

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Caco-2 HÜCRE HATLARI ARACILIĞI İLE
OLUŞAN ANJİOGENEZİN
HİPERFORİN YOLUYLA İNHİBİSYONU**

UZMANLIK TEZİ
DR. NACİYE KILIÇARSLAN

DANIŞMAN
PROF. DR. ÇİĞDEM YENİSEY

AYDIN-2011

Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TPF-10021 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen, bilimsel konularda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY olmak üzere, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı Sorumlusu Sayın Prof. Dr. Aslıhan KARUL ve Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mukadder SERTER'e;

Eğitimim süresince bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, kısa bir süre önce emekli olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINIŞIK'a;

Çalışmamızda kullandığımız hiperforini hediye olarak gönderen Leipzig Üniversitesi Kimya ve Mineraloji Fakültesi Organik Kimya Enstitüsü'nden Sayın Prof. Dr. Athanassios GIANNIS'e;

Çalışmamızda kullandığımız Huvec primer hücre hatlarını hediye eden GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Tıbbi ve Kanser Araştırma Merkezi Sorumlusu İç Hastalıkları ve Hematoloji Uzmanı Sayın Prof. Dr. Ali Uygur URAL'a;

Tezimin hücre kültürü uygulamalarını yaptığım sürede teknik desteğinden ve bilgisinden faydalandığım Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nın Müdürü Sayın Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya, yine bu süreçte bilgisini ve emeğini benden esirgemeyen Sayın Uzman Biyolog Necati GÜNAY'a yardımı ve sabrı için ;

Uzmanlık eğitimim süresince saygı, sevgi çerçevesinde ve uyum içinde birlikte birlikte çalıştığım Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma;

Tüm hayatım boyunca her konuda ve her zaman; bıkmadan, yorulmadan bana destek olan Sevgili Babam Osman ÇEVİK ve Sevgili Annem Meliha ÇEVİK'e;

Ayrıca tüm asistanlık sürem boyunca bana her konuda destek olan Sevgili Eşim Ünal KILIÇARSLAN'a ve Biricik Oğlum Görkem KILIÇARSLAN'a

Teşekkür ederim.

Dr. Naciye KILIÇARSLAN

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2. 1. Bazal membranın yapısı ve fonksiyonel komponentleri	1
2. 2. Anjiogenez	3
2. 2. 1. Fizyolojik ve patolojik anjiogenez	5
2. 2. 2. Matrijel ve matrijelde tüp benzeri yapılarının oluşturulması	7
2. 2. 2. 1. <i>Matrijel</i>	7
2. 2. 2. 2. <i>Matrijelde tüp benzeri yapılar oluşumu</i>	7
2. 2. 3. Anjiogenezin Kontrolünün Kansere Tedavisindeki Önemi	9
2. 3. Apoptoz: Programlı hücre ölümü	11
2. 3. 1. Apoptozun rol aldığı fizyolojik ve patolojik olaylar	12
2. 3. 2. Apoptozu etkileyen uyarılar	13
2. 3. 3. Apoptoz süreci	14
2. 4. Hypericum perforatum	16
2. 4. 1. Hypericum perforatum'un aktif bileşikleri	18
2. 4. 1. 1. <i>Hiperforin</i>	19
2. 4. 1. 1. 1. <i>Hiperforinin tanımlanmış biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları</i>	19
2. 4. 1. 1. 1. 1. <i>Antidepresan etki</i>	20
2. 4. 1. 1. 1. 2. <i>Diğer nörolojik etkiler</i>	21
2. 4. 1. 1. 1. 3. <i>Antienflamatuvar-proenflamatuvar etki</i>	21
2. 4. 1. 1. 1. 4. <i>Antibakteriyel etki</i>	22
2. 4. 1. 1. 1. 5. <i>Antitümöral etki</i>	22
2. 4. 1. 1. 1. 6. <i>Antikarsinojenik etki</i>	22
2. 4. 1. 1. 1. 7. <i>Antiproliferatif etki</i>	23

2. 4. 1. 1. 1. 8.	<i>Proapoptotik etki</i>	23
2. 4. 1. 1. 1. 9.	<i>Antiinvaziv ve antimetastatik etki</i>	24
2. 4. 1. 1. 1. 10.	<i>Antianjiogenik etki</i>	24
3. AMAÇ		25
4. MATERYAL VE YÖNTEM		25
4. 1. Materyal		25
4. 1. 1. Huvec hücre hatları		25
4. 1. 2. Caco-2 hücreleri		26
4. 1. 3. Matrijel		26
4. 1. 4. Hiperforin		27
4. 1. 5. Hücre kültüründe kullanılan cihazlar		28
4. 1. 6. Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri		29
4. 2. Yöntemler		30
4. 2. 1. Donmuş hücrelerin çözündürülmesi		30
4. 2. 2. Caco-2 hücrelerinden ortam besiyeri (conditioned medium) elde edilmesi		30
4. 2. 3. Huvec besiyeri içeriği ve hazırlanması		30
4. 2. 4. Caco-2 hücreleri besiyerinin hazırlanması		31
4. 2. 5. Hücrelerin pasajlanması (Bölünmesi)		31
4. 2. 6. Hücre sayısının (ml'de) hesaplanması		32
4. 2. 7. Caco-2 hücrelerinde hiperforinin oluşturduğu apoptozun saptanması		32
4. 2. 8. İn vitro tüp benzeri yapıların oluşturulması		35

4. 2. 8. 1. <i>Caco-2 hücreleri ile tüp benzeri yapılarının oluşturulması</i>	36
4. 2. 8. 2. <i>Caco-2 hücrelerinden elde edilen ortam besiyeriyle tüp benzeri yapıların oluşturması</i>	37
4. 2. 9. Hücre canlılığının saptanması	38
4. 2. 10. Proliferasyon deneyi	39
5. BULGULAR	
5. 1. Caco-2 hücreleri ile indüklenen tüp benzeri yapı oluşumunun hiperforin ile inhibisyonu	40
5. 2. Hiperforinin Caco-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi	42
5. 3. Hiperforinin Caco-2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi	46
5. 4. Hiperforinin Caco-2 hücrelerinin canlılığına etkisi	48
6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER	49
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	49
8. ÖZET	53
9. SUMMARY	54
10. KAYNAKLAR	55

RESİMLER

Resim 1	Huvec hücreleri ile tüp yapılarının oluşturulması-1	8
Resim 2	Huvec hücreleri ile tüp yapılarının oluşturulması-2	9
Resim 3	NuNu farelerinin sırtına tumor hücrelerinin insert edilmesi sonucunda yeni kan damarlarının oluşması (anjiogenez)	10
Resim 4	NuNu farelerin sırtlarına içinde HeLa (serviks karsinom) hücreleri bulunan insertlerin yerleştirilmesi ile elde edilen damarlanma görünümü	11
Resim 5	A. Apoptoza uğramış lökosit hücresi;	14
	B. Apoptoza uğramış hücrede çekirdeğin parçalanması	14
Resim 6	Hypericum perforatum bitkisinin yaprak görüntüleri	17
Resim 7	Hypericum perforatum bitkisinin çiçek görüntüsü	18
Resim 8	Huvec hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü	26
Resim 9	Caco-2 hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü	26
Resim 10	Bazal membran	27
Resim 11	Matrijeldeki tüp benzeri yapılar	27
Resim 12	Hiperforin ekstresi	28
Resim 13	Ticari olarak alınan APOpercentage kiti	33
Resim 14	Boya eklenen ve inkübasyona bırakılan kuyucuklar	34
Resim 15	Apoptotik hücrelerin mikroskop görünümüne örnek	34
Resim 16	Kuyucuklara boya salıcı eklendikten sonraki görünüm	35
Resim 17	Caco-2 hücrelerinin, matrijel içeren 24 kuyucuklu plakta ekilmiş hali	37
Resim 18	Huvec + Caco-2 (50.000 hücre/ml)	40
Resim 19	Huvec + Caco-2 +15 μ M hiperforin	40
Resim 20	Huvec + Caco-2 +30 μ M hiperforin	41
Resim 21	Huvec + Caco-2 +60 μ M hiperforin	41

Resim 22	Huvec + Caco-2 +90 μ M hiperforin	42
Resim 23	Caco-2 hücreleri (kontrol)	43
Resim 24	15 μ M hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri	43
Resim 25	30 μ M hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri	44
Resim 26	60 μ M hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri	44
Resim 27	90 μ M hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri	45
Resim 28	90 μ M hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri (tüm objektif sahası görünümü)	45

