.5*	Nekroz
MLKL	0.7	1.7	Nekroz
ATG3	2.1*	1.7	Otofaji
ATG5	2.1*	1.5	Otofaji
BECN	3.5*	2*	Otofaji



Şekil 4.28: *C. hermannii* bitki ekstresi uygulanmış HeLa hücrelerindeki apoptotik, nekrotik ve otofajik genlerin kontrole göre kat değişimleri (48.saat) * Kat değişimi ≥2.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, hücrede çeşitli patolojik ve metabolik değişiklikler oluşturan bir hastalık olup dünya genelinde önemli ölüm sebeplerinden biri haline gelmiştir. Her yıl dünyadaki ölümlerin % 12.5'inden sorumlu olan kanser nedeniyle yedi milyondan fazla insan ölmektedir. Günümüzde kanser tedavisi için kemoterapi, radyasyon, immünoterapi, gen terapi ve cerrahi müdahaleler gibi çeşitli tedavi stratejileri mevcuttur. Kemoterapi, çeşitli kanser tedavileri için yaygın olarak kullanılmaktadır. Şu anda mevcut olan kemoterapötik ajanların çoğu apoptozun indüksiyonu yoluyla etkisini göstermektedir. Apoptoz, hücre zarı fosfolipid asimetrisinin kaybı, DNA'nın oligonükleozomal fragmanlara enzimatik bölünmesi ve sonuçta hücrelerin membrana bağlı apoptotik cisimlere bölünmesiyle karakterize edilen iyi organize edilmiş bir hücre ölümüdür. Hücrelerin apoptoz geçirdiği başlıca iki yol vardır; biri dışsal ve diğeri içseldir. Kanser hücrelerinin, hayatta kalma gereksinimlerine göre bu yollardan birini veya her ikisini birden ortak bir şekilde düzenlediği ve yaygın kemoterapötik ilaçların çoğuna karşı dirençli hale geldiği iyi bilinmektedir [50,51,52]. Bu nedenle, günümüzde son zamanlarda yapılan araştırmalar, normal hücreler için toksik olmayan fakat kanserin tedavi ve önlenmesi için etkili olabilecek bitkiler üzerinde yoğunlaşmıştır. Potansiyel antikanser bileşiklerinin saptanması için doğal ürünlerden izole edilmiş bileşenler ya da ham özütler olarak yapılan antikanser aktivite tarama çalışmaları önemli hale gelmiştir. Tedavi amaçlı kullanılan antikanser ilaçların % 60'ından fazlasının doğal kaynaklardan kökenlendiği bildirilmiştir [13]. Bu nedenle, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi ve kanser için daha etkili tedavi stratejilerinin bulunmasında bitkisel kaynaklar büyük önem taşımaktadır [50,51,52].

Sitotoksisite, terapötik bir ajanın antikanser aktivitesinin önemli bir ölçütüdür, apoptoz ise bu ajanların tercih edilen etki mekanizmasıdır. Apoptoz, hücre bölünmesini ve hücre ölümünü düzenleyerek hücresel homeostazın korunmasında önemli bir mekanizmadır. Süreç, morfolojik değişiklikler ve DNA fragmantasyonu gibi apoptozlu hücreler tarafından kendine özgü karakteristiklerin sergilenmesi ile sonuçlanan belirli hücre içi yolların aktivasyonu ile gerçekleşir. Bazı çalışmalar, apoptozun kanserle ilişkili olduğunu göstermiştir, çünkü kanser hücreleri azalmış apoptoz ile karakterizedir. Bu nedenle, apoptotik yolların aktivasyonu, kanser hücrelerini yok etmek için çoğu sitotoksik ilaç tarafından kullanılan önemli bir mekanizma olarak kabul edilir [53].

Doğal ürünler yıllardır ilaç geliştirme çalışmalarının önemli bir kaynağı olarak nitelendirilmiş ve birçok yeni nesil kemoterapötik ajan bu tür ürünlerden elde edilmiştir. Etkili ve kabul edilebilir bir antikanser bileşiğin, normal hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmaması veya çok minimal düzeyde olması beklenmektedir [54].

Bu çalışma kapsamında 3'ü Türkiye'ye edemik olan toplam 7 metanolik bitki ekstresinin (*Crataegus orientalis* Pall. ex M.Bieb., *Centaurea kilaea* Boiss., *Centaurea hermannii* F.Herm., *Crataegus monogyna* Jacq.subsp. *monogyna*, *Kitaibelia balansae* Boiss., *Plantago lanceolata* L., *Centaurea behen* L.) normal transforme hücre hattı (Vero) ve 4 kanser hücre hattı (HeLa, A549, Mcf-7 ve PC-3) üzerine olan sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi sonucunda (Tablo 4-1,5 ve Şekil 4.1-5) ekstrelerin Vero hücre hattı üzerine olan % inhibisyon değerleri göz önüne alındığında *Crataegus orientalis* ve *Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* ekstrelerinin konsantrasyon artışına paralel olarak mitotik aktivite gösterdiği, diğer 5 ekstrenin (*Centaurea kilaea, Centaurea hermannii, Kitaibelia balansae, Plantago lanceolata* ve *Centaurea behen*) ise konsantrasyon artışına paralel olarak değişik oranlarda sitotoksisite gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Bu bitkiler içerisinde en düşük toksisite *C. hermannii* bitkisi tarafından ortaya konmuştur. Aynı şekilde ekstrelerin kanser hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında ve Vero hücre hattına olan düşük, kanser hücre hattına olan yüksek sitotoksisite baz alındığında, *Crataegus orientalis* ve *Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* ekstrelerinin Vero hücrelerinde mitotik aktivite gösterirken üç kanser hücre hattında (HeLa, A549 ve Mcf-7) ise konsantrasyon artışına paralel olarak sitotoksik aktivite göstermesi oldukça önemlidir. Bu iki ekstrenin IC_{50} değerlerinin >500 µg/mL gibi yüksek değerler ortaya koyması arzu edilmese de ham ekstre izolasyon prosedürlerinin takip edilmesi ile çok daha düşük konsantrasyonlarda çok daha yüksek etkinliklerin ortaya çıkması beklenebilir. Aynı zamanda bu iki ekstrenin üç farklı kanser hattına da etkili olması ekstrelerin geniş spektrumlu etkinliğini ortaya koyması açısından önemlidir. Normal hücre hattı olan Vero hücreleri üzerine olan düşük toksisitesi baz alındığında *C. hermannii* bitkisinin denenen bitkiler içerisinde kanser hücre hatlarına en yüksek toksisiteye sahip bitki olduğu ortaya çıkmaktadır. *C. hermannii* en fazla sitotoksik etkisini HeLa hücrelerinde daha sonra PC-3 kanser hücre hattında göstermiştir. Ayrıca *Plantago lanceolata* ekstresinin Vero hücreleri için IC_{50} değeri 300 µg/mL iken HeLa hücreleri için 100 µg/mL'dir. Yüksek seçicilikte HeLa hücrelerine toksik olan bu bitki

ekstresinin antikanser etkinliği ile ilgili literatürde bilgiler bulunmakta olup bu çalışmada elde edilen sonuçlar da literatür bilgisi [31] ile uyumlu bulunmuştur.

MTT analizi ile 48. saatte elde edilen veriler değerlendirildiğinde *C. hermannii* metanol ekstresinin sağlıklı hücre hattı Vero'daki düşük toksisitesi ve özellikle HeLa kanser hücre hattındaki yüksek sitotoksisitesi potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan literatür taramalarından elde edilen sonuca göre bu bitki türü Türkiye'ye endemik olup daha önce bitki ekstresinin biyolojik aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *C. hermannii* ekstresi ve kemoterapötik ajan olan Doxorubicin'in sitotoksik etkilerinin Vero ve HeLa hücre hatları üzerinde denenmesi sonucu elde edilen verilerle IC_{50} ve SI değerleri ortaya konulmuştur (Tablo 4-6). IC_{50} değerleri; Vero hücre hattında *C. hermannii* için 599 µg/mL, Doxorubicin için 21,2 µM, HeLa hücre hattında *C. hermannii* için 15,74 µg/mL, Doxorubicin için 8,4 µM olarak bulunmuştur. IC_{50} değerlerinden ortaya çıkan SI değerleri ise *C. hermannii* için 38,1 iken Doxorubicin için 2,5'tir. xCELLigence analiz sonucu IC_{50} değerleri; Vero hücre hattında *C. hermannii* için 557,8 µg/mL, Doxorubicin için 19,2 µM, HeLa hücre hattında *C. hermannii* için 18,3 µg/mL, Doxorubicin için 7,8 µM ve SI değerleri; *C. hermannii* için 30 ve Doxorubicin için 2,5 olarak bulunmuştur (Tablo 4-7).

SI değerleri özellikle 2'den yüksek olanlar önemli bir antikanserojen ajan olarak sınıflandırılmakta ve kabul edilmektedir. Bu değerin yüksekliği aynı zamanda ajanın değerini de arttıran bir parametredir [55,56,57].

Huczynski ve diğ. (2013)[58] tarafından yapılan bir çalışmada klinikte kullanımı olan Cisplatin'in P388 (Murin Lösemi Hücre Hattı) hücrelerine karşı SI değeri 11.08 iken A549 hücre hatında 1.08, Mcf-7 hücre hattında ise 0.65 olarak ortaya konmuştur. Başka bir antikanser ilaç olan Docetaxel'in SI değerlerinin Hep-2 (laringeal kanser hücre hattı) hücrelerinde 13.7, HeLa hücrelerinde ise 5.5 olduğu ortaya konmuştur [59].

C. hermannii bitki ekstresinin standart olarak kullanılan bir ajan olan Doxorubicin'e kıyasla çok daha yüksek SI değerleri ortaya koyması önemli bir antikanser ajan adayı olabileceğini göstermektedir. MTT analizi sonucu etkinliği ortaya konan *C. hermannii* ve Doxorubicin'in xCELLigence RTCA DP sistemi ile hücre indeksi parametrelerinin analizi (Şekil 4.16-19) ve

morfolojik değerlendirmeler (Şekil 4.8-15) kıyaslandığında sonuçlar birbirleriyle tutarlı bulunmuştur.