ŞEKİLLER

Şekil 1	Damar yapısı ve anjiogenez	2
Şekil 2	Tümöral uyarı sonucu oluşan anjiogenezin şematik olarak gösterilişi	3
Şekil 3	Kan damarı duvarı ve anjiogenez	4
Şekil 4	Anjiogenik moleküllerin tümör hücrelerinden çıkış yolları	5
Şekil 5	Tümör büyümesinin kapiller damarlar yoluyla indüklenmesi	10
Şekil 6	Apoptozun gelişimi ve apoptotik cisimlerin yok edilmesi	16
Şekil 7	Floroglusinollerden hiperforin'in kimyasal yapısı	19
Şekil 8	Hiperforinin tanımlanmış biyolojik etkileri ve etki mekanizması	20
Şekil 9	Tübe benzer yapıların oluşturulması deneyinin şematik gösterilmesi	36
Şekil 10	Caco-2 hücrelerinin hiperforin yoluyla apoptozu	46
Şekil 11	Caco-2 hücrelerinden elde edilen ortam besiyerinin farklı konsantrasyonlarının Huvec hücrelerinin proliferasyonuna etkisi	47
Şekil 12	Caco-2 hücrelerinden ile indüklenen Huvec hücrelerinin proliferasyonlarına farklı konsantrasyonlardaki hiperforinin etkisi	47
Şekil 13	Caco-2 hücrelerinin canlılığına hiperforinin değişik konsantrasyonlarının etkisi	48

KISALTMALAR

BSA	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
Caco-2	Kolorektal Karsinom Hücresi
Cyp	Sitokrom
DiOC6	3,3 dihexyloxacarbocyanine iodide
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Dulbecco'nun Tuzlu Fosfat Tamponu (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
EBM	Endotelyal Hücre Temel Besiyeri (Endothelial Cell Basal Medium)
ECGS	Endotelyal Hücre Büyüme Faktörleri (Endothelial Cell Growth Supplement)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetat
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Tümör Hücresi
FBS	Sığır Cenin Serumu (Fetal Bovine Serum)
FCS	Buzağı Cenin Serumu (Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
Huvec	İnsan Umblikal Ven Endotelyal Hücresi (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)
IC₅₀	İnhibe Edici Konsantrasyon 50
ITS	Insulin/Transferrin/Selenium
LEC	Lenfatik Endotelyal Hücre
M199	Medium 199
MMP	Matrix Metallo Peptidaz
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
Rpm	Dakikada Devir Sayısı (Revolution Per Minute)
TGF	Transforme edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
TNF	Tümör Nekroz Faktör
VEGF	Damar Endoteli Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
zVAD. Fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone

1. GİRİŞ

Bitkilerin tedavide kullanımları insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. İnsanoğlu ilk çağlarda, hastalıkları iyileştirebilmek için tabiata ve hayvanlara özellikle de bitkilere yönelmiş, deneme yanılma yöntemi ile bazen etkili ilaçlar bulup onlardan istifade etmiştir. Afyon bitkisinden saflaştırılmış olan morfin, kodein gibi ilaçlar, digoksin ve digitoksin gibi kalp glikozitleri halkın ilaç olarak kullandığı bitkilerden örneklerdir.

Son yıllarda hiperforin maddesinin antineoplastik bir potansiyeli olduğu yönündeki çalışmalar artmış bulunmaktadır. Bu çalışmalar, hiperforinin, antikarsinojenik, antiproliferatif, proapoptotik, antiinvaziv ve antimetastatik etkilerinin araştırılması ve rapor edilmesi şeklindedir. Böylece, bu maddenin bir anjiogenez inhibitörü olarak kullanılması ile ilgili yapılan çalışmalar giderek artmaya başlamıştır.

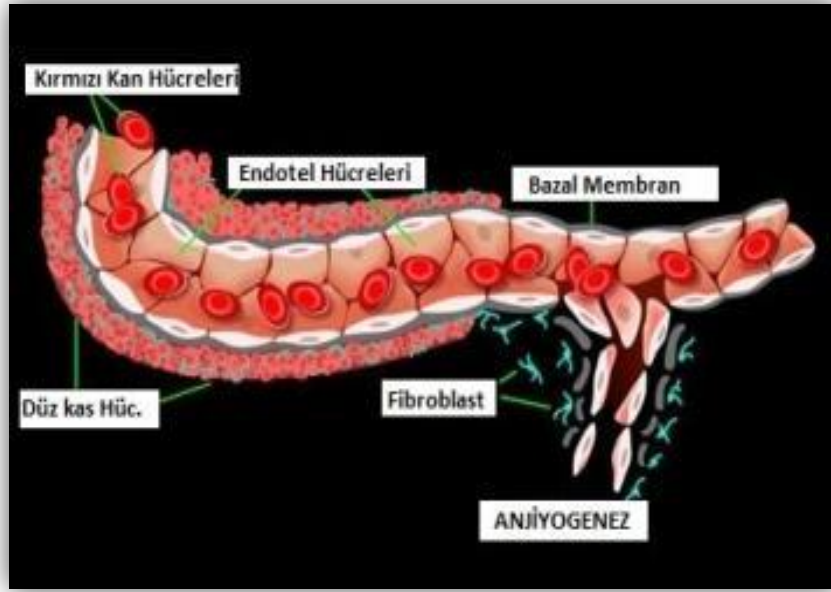
Hiperforin'in insan prokarsinojen-aktif edici enziminin inhibitörü olduğu Schwarz ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu görüş ışığında, araştırmacılar tarafından, hiperforin ekstraktından elde edilen bioaktif bileşiklerin ve yapısal olarak bu madde ile ilgili moleküllerin kanserde kemoterapötik ajanlar olarak değerlendirilebileceği öne sürülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Bazal membranın yapısı ve fonksiyonel komponentleri

İn vivo endotelial hücreler bazallerinde (lümene bakan yüzeyde değil) ince ve oldukça özelleşmiş ekstra sellüler matriks ile bazal membranla temas halindedirler. Bazal membran matriksi endotelial yapıları çepeçevre sarar (Şekil 1). Bazal membran matriksi hücre ve moleküller için bir bariyerdir, farklı dokular arasında bariyerdir, besin ve atıkları filtre eder, ayrıca lümeninden damar duvarına sinyal iletimi için de önemli bir yapıdır. Tümöral hücrelerde ise hem damar içine girişi hem de damar dışına çıkışı engelleyen en önemli yapıdır (1).

Damar bazal membranı non-fibriller kollajen (Tip IV), bir glikoprotein olan laminin, entaktin, fibronektin, perlekan ve kondroitin sülfat proteoglikandan oluşmuş ağ yapısında bir maddedir. Bunların birçok izoformları ve diğer moleküller diğer bazal membran matrikslerinde de vardır ve onların karmaşık yapılarına katkıda bulunur (2).



Şekil 1. Damar yapısı ve anjiogenez (3)

Ayrıca bazal membran matriksinde kollajen VIII, XV, XVIII, heparan sülfat, büyüme faktörleri (FGF, TGF, PDGF, VEGF), matriks metaloproteazları (MMPs), BM40/SPARC/osteonectin, fibulin 1 ve 2, fibronektin de bulunduğu rapor edilmiştir (4).

Farklı dokuların bazal membranlarının elektron mikroskoptaki görüntüleri benzer olmasına rağmen moleküler içerikleri her dokuda farklıdır. Her dokunun farklı bazal membran yapılarının olması o dokuların farklı fonksiyonlarını geliştirmesi açısından önemlidir (4).

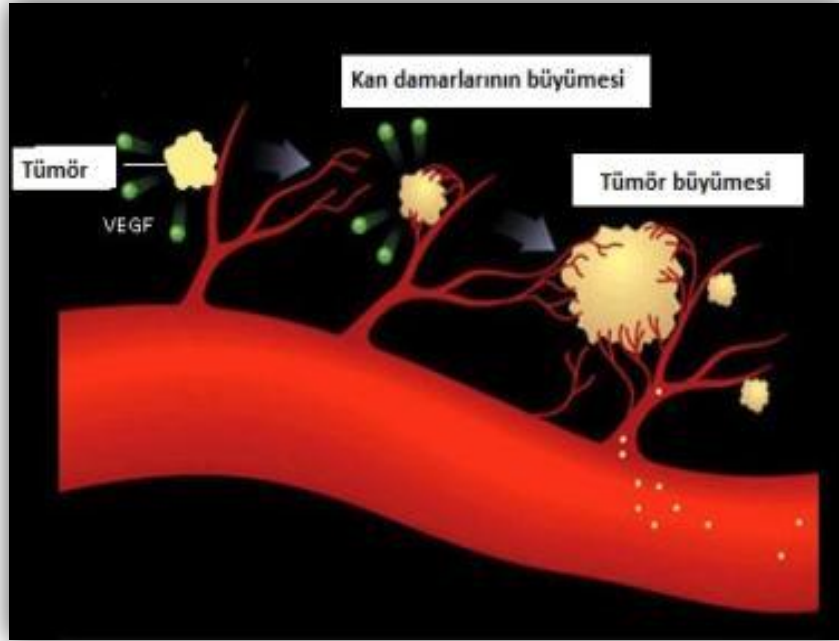
Doku hasarı veya travmaya bağlı olarak bazal membran hasar görürse yukarda sayılan bileşikler anjiogenezi uyarmak ya da inhibe etmek üzere gizli bölümlerini açığa çıkarır ya da aktif şekillerine dönüşürler. Bu yolla bazı ilave düzenleyici faktörler de kullanılabilir hale gelir. Diğer yandan ise depo haldeki büyüme faktörlerinin salınımı da anjiogenezi artıracaktır (4).

Bazal membran içerdiği bu yapısal komponentler ve kritik fonksiyonlarla tüp benzeri yapıların oluşumunda anahtar rol oynar (4).

2. 2. Anjiogenez

Anjiogenez, neovaskularizasyon, hali hazırda var olan kan damarlarından, yeni kan damarlarının oluşumuna verilen ad olup (Şekil 1); ekstrasellüler matriks, solubl faktörler ve hücreler arasındaki etkileşim sonucu; endotelial hücrelerin differansasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir işlemdir (5).

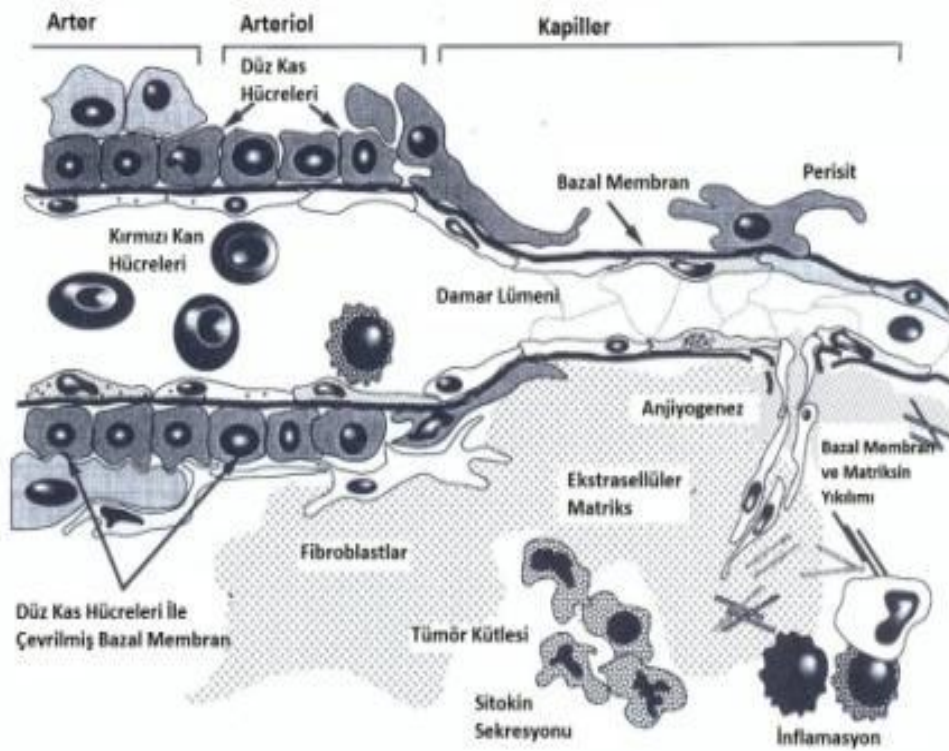
Her ne kadar vasküler sistem genellikle stabil ise de, herhangi yaralanmada veya tümör hücresi oluşumunda hızlıca değişikliğe uğramaktadır. Damarların stabilitesi üç temel hücre tipi tarafından sağlanmakta olup, bunlar endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlardır. Sahip oldukları ekstrasellüler matriks, birçok sitokin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenirler (6).



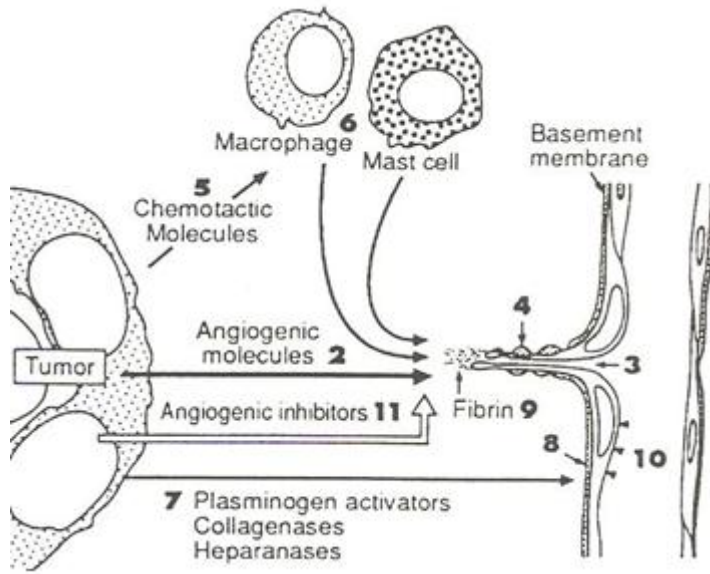
Şekil 2. Tümör uyari sonucu oluşan anjiogenezin şematik olarak gösterilişi (3)

Yeni kan damarları oluşumu, kılcal damar duvarının iç kısmında ve kapiller yataklardan sonra oluşmuş olan, daha küçük damarlarda gerçekleşmektedir. Endotelial hücreler tüm kan damarlarını kaplar ve kapillerin bütünlüğünü sağlar. Yeni damar yapılarının oluşabilmesi için endotelial hücrelerin stabil olarak bulundukları bazal membranı parçalayarak yayılmaları gereklidir. Endotel uyarıldığında ilk olarak proteazlar (yıkıcı enzimler) bazal membranı ve çevresindeki yapısal bileşenleri parçalar. Bir kere bazal membran kırıldıktan sonra tümör hücrelerinden, aktive lenfositlerden veya hasarlı

makrofajlardan salınan anjiogenik uyarıların geldiği tarafa doğru bir endotel hücre göçü başlar ve endotel hücreler yeni damar için gerekli olan hücreleri oluşturmak üzere çoğalırlar ve daha önce göç eden hücreler ile yer değiştirir (Şekil 2). Bu çoğalmanın ardından oluşan yeni endotel hücrelerde üç boyutlu tubuler yapıya dönüşüm ihtiyacı doğar (Şekil 3, 4). Endotel hücreleri yeni damar oluşturmak üzere tekrar organize olmaya başlar ve yeni oluşan damar yapısını korumak üzere yeni bazal membran salgılanır. Bundan sonra damar yapısı stabilize olur. Bazal membranın parçalanması, endotel hücre göçü-çoğalması ve tubuler yapıların oluşumu aşamalarının her biri tümör tedavisi için birer hedeftir ve in vitro ortamda test edilebilir (6;7).



Şekil 3. Kan Damarı Duvarı ve Anjiogenez: Her bir damarda endotel hücreler bazal membran boyunca dizilmiş olarak bulunmaktadır. Anjiogenez başlıca kapillerler ve kapiller sonrası oluşan küçük damarlarda görülmektedir. Sitokinlerin uyarılması sonucunda, endotel hücrelerin bazal membranları yıkıma uğramakta, endotel hücreler damar dışına göç etmekte, çoğalmakta ve yeni bir damar oluşturmak üzere tekrar organize olmaktadır (8).



Şekil 4. Anjiogenik moleküllerin tümör hücrelerinden çıkış yolları. 2. Anjiogenik moleküllerin çıkışı. 3. Endotelial hücre proliferasyon ve migrasyonu. 4. Bazal membran endotelince yeni damar oluşturulması. 5. Makrofaj ve mast hücrelerine kemotaktik etkili tümör kaynaklı faktörler. 6. Makrofaj veya mast hücrelerinden salınan anjiogenezi oluşturan veya artıran faktörler. 7. Tümör ilişkili plazminojen aktivatörleri, kollajenaz ve heparinazlar. 8. Bazal membranda depo haldeki bFGF. 9. Yeni oluşan damar yatağındaki permeabilite artışı. 10. Tümör yataklarını hedef alan endotelial markırlar. 11. Tümörden salınan ya da dolaşımda veya yakındaki dokularda normalde bulunan endotelial hücre büyümesinin endojen inhibitörler (8)

2. 2. 1. Fizyolojik ve patolojik anjiogenezis

Normal koşullarda anjiogenezis endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunu sağlayan faktörler ile buna karşı gelen anti-anjiogenik faktörler arasında oluşan bir denge ile gerçekleşir (5). Fizyolojik anjiogenezi stabil bir olay olup kendi kendisini sınırlandırır ama tümöral anjiogenezi stabil değildir. Hipoksi sonucu tümöral anjiogenezi olur. Tümöral anjiogenezi sonucu tümör büyür. Tümör büyüdükçe yine hipoksi olur ve yine anjiogenezi uyarılır (9). Bu durum romatoid artrit (RA), psöriazis, retinopati gibi farklı hastalıklarda da görülmektedir. Fizyolojik anjiogenezi ile oluşmuş bir kapillerde her bir lümen başına 1-2 endotel hücresi bulunurken örneğin beyin tümörleri kapillerlerinde lümen başına 5-10 endotel hücresi bulunmaktadır. Tümör mikro damarlanması normal dokulardaki mikro damarlanmaya benzemez. Normal dokularda arter, arteriyol, kapiller, postkapiller venül ve ven yapısı

bulunurken tümörlerde arteriyo-venöz şant veya değişik şekillerde olmaktadır. Normal bir dokuda anjiogenik aktivite homojen iken vaskülarize bir tümörde anjiogenik aktivite heterojendir. Vaskülarize tümörde tüm tümör hücreleri anjiogenik değildir. Çok iyi vaskülarize tümörlerde bile mikrodamar dansitesinin düşük olduğu alanlar ve yüksek olduğu alanlar bulunmaktadır ve anjiogenik aktivite heterojendir (5).