Çok hücreli organizmalarda hücre ölümü, doku homeostazını koruyan ve potansiyel olarak zararlı hücreleri yok eden kritik ve aktif bir süreçtir. Morfolojik olarak farklı hücre ölümünün üç ana tipi vardır: apoptoz (tip I hücre ölümü), otofaji (tip II hücre ölümü) ve nekroz (tip III hücre ölümü). Her üçü de, spesifik uyarılara yanıt olarak devreye giren ayrı ve bazen örtüşen sinyal yollarıyla gerçekleşmektedir. Apoptoz, Fas gibi hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri ligandlarıyla (dışsal yol) veya Bcl2-ailesi proapoptotik proteinlerin mitokondriyal dış membranın (içsel yol) permeabilizasyonuna neden olduğu durumlarda tetiklenir. Her iki yol da, hücrenin büzülmesinden esas olarak sorumlu olan kaspaz proteaz ailesinin aktivasyonu üzerinde birleşmektedir. Otofaji sitosol ve spesifik organellerin bir kısmının otofajom olarak bilinen çift membranlı bir yapı tarafından yutulduğu ve sonuç olarak bozulduğu katabolik bir süreci tanımlar. Otofaji çoğunlukla bir sağkalım mekanizmasıdır; bununla birlikte, otofajik sinyalleme yolunun bileşenlerinin hücre ölümünü aktif olarak desteklediği birkaç otofajik hücre ölümü örneği vardır. Nekrotik hücre ölümü, plazma membran bütünlüğünün hızlı kaybıyla karakterizedir. Bu hücre ölüm formu, en iyi karakterize edilen protein kinaz RIP3'ün aktivitesine bağlı olan aktif sinyal yollarından kaynaklanabilmektedir [21,51].

Birçok kanser türünde zayıflatılmış veya tükenmiş apoptoz kapasitesi tanımlanmıştır. Farklı ajanlar kullanılarak apoptotik düzeylerin yükseltilmesi, antikanser stratejilerinde onaylanmış önemli bir hedef mekanizmasıdır. Hücreler apoptoz geçirdiğinde, hücre zarının bir kısmını oluşturan fosfatidilserin (PS), zarın hücre dışı tarafına doğru yer değiştirir. Annexin V, PS için yüksek bir afiniteye sahiptir. PS'nin, membranın dış veya açık tarafına translokasyonu apoptotik işlemde erken bir olaydır. Annexin V boyaması bu nedenle erken evre apoptozun bir belirteci olarak kabul edilmektedir [54].

Potansiyel antikanser aktiviteye sahip *C. hermannii* bitki ekstresinin HeLa hücrelerindeki apoptotik aktivitesinin belirlenmesinde 3 farklı yöntem [biyokimyasal (Flow sitometri), florometrik (kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonu) ve moleküler (qRT-PCR)] kullanılmıştır. Bu yöntemlerde MTT analizi sonucu Vero hücreleri için toksik olmayan fakat HeLa hücreleri için toksik olan (100 µg/mL) ve HeLa hücrelerinin yarısını öldüren konsantrasyon (IC_{50}= 15,74 µg/mL) olmak üzere iki konsantrasyon uygulanmıştır. *C. hermannii* ekstresinin uygulandığı apoptoza giden HeLa hücrelerinin sayısı FITC işaretli Annexin V ile flow

sitometri analizi ile tespit edilmiştir. Bu analiz sonucu (Şekil 4.20-26) *C. hermannii* bitki ekstresinin 100 μg/mL ve IC_{50} konsantrasyonları uygulanan HeLa hücrelerinin canlı, ölü, erken ve geç apoptotik popülasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı olup bu bitki ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptotik etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar sitotoksisite sonuçlarını da teyit etmektedir.

Apoptoz ve nekrozun birçok özelliği çakışabilmekte ve hücre ölümünün apoptoz ile gerçekleştiğini doğrulamak için iki veya daha fazla farklı deneyi kullanmak oldukça önemlidir. Bir analiz erken apoptotik olayları algılayabilmekte, farklı bir test ise daha sonraki bir olayı hedefleyebilmektedir. Apoptozu doğrulamak için kullanılan ikinci deney, genellikle farklı bir ilkeye dayanmaktadır [17].

Kontrol edilemeyen hücre ölümü kanser gelişimi ile sonuçlandığında apoptoz hedefli tedaviler etkilidir. Apoptoz tipik olarak hasarlı hücreleri yok etmek ve homeostaziyi korumak için ölüm reseptörleri (ekstrinsik yol) veya mitokondriyal (intrinsik) yolla indüklenir. Her iki yolda da aktif kaspazlar 3 ve 7, DNA hasarına tepki olarak poli ADP-riboz polimeraz 1'i (PARP1) ayırır. Hedeflenen programlanmış hücre ölümü, esas olarak apoptoz ve otofajinin manipülasyonunu içeren kanserle mücadelede umut verici bir yaklaşım haline gelmiştir [9]. Flowsitometrik analiz ile *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirledikten sonra apoptoz sinyalinin ekstrinsik ve/veya intrinsik yollardan hangisini aktifleştirdiği spektroflorometrik kaspaz aktivitesi yöntemi ile belirlendi. Elde edilen sonuçlarda, intrinsik yoldaki başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'un ve hücresel substratların kesiminden sorumlu kaspazlardan kaspaz 3 ve 7'nin de artması *C. hermannii* ekstresinin HeLa hücrelerinde apoptozu intrinsik yolla indüklendiğini ortaya koymaktadır (Tablo 4.8).