Ovülasyon, menstrual siklus, plasentanın oluşumu fizyolojik anjiogeneze bağlıdır. Gelişimsel anjiogenezis bozukluklardan bazıları; barsak atrezisi, vasküler malformasyon, hemanjioma ve tek taraflı fasial atrofidir. Preeklampsi hastalarında VEGF'nin hipoksiye bağlı artışı bulunmuş ve bu artışın hastalığın ciddiyetini yansıttığı gösterilmiştir. Ayrıca anjiogenik gelişme bozukluğunun ultrasonografi ile değerlendirilebileceği ve gelecekte magnetik rezonans görüntüleme (MRI) ile daha fazla bilgi verilebileceği belirtilmiştir (5).

İnsan tümörlerinde spontan anjiogenik dönüşüm şunlara bağlı ortaya çıkar:

1. Anjiogenik onkogenler: VEGF, bFGF gibi proanjiogenik proteinleri uyarıp, trombospondin gibi anjiogenez inhibitörlerini inhibe eder.

2. Tümörle ilişkili hipoksik durumlar HIF-1'i (Hypoxia inducible factor-1: Hipoksi ile uyarılan faktör-1) ve anjiogenik proteinleri artırır.

3. Tümör yatağındaki fibroblastlar: Pro-anjiogenik proteinlerin salınımını sağlamaları için tümör hücrelerini tarafından uyarılırlar.

Ana fibroblast büyüme faktörü (bFGF) en güçlü ve en iyi bilinen anjiogenik moleküldür. Birçok normal doku tarafından üretilir ancak sinyal peptid olmayınca hücre bağlantılı kalır. Heparine afinitesinden dolayı bazal membrandaki heparan sülfata ulaşabilir.

4. Tümör hücrelerine alınan kemik iliği kaynaklı progenitör endotelial hücreler

İnsanlardaki anjiogenezin proanjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dağılımına bağlı geliştiğine inanılmaktadır (8).

2. 2. 2. Matrijel ve Matrijelde Tüp Benzeri Yapılarının Oluşturulması

2. 2. 2. 1. Matrijel (*Cultrex veya EHS Matrix*)

Bazal membran ESM'i (ekstra sellüler matriks); epitelyal-endotelyal hücrelerle, yağ ve düz kas hücreleri ile temas eder. Çok ince bir yapı olduğu için ESM ile çalışmak oldukça zordur (10).

Matrijel, çözünebilen bir bazal membran ekstraktı (EHS: Engelbreth-Holm-Swarm fare tümöründen elde edilmiştir) olup epitelyal ve nöronal hücrelerin farklılaşmasını sağlamaktadır. 24-37 °C'de jel halinde iken, 4 °C'de sıvı haldedir. Başlıca laminin III, kollajen IV, heparan sülfat, proteoglikan ve büyüme faktörleri içerir (10).

EHS tümör: Roslyn Orkin bol miktarda ekstrasellüler matriks içeren kötü diferansiye fare osteosarkomu ile çalışmış, ondan sonra bu tümörün matriksinin kıkırdak dokudan farklı, bazal membrana benzer olduğu J. Engelbreth-Holm tarafından gösterilmiş ve Richard Swarm tarafından da bu tümör matriksinin karakteristik özellikleri tanımlanmıştır. Bu iki kişinin adına itafen bu tümöre EHS tümör denilmektedir (10).

Bu tümörden elde edilen bazal membranın immünolojik ve kimyasal yapısı orijinal bazal membran ile aynıdır. Tümör invazyonu için matrijelin kullanılmaya başlanması ile invazyonla ilişkili birçok inhibitör veya stimulator tanımlanmıştır. Bu inhibitörlerin de büyük bir çoğunluğu tümör tedavisi için geliştirilmiştir (10).

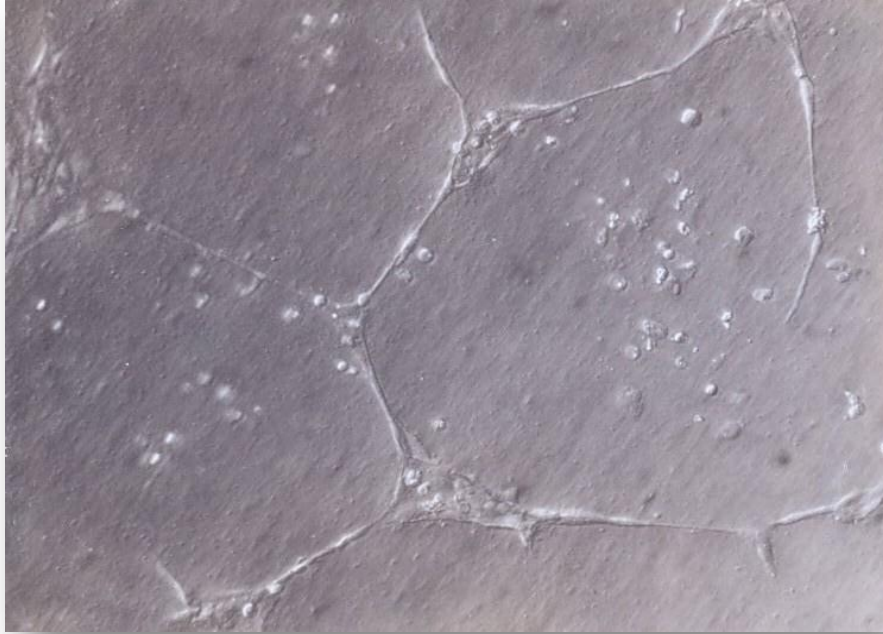
Eğer tümör hücreleri ile matrijel ardışık olarak fareye enjekte edilirse tümör oluşma ve büyüme oranı artmıştır (10).

2. 2. 2. 2. Matrijelde tüp benzeri yapılar oluşumu

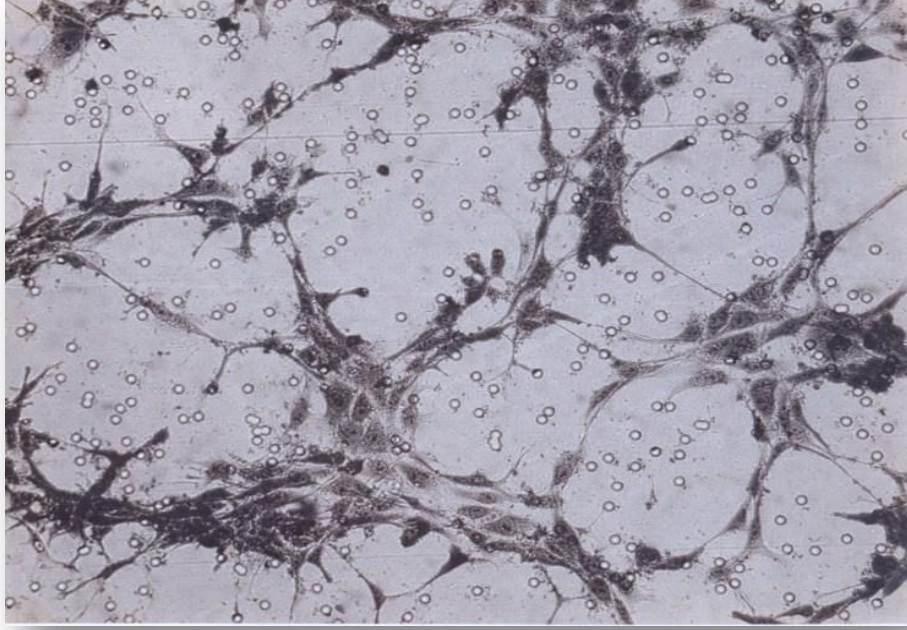
Anjiogenez için en spesifik testlerden biri endotelyal hücrelerin üç boyutlu yapılar (tüp benzeri yapılar) oluşturmalarının ölçülmesidir (6).

Bazal membran benzeri matriks ile çalışılan farklı hücrelerde farklı sonuçlar ortaya çıkabilir. Örneğin tüp benzeri kapiller yapıların oluşumu endotelyal hücrelere spesifiktir, matriks içeren kuyucuklara endotelyal hücreler eklendiğinde 12 saat sonra tüp benzeri yapılar oluşurken, aynı koşullarda meme epitel hücresi eklenen kuyucuklarda asiner benzeri yapılar oluşmuş ve süt proteini üretmiştir (10).