Son olarak, HeLa hücrelerinde *C. hermannii* ekstresinin uygulanmasından sonra 48. saatte meydana gelen apoptoz sürecinde apoptotik genlerin aynı zamanda nekrotik ve otofajik genlerinde anlatım seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen sonuçlar, *C. hermanni* ekstresinin 100 μg/mL ve IC_{50} (15,74 μg/mL) konsantrasyonlarının uygulandığı HeLa hücrelerindeki proapoptotik genler olan *FAS, HRK, TNFRSF10B*'nin ekspresyonundaki anlamlı artış apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yolla indüklediği fikrini desteklemektedir. Aynı zamanda, ekstrenin her iki konsantrasyonunda da otafajik genlerden *BECN*'in ekspresyonunda artış olurken diğer otofajik genler olan *ATG3* ve *ATG5*'in ekspresyonunun *C. hermanni* ekstresinin 100 μg/mL konsantrasyonunda artmış olması

konsantrasyona bağlı apoptoza eşlik eden otofajik bir süreci ortaya koymaktadır. Nekroz, apoptoz ile ilişkili olarak ortaya çıkabilmektedir. RIP bir serin-treonin kinaz olup, TNF tarafından nükleer faktör κB'nin (NF-κB) aktivasyonu için gerekli bir bileşendir, ancak aşırı ekspresyonu da sürekli olarak hücre ölümüne yol açar. RIP, FAS tetiklemeli hücre ölümünün doğrudan aşağı yönde aracı olan kaspaz-8 ile birlikte ikinci enzimi oluşturur. RIP'in kinaz aktivitesi, vazgeçilmez olan ölüm destekleyici özellikte olduğu bilinmektedir [60]. *RIPK* geninin aşırı ekspresyonu (özellikle *C. hermanni* ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonundaki fazla artışı) FAS üzerinden hem ekstrinsik apoptozun hem de *RIPK*'nın fazla ekspresyonu ile nekrozun aktif hale geldiğini düşündürmektedir. Buna göre, *C. hermanni* ekstresinin HeLa hücrelerine uygulandıktan sonra 48. saatteki anlatım seviyeleri araştırılan üç ölüm tipine ait genlerin yukarı regülasyonuna ilişkin elde edilen sonuçlar, HeLa hücrelerine seçici sitotoksisiteye sahip *C. hermanni* ekstresinin başta apoptoz olmak üzere nekroz ve otofaji ölüm mekanizmalarını da çalıştırdığını ortaya koymaktadır.

Centaurea türlerinin flavonoidler ve seskiterpen laktonlar açısından zengin olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda, *Centaurea* türlerinin antiproliferatif aktivitesi üzerine çalışmalar sıklıkla yapılmaktadır. Farklı *Centaurea* türleri üzerinde yapılan önceki antiproliferatif aktivite çalışmalarında, flavonoidler ve terpenoidler açısından zengin olan bu türlerin kloroform ekstrelerinin genel olarak antikanser aktivitelerinin olduğu bulunmuştur. *Centaurea ainetensis* ekstrelerinin sitotoksik aktivitesi, insan kolon karsinom hücrelerinde çalışılmıştır. *Centaurea ainetensis*'in ham ekstresinin, bir dizi kolon türevi kanser hücresinin proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur. 1, 2-dimetilhidrazinin (güçlü bir karsinojen) deri altı enjeksiyonunun uygulanmasından önce intraperitoneal olarak uygulanan ham ekstraktlarda, tümörlerin sayısının azaldığı ve ayrıca aberran kript odaklarının ortalama büyüklüğünün de azaldığı tespit edilmiştir. Ham ekstrenin fraksiyonasyon çalışmaları, kolon kanserindeki büyüme inhibisyonundan sorumlu olabileceği düşünülen Salograviolide-A adı verilen biyoaktif seskiterpen lakton molekülünün izolasyonu ve karakterizasyonu ile sonuçlanmıştır. Salagraviolide-A normal insan bağırsak hücrelerine uygulandığında sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda kolon kanseri hücrelerinin büyümesini azaltmaktadır. Salograviolide A'nın ayrıca epidermal skuamöz hücreli karsinogenezise karşı güçlü sitotoksik etki gösterdiği de ortaya konulmuştur [61]. *Centaurea zuccariniana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen seskiterpen laktonların farklı insan kanser hücre hatlarında (DLD1, SF268, Mcf-7, H460, OVCAR3) *in vitro* sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ortaya

konulmuştur [62]. *Centaurea calolepis* bitkisinden izole edilen "cnicin" sekonder metabolitinin, Vero hücre hattına sitotoksik olmayıp LLC-PK11; domuz böbrek epitel hücre hattı (IC_{50}:23 μM) hücrelerine düşük sitotoksisite gösterirken kanser hücrelerinden SK-MEL (IC_{50}: 14 μM) ve BT-549 (IC_{50}:18 μM)'a sitotoksisite gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada ise bu metabolitin Mcf-7 (meme kanseri) ve OVCAR3 (yumurtalık kanseri)'e karşı sitotoksik olduğu ortaya konulmuştur [63]. Diğer bir çalışma da ise *Centaurea spinosa* bitkisinden izole edilen seskiterpen laktonlardan elemanolid çalışmadaki tüm hücre hatlarında (SF269 için IC_{50} değeri 7.7 μM, Mcf-7 için IC_{50} değeri 10 μM, H460 için IC_{50} değeri 37 μM ve OVCAR3 için IC_{50} değeri 4.7 μM) sitotoksisite gösterdiği ve OVCAR3 hücre hattında ise 5 μM'nin altında önemli bir sitotoksisite sergilediği ortaya konulmuştur [64].