İnsan endotel hücreleri Matrijel üzerine ilk olarak Kubota ve arkadaşları tarafından konmuş ve in vitro ortamda immortal hücrelerde 2-3 saat sonra, primer endotelial hücrelerde ise 6-20 saat sonra hücrelerin organize olduğu ve tübe benzer yapılar oluşturduğu gözlenmiştir (10). Hem ışık hem de elektron mikroskobunda, bu kapiller damarlara benzer ağ yapılarının lümenlere sahip oldukları ve endotel hücrelerin in vivo durumda bulunan damarlara benzer membran özellikleri gösterdikleri ilk olarak Grant ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (11-15). Resim 1 ve 2’de Huvec hücreleri ile tüp yapılarının oluşturulması gösterilmiştir.



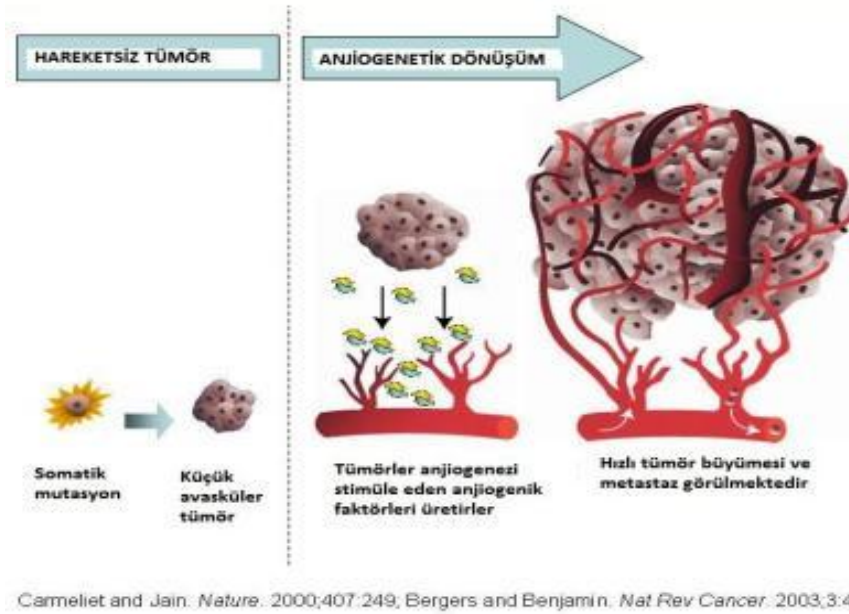
Resim 1. Huvec hücreleri ile tüp yapılarının oluşturulması (10)



Resim 2. *Huvec hücreleri ile tüp yapılarının oluşması*

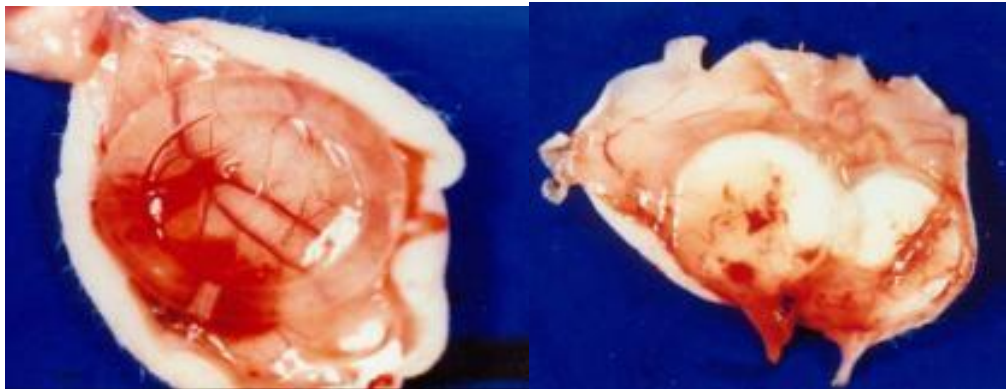
2. 2. 3. Anjiogenezin Kontrolünün Kansere Tedavisindeki Önemi

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, proliferasyona uğrayan hücreleri hızlı bir şekilde öldürmek üzere oluşturulmuşlardır. İlaç tedavilerinin normal dokular üzerindeki toksisitesi gibi yan etkilerinden dolayı, bu ilaçların yapımında anti-tümör etkileri bazen sınırlı tutulmaktadır. Çünkü, normal hücrelerin sabit bir yenilenme hızı olup, çoğalmamaktadırlar. Kontrol edilemeyen hücre çoğalması ise neoplazi durumlarında en önemli ve kritik konu olmaktadır. Hücrelerde kansere dönüşüm başladığında, normal dokular da dönüşüme uğramaktadırlar. Kılcal damarlarının büyümesinin, başka bir deyişle anjiogenezin kontrol edilmesi, yakın gelecekte kötü huylu tümörlerin tedavisini sağlayacaktır (Şekil 5) (9).



Şekil 5. Tümör büyümesinin kapiller damarlar yoluyla indüklenmesi (16)

Anti-anjiogenik bir ilacın, sadece tümör hücreleri damar yapısına ait olan endotel hücrelerin büyümesini spesifik olarak inhibe ederek, tümörün büyümesini engellemesi umulmaktadır. Çünkü, normal hücrelerin kapiller endotel hücreleri son derece yavaş büyümektedir, halbuki tümör hücrelerinin damarları oldukça hızlı ve katlanan bir hızla büyüme göstermektedir (7;8;17). Resim 3 ve 4’de anjiogenezi çalışmaları gösterilmiştir.



Resim 3. NuNu farelerinin sırtına tumor hücrelerinin insert edilmesi sonucunda yeni kan damarlarının oluşması (anjiogenezi)¹

¹ Resim 3 Prof. Dr. Çiğdem Yenisey’in yapmış olduğu anjiogenezi çalışmalarından alınmış olup henüz yayınlanmamıştır.



Resim 4. NuNu Farelerin sırtlarına içinde HeLa (serviks karsinom) hücreleri bulunan insertlerin yerleştirilmesi ile elde edilen damarlanma görünümü²

2. 3. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü

Filozoflar yüzyıllar boyunca hayatın anlamını araştırdılar; oysa hücre biyologları daha çok ölümün anlamıyla ilgilendiler. 1970'lere kadar bilinen tek hücre ölümü nekrozdu ve bu yüzden hücre ölümü fizyolojik olmayan zararlı bir olay gibi görülüyordu. Ancak insanda ve diğer çok hücreli organizmaların dokularında hücre ölümü, ne her zaman anormal ne de her zaman zararlıdır. Apoptozla hücre ölümü enerjiye bağlı olarak, hücresel yaralanma ve enflamasyon olmaksızın, çok daha ustaca gerçekleştirilen bir işlemdir.

İster tek hücreli ister çok hücreli canlılarda olsun; yaşamın başlıca kısımları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Organizmaların temel canlılık birimi olan hücrelerin gereksinimleri karşılanmadığında ölüm olarak adlandırılan ve hayati olayların geri dönüşsüz olarak durması anlamına gelen olay gerçekleşir. Yaşamın düzenli bir şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi de önemlidir. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında sabit bir oran bulunması gerekir. Bu da başlıca iki hücre ölüm şekli olan nekroz ve apoptoz ile sağlanmaktadır (18).

² Resim 4 Prof. Dr. Çiğdem Yenisey'in yapmış olduğu anjiogenez çalışmalarından alınmış olup henüz yayınlanmamıştır.

Apoptoz, Yunanca'da apo (=ayrı) ve ptozis (=düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir. İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından "fizyolojik hücre ölümü" ifadesi tanımladıktan sonra yine ilk olarak Wyllie ve Kerr tarafından glukokortikoidlere maruz kalan timüs hücreleri üzerinde yapılan deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir. Apoptoz, 20 yıldan fazla embriyolojik gelişimin temel süreci olarak bilinmiş, araştırmacıların 1990'lı yılların başlarında, gelişimini tamamlamış hayvan hücrelerinde de apoptozu tanımlamasıyla konu daha ilgi çekici bir hale gelmiştir (19).

Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir (18).

2. 3. 1. Apoptozun Rol Aldığı Fizyolojik ve Patolojik Olaylar

Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur. Bu da demektir ki; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir (19).

Apoptozun rol aldığı fizyolojik olayların başında hücre yapım-yıkımı gelir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılır. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetusun implantasyonundan organogenezise kadar tüm gelişim sürecinde yer alır. İnsanın embriyolojik gelişiminde; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında apoptoz rol oynar. Erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin, menstrüel siklusta endometriyal hücre yıkımı, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde apoptoz görülür. Bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptoz önemli rol

oynamaktadır. Apoptozun en klasik örneği sayılan yenidoğan timusunun involusyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık % 98'i seleksiyona uğramaktadır. Ayrıca B hücrelerinde de apoptozun baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyaranla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamaktır (19).

Patolojik olarak sayabileceğimiz olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol oynar. Yine hormona bağımlı olarak dokularda patolojik atrofi sırasında; örneğin kastrasyondan sonra prostat atrofisi ya da glukokortikoid kullanımından sonra timusta lenfosit kaybı apoptoz yoluyla olur. Pankreas, tükürük bezi, böbrek tubulusları gibi parankimatöz organlarda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofide gözlenir. Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü, immun rejeksiyon ve graft versus host reaksiyonlarında da apoptoz rol alır. AIDS ve diğer viral hastalıklarda: Viral hepatitte görülen ve Councilman cisimcikleri olarak bilinen apoptotik hücreler gibi; bazı kalp hastalıklarında; romatoid artrit ve multipl skleroz gibi bazı otoimmün hastalıklarda; inme, Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Lou Gehrig gibi bazı nörodejenaratif bozukluklara bağlı hastalıklarda; ve kanserde apoptoz mekanizması devreye girer. Bu nedenle apoptoz mekanizması tam olarak anlaşıldığında belki de bu hastalıkların tedavisi mümkün olabilecektir (19).

2. 3. 2. Apoptozu etkileyen uyaranlar

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olduğu bilinmektedir. Ayrıca apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir (19).

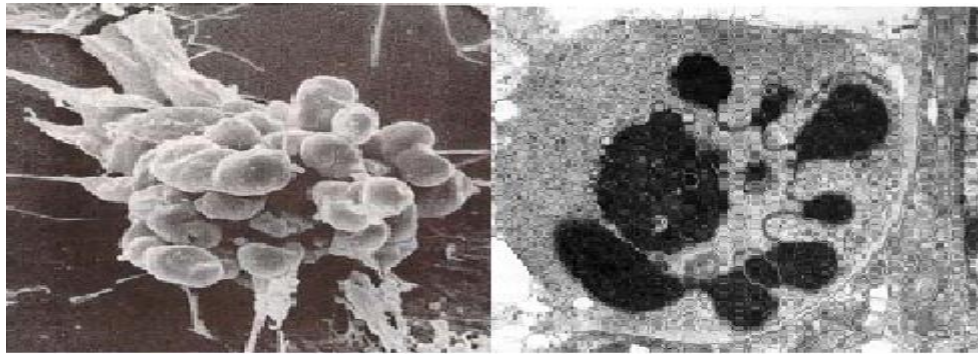
Apoptozu etkileyen uyaranların bazıları şu şekilde sıralanabilir; büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), TGF-B (Transforming Growth Factor: Transforme Edici Büyüme Faktörü), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler gibi. Bunlardan özellikle proto-onkojenlerin (c-myc gibi) çoğunun apoptozun regülasyonunda yer aldığı kanıtlanmıştır. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçlar ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de, bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptoz gelişmesine yol açabilir (19).

2. 3. 3. Apoptoz süreci

Apoptoz süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı) ve hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde başlayabilir (19).

Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondiriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Resim 5). Ayrıca kanser, nörodejenerasyon, otoimmünite, kalp hastalıkları ve diğer bozukluklar gibi geniş bir alana yayılan hastalıkların patogenezi apoptozun kötü regülasyonu ile ilişkilidir. Apoptozun gen ürünleri, tanı ve tedavi için potansiyel hedeflerdir ve geniş bir alana yayılan hastalıklar için yeni tedavi ve davranış biçimleri geliştirme umudunu sunar (19).

Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur. Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur. Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır (18).



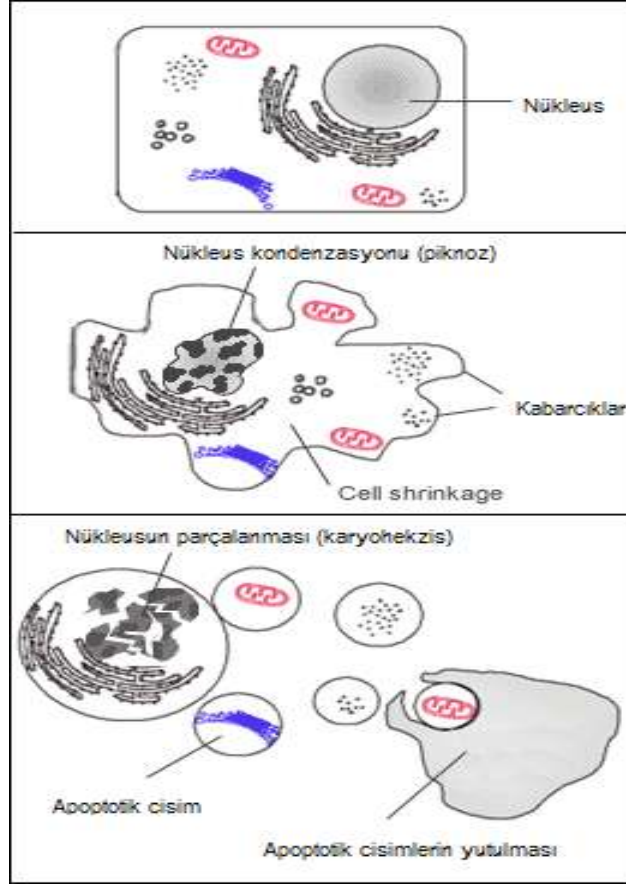
A

B

Resim 5. A. Apoptoza uğramış lökosit hücresi; B. Apoptoza uğramış hücrede çekirdeğin parçalanması

Yapılan in-vitro çalışmalar apoptozun ani olarak gerçekleşen hızlı bir olay olduğunu gösterir. Apoptoz, tek bir hücrede, büzüşme ve evre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel bzşmenin nedeni, Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarıdan sonra hücre, hızla ortamından uzaklaşır, evre ile olan bağlantılarını keser, yuvarlaşırken içeriği bir araya toplanır ve sitoplazması büzülür, hacminin yarısına düşer, ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskobunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıkıanmalar oluşur; bu yapı "zeiozis" olarak tanımlanır. Plazma ve çekirdek yoğunlaşmasını takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir (şekil 6). Kromatindeki değişikliklerin başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{++} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır (19).

Apoptoz hücre devrinin ve birçok organizmanın kararlı i dengenin sürdürülmesinde çok önemlidir. Bu nedenle, apoptozun engellenmesi kansere neden olan moleküllerin çoğalmasına ve dönüşüme uğramış hücrelerin ilaç tedavisinde dirençli olmasına yol açmaktadır. Böylece, apoptotic uyarının yeterli olmaması durumunda, tümör hücrelerinin apoptoza uğraması mümkün olmamakta, tümör kitlesi büyümekte ve böylece apoptoza direnç ortaya çıkmaktadır. Apoptoz ilaç tedavisi (kemoterapi) ile indüklenen (tetiklenen) tümör hücrelerinin ölümünde çok önemli olup, son zamanlarda yayınlanan birçok raporda kanser ilaçlarının çoğunun hücreleri apoptoza uğratması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.



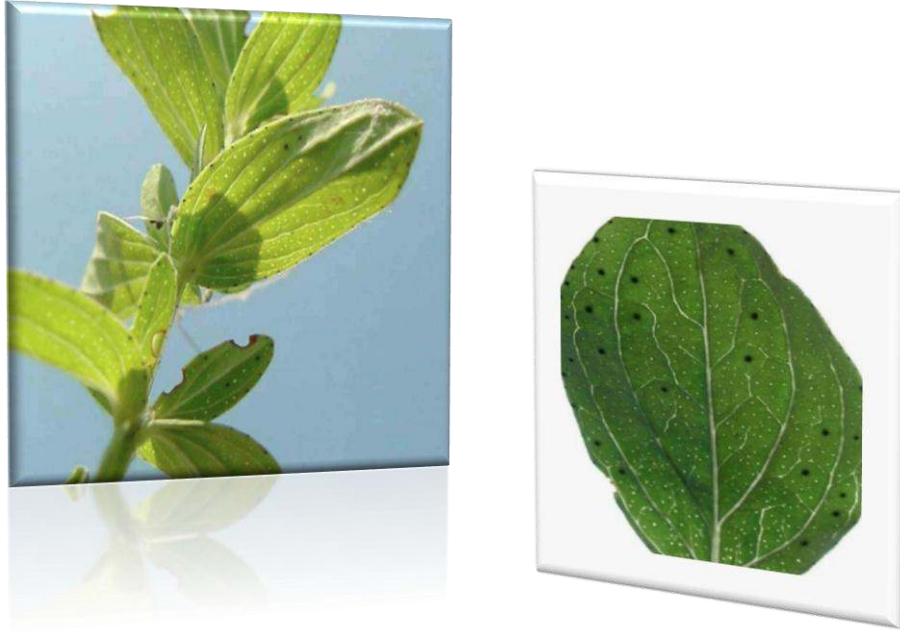
Şekil 6. Apoptozun gelişimi ve apoptotik cisimlerin yok edilmesi (18)

2. 4. Hypericum perforatum

Lipofilik bir bileşik olan hiperforinin doğal kaynağı Hypericaceae (Hypericum) ailesinden bitkilerdir, en bol olarak da bu aileden St. John bitkisinde (H. Perforatum L.) bulunur (20). Hypericum terimi Yunanca hyper (üst) ve eikon (resim) kelimelerinin birleşmesinden gelir. Eski Yunan'da ve Roma'da Hypericum'un dallarını, bu bitkinin mistik güçleri olduğuna ve kendilerin şeytani güçlerden koruyacağına inandıkları için, evlerindeki resimlerin veya heykellerin üzerine koyarlarmış. Perforatum kelimesi de bitkinin yapraklarında deliklere benzeyen dış salgı bezleri olduğundan dolayı verilmiştir. Yabancılar tarafından kullanılan ismi (St. John's Wort: Aziz Yahya Otu) Aziz John Günü'nde (24 Haziran) çiçeklenmesinden kaynaklanmaktadır (21).