C. kilaea'nin antitümoral aktivitesi daha önce yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [40,41]. *Centaurea hermannii*, Türkiye ve Bulgaristan için endemik olup Türkiye'de sadece Çatalca Yarımadası ve Ömerli havzasında bulunmaktadır [42]. *C. hermannii* bitkisinin diğer *Centaurea* türleri gibi seskiterpen laktonlar açısından zengin olduğu ortaya konulmuş olup biyolojik aktivitesine ilişkin herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

İki yeni alkaloid, schischkinnin ve montamin *Centaurea schischkinii* ve *Centaurea montana* tohumlarından izole edilmiştir. Her iki alkaloid, insan kolon kanseri hücrelerine karşı önemli sitotoksisite sergilemiştir. Schischkinnin ve montaminin benzersiz yapısal özellikleri, gelişmiş antikanser aktivitesi olan bileşiklerin üretilmesi için bir şablon olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, antikanser ajanlar olarak kullanımları için daha fazla araştırma gereklidir. Sonuç olarak, antikanser aktiviteye sahip bitki özleri ve bunların içinde bulunan biyoaktif bileşikler faydalı bilgileri için taranmalıdır [1,28].

Modern Batı tıbbında, cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve immünoterapi, klinikte kanser tedavisi için tercih edilen seçeneklerdir. Bununla birlikte, zayıf müdahaleler, ilaç direnci ya da bu müdahalelerin toksik yan etkileri, terapinin ilerlemesini engellemiş ve hastaları geç evre kanseri sebebi ile kurtaramamıştır. Bu nedenle, daha güvenli ve etkili antikanser stratejisi ortaya koymak, insan sağlığı için en büyük zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserin ilerlemesini durdurmak için daha az yan etki ile daha güçlü ilaçlar bulmak için büyük çabalar sarf edilmektedir. Doğal ürünler, doğal bir kaynak olarak veya kimyasal modifikasyonlardan sonra, bu tür ilaçlar için değerli bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Fitokimyasallar,

özellikle kanserin önlenmesinde çok önemli bir rol üstlenmiş olup bitki özlerinin temel bileşenleridir. Bitkisel ekstraktlar, kanser hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu ile ilgili önemli sonuçlar ortaya koymuşlardır ve bu da potansiyel antikanser ajanları olarak daha fazla çalışılmalarının nedenini göstermektedir. Günümüzde klinik kullanımı olan ajanların bazılarında ortaya çıkan çok ciddi yan etkiler (ör., doxorubicin'in kardiyotoksisite ve ikincil habis tümörlere neden olması gibi) doğal kaynaklardan kanser hücrelerine karşı seçici etkinliği olan, normal hücrelere karşı çok az veya hiç toksisite göstermeyen ajanların ortaya konmasının önemini açıklayan bir fenomen olarak karşımıza çıkmaktadır. Son zamanlarda, kanserleri tedavi etmek için bitkisel preparatlar kullanmak, şaşırtıcı etkinliği ve düşük düzeydeki yan etkileri nedeniyle giderek daha fazla dikkat çekmektedir [65,66,67].

Yapılan literatür taramalarında *C. hermannii* bitkisi ile ilgili herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasının daha önce ortaya konulmamış olması ve ilk defa *in vitro* antikanser ve apoptotik aktivitesinin bu tez çalışması tarafından ortaya konulması çalışmamızın özgün yönünü oluşturmaktadır. Çalışmamız sonucunda ortaya çıkan ve özellikle de standart olarak kullanılan çoğu kemoterapötik onaylı ilaçlardan çok daha yüksek seçicilik indeksine sahip *C. hermannii* ekstresinin başta serviks kanseri tedavisi için potansiyel olarak aktif yeni bir ilacı temsil edebileceğini ve umut veren sitotoksik ve apoptotik aktivitesi nedeniyle daha fazla çalışmayı destekleyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, MTT analizleri sonucu normal transforme Vero hücre hattında mitotik etki gösteren *Crataegus orientalis* ve *Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* ekstrelerinin 3 farklı (A549, Mcf-7 ve HeLa) kanser hücre hattında da konsantrasyon artışına paralel olarak değişik oranlarda sitotoksisite göstermeleri önemli olup bu bitkilerin de potansiyel antikanserojen içeren aday bitkiler olabileceğini düşündürmektedir. Bu ümit vadeden sonuçlar doğrultusunda *C. hermannii* bitkisinin metabolitlerinin izolasyonu, sitotoksik ve apoptotik aktiviteden sorumlu molekül ya da moleküllerin ortaya konması ve etkili mekanizmanın aydınlatılması için çalışmalar planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

[1]. Kharb, M., Jat, R.K. & Gupta, A., 2012, Areview on Medicinal Plants Used as a Source of Anticancer Agents, *International Journal of Drug Research and Technology*, 2(2), 177-183.

[2]. Ovais, M., Khalil, A.T., Raza, A., Khan, M.A., Ahmad, I., Islam, N.U., Saravanan, M., Ubaid, M.F., Ali, M. & Shinwari, Z.K., 2016, Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: begining a new era in cancer theranostics, *Nanomedicine (Lond)*, 11(23), 3157-3177.