Hypericum perforatum, St. John bitkisi; sarı kantaron, binbirdelikotu (çiçek ve yapraklarındaki noktacıklar halindeki yağ guddeleri ışığa tutulunca delik gibi

görüldüğünden), kanotu, kılıçotu, koyunkıran, kuzukıran, mayasılotu, yaraotu gibi değişik adlarla anılan, beş taç yapraklı, sarı çiçekli ve uzun ömürlü bir yabani bitkidir (Resim 6). Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da bol bulunur. *Hypericum* cinsinin dünyada 350-400, Türkiye'de ise 70 farklı türü vardır (21;22). Dünyanın ılıman ve tropikal bölgeleri boyunca, çoğunlukla yol kenarlarında, çimenli nehir kıyılarında, bakımsız tarlalarda, kışı nemli yazı kurak olan bölgelerde yayılış gösterir. Hafif asidik-nötr topraklarda en iyi yetişmektedir. Bu bitkinin boyu 50-60 cm'e kadar ulaşabilmekte olup, yapraklarında kolay görülebilen beneklerde yağ bezleri içermektedir (20;22-24).



Resim 6. Hypericum perforatum bitkisinin yaprak görüntüleri (22)

Çiçekleri uç kısmındadır. Çiçeğin incelemesinde kaliks ve korolada siyah benekler ve çizgiler görülür, korolanın beş taç yaprağında birkaç parlak, translusen benek vardır. Bu benekler, parmakların arasında ezilirse hiperisinden zengin kırmızı boya üretirler (20).



Resim 7. Hypericum perforatum bitkisinin çiçek görüntüsü (22)

Bu bitki çiçek vermeye başlamadan veya çiçek verme döneminde hemen hasat edilmelidir. Hasattan sonra, biyoaktif içeriklerinin, özellikle de hiperforinin, bozulmasını önlemek için hemen kurutulmalıdır. Bu bitkinin geleneksel tıpta çiçekleri, yaprakları ve anten kısımları kullanılır. Çiçekli dal uçları düşük sıcaklıkta kurutularak ya da sıvı azotta dondurularak liyofilize edildikten sonra, sulu metanol ile karanlıkta ekstre edilir. Taze ve kuru çiçekleri cam kavanoz içindeki zeytinyağına batırılarak güneş gören yerde 15 gün bekletilirse ‘‘Kantaron Yağı’’ elde edilir (22).

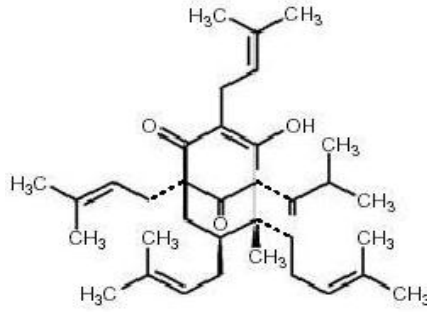
2. 4. 1. Hypericum perforatum’un Aktif Bileşikleri

- 1. Floroglukinoller:** Hiperforin, adhiperforin
- 2. Naftodiantronlar:** Hiperisin, psödohiperisin
- 3. Flavonol glikozitler:** Kuersetin, hiperosit, kuersitrin, izokuersitrin, rutin, kampferol, luteolin ve mirisetin
- 4. Ksantonlar**
- 5. Diğer bileşikler:** Prosiyanidinler, tanninler, komarinler, aminoasitler, fenilpropanlar (22)

St. John bitkisi en az on farklı biyokimyasal bileşim içerir. İlk üç grup bitkide en en yoğun olarak bulunanları olup bu bitkinin geleneksel kullanımını tanımlamayan esas ajanlardır. Bunlar her bitkide değişik yoğunlukta bulunur. Tür içindeki ve/veya gelişimdeki genetik varyasyonlar, ekolojik büyüme şartları, hasat zamanı, örneğin hazırlanması yöntemi, ışığa maruz kalma ve depolama şartları bu farklılığın nedenleridir. Çeşitliliğe rağmen standart biyoanalitik tekniklerle bitki özütünün yaklaşık % 20’sinin biyoaktif bileşiklerden oluştuğu saptanmıştır (22).

2. 4. 1. 1. *Hiperforin*

Hiperforin, prenile floroglukinol türevidir ve yapısında floroglukinol iskelete bağlı olarak lipofilik izopren zincir içerir (Şekil 7). St. John bitkisinin yaprak ve çiçeklerinde en bol bulunan biyoaktif bileşenlerden biridir, kuru ağırlığının yaklaşık % 4'ünü oluşturmaktadır. Hiperforin kolaylıkla parçalanabilen bir bileşik olup, bu da hiperforinle çalışmayı güçleştirmektedir. Gerçekten, hiperforin havayla oksidasyona dayanıksızdır ve birçok organik çözücünde stabil olmayıp yıkıma uğramaktadır. Ancak hiperforinin disikloheksilamonyum tuzu daha stabildir, kristalizedir ve depolamaya doğal ürünlerden daha uygundur (20).



Şekil 7: Floroglusinollerden hiperforin'in kimyasal yapısı (25)

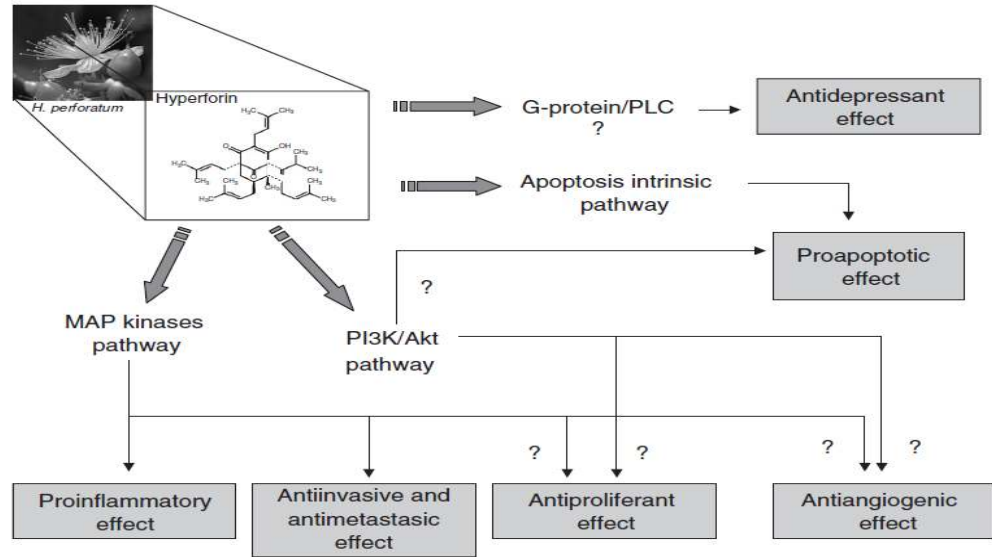
Son günlerde hipefrinden aristoforin (o-(karboksi metil)-hiperforin) sentezi tanımlanmıştır. Aristoforin, hiperforinin biyoaktivitesine sahiptir ilave olarak da ondan çok daha stabildir ve sulu çözeltilerde hiperforinden daha iyi çözünür (20).

2. 4. 1. 1. 1. *Hiperforinin tanımlanmış biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları*

St. John bitkisi yüzyıllardır enfeksiyonlara, solunum sistemi hastalıklarına, peptik ülser ve deri hastalıklarına karşı tedavide kullanılan bir bitkidir. Hiperforinin ilk olarak antidepresan etkisi tanımlanmıştır (24;26). 1525'de İsviçreli araştırmacı Paracelsus psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanımını yayınlamıştır. Ondan sonra nöralgi, anksiyete, nöroz ve depresyon tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. 1984 yılında Alman E komisyonu hiperforinin psikovejetatif huzursuzluk, depresif duygu durum bozukluğu, nöroz ve psikozlarda kullanımını onaylamıştır. Son zamanlarda yapılan birbiri ile ilişkili iki çalışma St. John bitkisinin depresyonda plasebodan daha etkili olduğunu göstermiştir ve birçok standardize ürün onaylanmıştır. Almanya'daki satışları en popüler antidepresan ilaçlardan

olan fluoksetini bile aşmıştır. Şekil 8’de hiperforinin biyolojik etkileri ve etki mekanizmaları şematik olarak gösterilmiştir (20).