[3]. Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O.A., Baltacı, D., Oktay, M. &Çolakoğlu, S., 2012, Apoptozis Hakkında Bilinenler, *Duzce Medical Journal*, 14(2), 87-101.

[4]. Wamidh, H.T. & Mahasneh, A.M., 2010, Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine, *Scientia Pharmaceutica*, 78, 33-45.

[5]. Reddy, A.R.K & Grace, J.R., 2016, Anticancer Activity of Metanolic Extracts of Selected Mangrove Plants, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(9), 3852-3856.

[6]. Smina, T.P., Nitha, B., Devasagayam, T.P.A. & Janardhanan, K.K., 2016, *Ganoderma lucidum* total triterpenes induce apoptosis in MCF-7 cells and attenuate DMBA induced mammary and skin carcinomas in experimental animals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis*, 813, 45-51.

[7]. Siegel, R.L., Miller, K.D.& Ahmedin Jemal, D.V.M., 2016, Cancer Statistics, 2016, *A Cancer Journal for Clinicians*, 66, 7-30.

[8]. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F., 2014, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International Journal of Cancer*, 136, 359-386.

[9]. Yin-Tao, Y., Wei, Z., Pei, S., Dong, W., Chen, W., Li-Min, H. & Jun-Qiang, Q., 2016, Apoptosis induced by the methanol extract of Salvia miltiorrhiza Bunge in non-small cell lung cancer through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt pathway, *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 107-116.

[10]. Hongwei, G., Hua, L., Hebao, Y., Yudui, X., Pan, S., Xin, H., Yi, L., Xia, L., Evan, T.K., Duxin, S., Jiagang, D. & Jian, Z., 2017, Litchi seed extracts diminish prostate cancer progression via induction of apoptosis and attenuation of EMT through Akt/GSK-3β signaling, *Nature Scientific Reports*, 7, 41656.

[11]. Graidist, P., Martla, M. & Sukpondma, Y., 2015, Cytotoxic Activity of *Piper cubeba* Extract in Breast Cancer Cell Lines, *Nutrients*, 7, 2707-2718.

[12]. Oral, A.Y., Cevatemre, B., Sarimahmut, M, Icsel, C., Yilmaz, V.T. & Ulukaya, E., 2015, Anti-growth of a novel trans-dichloridobis[2-(2-hydroxyethyl)pyridine]platinum (II) complex via induction of apoptosis on breast cancer cell lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 4303-4310.

[13]. Samarghandian, S., Mohsen, A.N., Abasalt, B., Hasanzadeh, M., Jabbari, F., Farkhondeh, T. & Samini, M., 2016, Inhibitory and Cytotoxic Activities of Chrysin on Human Breast Adenocarcinoma Cells by Induction of Apoptosis, *Pharmacognosy Magazine*, 12(4), 436-440.

[14]. Pariente, R., Pariente, J.A., Rodriguez, A.B. & Espino J., 2015, Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplantin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stres and DNA fragmentation, *Journal of Pineal Research*, 60, 55-64.

[15]. Stewart, B.W. &Wild, C.P., 2014, World Cancer Report 2014, *International Agency for Research on Cancer*, ISBN 978-92-832-0443-5.

[16]. Pazarbaşı, A. & Kasap, M., 2003, Kanser Genetiği, *Arşiv Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı* , 12: 328-340.

[17]. Elmore, S., 2007, Apoptosis: A review of Proggrammed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516.

18]. Senzer, N., 2017, Molecular Data Analysis: Blocking Specific Pathways, https://www.marycrowley.org/groundbreaking-research/cancer-pathways/

[19]. Doğan, A.L. & Güç, D., 2004, Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.

[20]. Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V. & Vadenabeele, P., 2009, Major cell death pathways at a glance, *Microbes and Infection*, 11, 1050-1062.

[21]. Green, D.R., Llambi, F., 2015, Cell Death Signaling, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7, 1-24.

[22]. Saikumar, P. & Venkatachalam, M.A., 2009, Apoptosis and Cell Death, *Basic Concepts of Molecular Pathology Cagle, P.T., Allen, T.C. Springer*, Chapter 4, 29-40

[23]. Vural, F., Cebesoy, S. & Karakas, M., 2013, Classification of Cell Death, *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1(5), 120-126.

[24]. Goldar, s., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M. & Badaran, B., 2016, Molecular Mechanisms of Apoptosis ans Roles in Cancer Development and Treatment, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 2129-2144.

[25]. Hongli, G., Jianghua, L. &Zi, Y., 2017, *In vitro* anticancer effect of hypocrellin B in SiHa human cervical cancer cells through the caspases, *Biomedial Research*, 28(1), 429-434.

[26]. Yılmaz, İ., 2005, Uzmanlık Tezi: Erişkin Ratlarda Deneysel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi, T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.

[27]. Greenwell, M. & Rahman, P.K.S.M., 2015, Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment, *International Journal of Pharmaceutical Science Research*, 6(10), 4103-4112.

[28]. Sultana, S., Asif, H.M., Nazar, H.M.I., Akhtar, N., Rehman, J.U. & Rehman, R.U., 2014, Medicinal Plants Combating Against Cancer- a Green Anticancer Approach, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 4385-4394.

[29]. Yildirim, F., Memis, Y., Ozturk, A, Caliskan, Z., Savran, A. & Abdullah, M.I.,2017, Antimicrobial Activity of the Essential Oil and the Extracts of Kitaibelia balansae Spcies, *Jounal of Essential Oil Bearing Plants*, 30(3), 809-819.

[30]. Dalar, A., Türker, M. & Konczak, I., 2012, Antioxidant capacity and phenolic cpnstituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. From Eastern Anatolia Region of Turkey, *Journal of Herbal Medicine*, 2, 42-51.

[31]. Beara, I.N., Lesjak, M.M., Orcic, D.Z., Simin, N.D., Cetojevic-Simin, D.D., Bozin, B.N. & Mimica-Dukic, N.M., 2012, Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-imflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L.,LWT- Food Science and Technology, 47, 64-70.

[32]. Karakaş, F.P., Yıldırım, A. & Türker, A., 2012, Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities, *Turkish Journal of Biology*, 36, 641-652.

[33]. Abate, L., Abebe, A. & Mekonnen, A., 2017, Studies on antioxidant and antibacterial activities of crude extracts of Plantago lanceolata leaves, *Chemistry International*, 3(3), 277-287.

[34]. Mazzutti, S., Riehl, C.A.S., Ibanez, E. & Ferreira, S.R.S., 2017, Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*, *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 211-220.

[35]. Hatipoğlu, Ö., Sağlam, M., Köseoğlu, S., Köksal, E., Keleş, A. & Esen, H.H., 2015, The Effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber. (Hawthorn) Extract Administration in Preventing Alveolar Bone Loss in Rats with Experimental Periodontitis, *PLoS ONE*, 10(6), 1-11.

[36]. Kalantari, H., Hemmati, A.A., Goudarzi, M., Forouzandeh, H., Kalantar, M., Aghel, N., Aslani, M.K. & Ehsan, T.S., 2016, Healing Effect of Hawthorn (Crataegus pontica C. Koch) Leaf Extrct in Dermal Toxicity Induced by T-2 Toxin in Rabbit, Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 11(3), 1-7.

[37]. Korkmaz, M., Karakuş, S., Özçelik, H. & Selvi, S., 2016, An ethnobotanical study on medicinal plants in Erzincan, Turkey, *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 15(2), 192-202.

[38]. Yaylıoglu, A.S:, Eser, F., Tekin, S. & Onal, A., 2015, Antiproliferative activities of several plant extracts from Turkey on rat brain tumor and human cervix carcinoma cell lines, *Frontiers in Life Science*, 9(1), 69-74.

[39]. Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S. & Iranshahi, M., 2018, Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo, *Natural Product Research*, 32(12), 1436-1440.

[40]. Sen, A., Ozbas, S.T., Akbuga, J. & Bitis, L., 2015, *In vitro* Antiproliferative Activity of Endemic *Centaurea kilaea* Boiss. Against Human Tumor Cell Lines, *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3), 149-153.

[41]. Sen, A., Turan, A.O. & Bitis, L., 2017, Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*, *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 541-546.

[42]. Eroglu, H.K., Ozyigit, I.I., Altay, V. & Yarci, C., 2014, Autecological Characteristics of *Centaurea Hermannii* F. Herm an Endemic Species from Turkey, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(1), 183-187.

[43]. Tokur, O. & Aksoy, A., 2017, In vitro Sitotoksisite Testleri, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.

[44]. Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

[45]. Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Munoz-Capo, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J.C., Lopez, B., Marcus, T.F., Fueyo, L., Suquia, A.G., Rubio, F., Ramos, R. & Besaldusch, J., 2014, XCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies, *Onco Targets and Therapy*, 4(7), 985-994.

[46]. Deniz, G.& Demirel, G.Y., 2014, Akan Hücre Ölçer, *Yelken Ajans Reklamcılık, Yayıncılık ve Matbaacılık*, ISBN: 978-86462-3-0

[47]. Güleş, Ö., & Eren, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.

[48]. Günel, T. & Aydınlı, K., 2009, "Real-Time PCR" ve Uygulama Alanları, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2(2), 43-45.

[49]. Karakas, D., Cevatemre, B., Aztopal, N., Ari, F., Yilmaz, V.T. & Ulukaya, E., 2015, Addition of niclosamide to palladium(II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 5580-5586.

[50]. Chauhan, S.S., Singh, A.K., Meena, S.,Lohani, M., Singh, A., Arya, R.K., Cheruvu, S.H., Sarkar, J., Gayen, J.R., Datta, D. & Chauhan, P.M.S., 2014, Synthesis of novel β-carboline based chalcones with high cytotoxic activity against breast cancer cells, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24, 2820-2824.

[51]. Kuppusamy, P., Ichwan, S.J.A., Al-Zikri, P.N.H., Suriyah, W.H., Soundharrajan, PI., Govindan, N., Maniam, G.P. & Yusoff, M.M., 2016, In vitro Anticancer Activity of Au, Ag Nanoparticles Synthesized Using Commelina nudiflora L. Aqueous Extract Against HCT-116 Colon Cancer Cells, Biological Trace Element Research, 173, 297-305.

[52]. Tanvi, P.D., Nilanjan, G., Chandrasker, V.M. & Rajendra, S.V., 2016, Aqueous Extract of Aerial Parts of Centella asiatica Arrests Cells Cycle at G0/G1 on Colorectal Cancer Cell Lines, Journal of Pharmaceutical Research, 15(2), 45-50.

[53]. Appiah-Opong, R., Tuffour, I., Annor, G.K., Blankson-Darku, A.D., Cramer, P., Kissi-Twum, A.A., Uto, T. & Ocloo, A., 2016, Antiproliferative, Antioxidant Activities and Apoptosis Induction by Morinda lucida and Taraxacum officinale in Human HL-60 Leukemia Cells, Journal of Global Biosciences, 5 (7), 4281-4291.

[54]. Demir, S., Turan, İ., Aliyazicioglu, Y., Kilinc, K., Ozer-Yaman, S., Ayazoglu-Demir, E., Arslan, A., Mentese, A. & Deger, O., 2016, Morus Rubra Extract Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Through Endoplasmic Reticulum Stress and Telomerase, *Nutrition and Cancer*, 69(1), 74-83.

[55]. Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Nonpunya, A., Sripanidkulchai, B., Thitimetharoch, T., 2011, Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line, *Chinese Medicine*, 6(1), 39-47.

[56]. Badisa R.B., Mina, D.A., Latinwo, L.M. & Soliman, K.F.A, 2014, Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4Phenylpyridinium on Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cell, Anticancer Research, 34(10), 5447-5452.

[57]. Awang, N., Aziz, Z.A., Kamaludin, N.F., Chan, K.M., 2014, Cytotoxicity and mode of cell death induced by Triphenyltin (IV) compounds *in vitro*, *Jounal of Biological Sciences*, 14 (2), 84-93.

[58]. Huczynski, A., Rutkowski, J., Borowicz, I., Wietrzyk, J., Maj, E. & Brezinski, B., 2003, One-pot synthesis and cytotixicity studies of new Mamich bas derivatives of polyether antibiotic-Lasalocid acid, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 5053-5056.

[59]. Mena-Rejon, G., Camaal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J. &Moo-Puc, R., 2008, *In vitro* cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 462-465.

[60]. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B. & Tschopp, J., 2000, Fas triggers an alternative, caspase-8 independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule, *Nature*, 1(6), 489-495.

[61]. Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P. & Ajeet, 2013, Anticancer Potential of Plants and Natural Products: Review, *American Journal of Pharmacological Sciences*, 1(6), 104-115.

[62]. Koukoulitsa, E., Skaltsa, H., Karioti, A., Demetzos, C. & Dines, K., 2002, Bioactive Sesquiterpene Lactones from *Centaurea* Species and their Cytotoxic/Cytostatic Activity Against Humal Cell Lines *in vitro*, *Planta Medica*, 68, 649-652.

[63]. Erel, S.B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S. & Krenn, L., 2011, Secondary metabolites of *Centaurea calolepsis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic activities, *Pharmaceutical Biology*, 49(8), 840-845.

[64]. Saroglou, V., Karioi, A., Demetzos, C., Dimas, K. &Skaltsa, H., 2005, Sesquiterpene Lactones from *Centaurea spinosa* and their Antibacterial and Cytotoxic Activities, *Journal of Natural Products*, 68(9), 1404-1407.

[65]. Jianping, J., Bo, W., Jing, L., Baodong, Y., Shengyun, L., Wenbin, Q., Letian, S. & Efferth, T., 2017, Total coumarins of *Hedyotis diffusa* induces apoptosis of myelodysplastic syndrome SKM-1 cells by activation of caspases and inhibition of PI3K/Akt pathway proteins, *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 253-260.

[66]. Roleira, F.M.F, Varela, C.L., Costa, S.C., Taveres da Silva, E.J., 2018, Studies in Natural Products Chemistry, *Elsevier*, Vol. 57, Chapter 4, 115-153.

[67]. Weldon, D.J., Saulsbury, M.D., Goh, J., Rowland, L., Campbell, P., Robinson, L., Miller, C., Christian, J., Amis, L., Taylor, N., Dill, C., Dawis Jr., W., Evans, S.L. & Brantley, E., 2014, One-pot synthesis of cinnamylideneacetophenones and their *in vitro* cytotoxicity in breast cancer cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 3381-3384.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Fulya Tuğba ARTUN
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	08.01.1985
Uyruğu	x T.C. ❒ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	artunfulyatugba@ogr.iu.edu.tr
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fakülte	Eğitim Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	04.06.2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler

2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Kayseri/Türkiye, 8-11 Kasım 2017, Poster Sunumu

Artun, F. T., Karagoz, A., Zeybek, Z., Ustunturk-Onan, M., G., Melikoglu, G., Anıl, S., Kultur, S. (2016). Evaluation of Antibacterial Activity of Some Plant Methanolic Extracts. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25.

Artun, F. T., Karagoz, A., Ozcan, G., Melikoglu, G., Anil, S., Kultur, S., & Sutlupinar, N. 2016). In vitro anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *Journal of B.U.ON.*, 21(3), 720-725.

Demirgan, R., Karagöz, A., Pekmez, M., Önay-Uçar, E., Artun, F. T., Gürer, Ç., & Mat, A. (2016). IN VITRO ANTICANCER ACTIVITY AND CYTOTOXICITY OF SOME PAPAVER ALKALOIDS ON CANCER AND NORMAL CELL LINES. *African Journal of Traditional, Complementary & Alternative Medicines*, 13(3), 22-26. http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v13i3.3

Karagöz, A., Artun, F. T., Özcan, G., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., & Sütlüpınar, N. (2015). In vitro evaluation of antioxidant activity of some plant methanol extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1184-1189. http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1080600