Son zamanlarda yapılan farmakolojik çalışmalarla hiperforinin başka etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Bunlar nörolojik etkileri, enflamasyona etkisi, antibakteriyel etkisi, antitümoral ve antianjiogenik etkisidir (20).



Şekil 8: Hiperforinin tanımlanmış biyolojik etkileri ve etki mekanizması (20)

2. 4. 1. 1. 1. 1. Antidepresan Etki

Hiperforin aktif komponentlerinden biri olan hiperikum; ekstrelerinin antidepresan etkisinden dolayı tanımlanmıştır. Birçok antidepresan ilaç bir veya daha fazla nörotransmitterin (özellikle de serotonin) geri alımı için, az ya da çok seçici inhibitör gibi davranır, bu geri alımdaki taşıyıcı proteinlerin transmitter bağlayıcı yüzüne bağlanır ve kompetitif inhibitör olarak rol alırlar. İstisna olarak hiperforinin serotonin, dopamin, noradrenalin ve hatta GABA ve glutamatin geri alımını inhibe eden geniş bir inhibitör etkisi vardır (20;24;26).

Nörotransmitter geri alımı ile ilgili değişik taşıyıcı proteinlerinin ortak noktası: hepsinin etki ederken sodyum gradiyentini kullanmasıdır. Hiperforin henüz tam olarak belirlenmemiş, muhtemelen iyon kanallarını içeren sodyum iletkenlik mekanizmasını aktive ederek bu gradiyenti azaltır. İlave olarak hiperforin GABA, NMDA ve AMPA reseptörleri aracılı cevabı da inhibe eder, bu presinaptik kalsiyum kanallarının açılmasını sağlar ve nörotransmitterlerin nörosinaptik aralığa salınmasına neden olur (20;24;27).

Hiperforin sitozolde pH'ı artırır (26;28) ve in vivo ve in vitro nöron membranlarının akışkan parametrelerini düzenler, ki bu da farklı iyonik iletkenlik mekanizmasıyla etki eden farmakolojik özelliklerine katkıda bulunur (29). Deneysel çalışmalar kesin olarak göstermiştir ki; seçici olmayan katyon kanallarının G proteine bağlı fosfolipaz C aracılı yol ile aktivasyonu sodyum gradiente azalmaya neden olur, kalsiyum kanalları açılır; ve pH gradiente dağıtır (20;29;30).

2. 4. 1. 1. 1. 2. Diğer nörolojik etkiler

Hiperforinin β -amiloid öncü proteine etki eder (31). Alzheimer hastalarının, en azından bir bölümünde, amiloid plaklarında ekstrasellüler β -amiloid kümelenmesi ve çözmesi sekretazlar tarafından proteolitik sürecin değiştirilmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Amiloid öncül proteinin γ -sekretaz ve β -sekretaz tarafından ardışık parçalanması sonucu 39 ve 43 arası farklı uzunlukta aminoasit içeren β -amiloid peptidler üretilir, 42 aminoasit uzunluğunda olan en çok çöken ve nörotoksisiteden sorumlu olandır (32). Diğer yandan amiloid öncül proteinin α -sekretazla muamelesi sonucu β -amiloid oluşumu engellenir, ortadan ikiye bölünür. Hiperforinin amiloid öncü protein sürecine hızla etki eder, hücre içi öncü protein miktarını azaltırken, hücreden salınım oranını artırır. Mevcut verilerle bu etkinin birincil olarak α -sekretaz üzerinden olduğu gösterilebilir ancak β -sekretaza etki dışlanamaz (31).

2. 4. 1. 1. 1. 3. Antienflamatuvar ve Proenflamatuvar etki

Bir çok çalışma St. John bitkisinin antidepresan etkisi konusunda hem fikirken, antienflamatuvar etkisinin moleküler temeli hakkında çok az şey bilinmektedir. Bitkinin lipofilik ekstresi yüzeysel yaralarda, yara izlerinde, yanıkta ve dermatitte uygulanmıştır. St. John bitkisinin antienflamatuvar etkisinin proenflamatuvar sinyal ileti yoluna kuersetin'in inhibitör etkisi ile ilişkilendirilmesine rağmen son zamanlardaki çalışmalar hiperforinin kilit rol oynadığını kanıtlamıştır (33). Hiperforinin karışık epidermal hücre lenfosit reaksiyonu ve T lenfosit proliferasyonu üzerinde inhibitör etkisi gösterilmiştir (34). Bu çalışmaları yapanların amacı enflamatuvar deri hastalıklarının tedavisini St. John bitkisi ekstresi ile sağlamaktır. Gerçekte klinik çalışmalar hafif-orta düzeyde atopik dermatitin topikal tedavisinde hiperforinin anlamlı etkisini göstermiştir (35).

Diğer yandan, hiperforin siklooksijenaz-1 ve 5-lipoksijenazın en güçlü doğal inhibitörüdür. Bu çift etki St. John bitkisinin ve hiperforinin enflamatuvar cilt hastalıklarının

yüzeysel tedavisindeki endikasyonlarını açıklayabilir. Ayrıca, hiperforin bu ikili antienflamatuvar profili gösterdiğinden dolayı siklooksijenaz ve lipoksijenaz inhibitörlerine spesifik mide yan etkileri ortadan kalkmıştır. Bu da allerjik ve enflamatuvar hastalıkların tedavisindeki kullanımını daha değerli kılmıştır (36).

Tam tersi, hiperforin insan barsak epitelinde, hepatositlerde ve monositlerde zaman ve doz bağımlı etkisiyle interlökin-8 salınımını artırır. İnterlökin-8 karaciğerde akut faz proteinlerinin üretimini artırdığından ve barsak enflamasyonunda ana role sahip olduğundan dolayı, St. John bitkisinin bazı kullanıcıları için hiperforin tedavisi zararlı olabilir. Bundan dolayı, hiperforinin uyarıcı etkisi ayrıca değerlendirilmelidir (37).

2. 4. 1. 1. 1. 4. Antibakteriyel Etki

St. John bitkisinin enfeksiyonlara karşı kullanımı ekstresinin rapor edilen antibakteriyel özellikleri ile desteklenmiştir. Yetmişlerde bir grup Rus bilimadamı St. John bitki ekstresini içeren bir antibiyotik varlığını kabul etmişler ve bu antibiyotiği hiperforin olarak adlandırmışlardır. Yine aynı grup 1975’de hiperforinin kimyasal yapısını açıklığa kavuşturmuştur. Hiperforinin multirezistant *Stafilokokkus aureus* ve diğer Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin olduğu, Gram-negatif bakteri ve *Candida albicans* üzerinde büyümeyi inhibe edici etkisinin olmadığı onaylanmıştır. Şimdiye kadar Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisinin gerçek moleküler hedefleri direkt olarak kanıtlanmamıştır (20).

2. 4. 1. 1. 1. 5. Antitümöral Etki

Birbiri ile ilişkili bir çok araştırma hiperforinin antikarsinojenik, antiproliferatif, proapoptotik, antiinvaziv ve antimetazatik etkilerinin toplamı olan antineoplastik gücünü göstermiştir (20).

2. 4. 1. 1. 1. 6. Antikarsinojenik Etki

Hiperforin pregnan X reseptörüne bağlanarak sitokrom p-450’nin izoformu olan CYP3A4 ekspresyonunu artırır. Reçete edilen ilaçların %60’dan fazlası CYP3A4 bağımlı olarakla metabolize ve ekskrete edilir, hiperforin bu bileşiklerin inaktivasyonunu artırır, dolayısı ile farmakolojik etkilerini azaltır. Gerçekte, bu da güçlü farmakolojik kullanımı ile bağlantılı artışın ana etkenidir. Bununla birlikte, aynı zamanda hiperforin diğer sitokrom p-450 izoformlarında farklı etkiye yol açar. Gerçekte, çok yakın çalışmalar St. John bitkisinin

ekstresinin ve hiperforini de içeren bio-aktif bileşenlerinin insan prokarsinogenik-uyarıcı enziminin, CYP1A1, güçlü inhibitörü olduğunu göstermiştir (20).

2. 4. 1. 1. 1. 7. Antiproliferatif Etki

Hiperforinin meme kanseri (MT-450, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri), skuamoz hücreli karsinom (A-431), malign melanom (HT-144), malign glioma (LN229), fibrosarkom (HT-1080), kronik myeloid lösemi (K562) ve lenfoma (U937 ve Jarcet hücreleri) ve diğer birçok memeli kanser hücre hatlarında proliferasyon oranını etkin olarak azalttığı gösterilmiştir (38;39).

2. 4. 1. 1. 1. 8. Proapoptotik Etki

Tümörün büyüme oranı çoğalması ile ölümü arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur. Bu nedenle etkili antitümöral bileşik tümör çoğalmasını inhibe etmeli ve/veya tümör hücresinin apoptozunu uyarmalıdır (38;39).

Apoptozun en ilginç yönü kanser tedavisinde kullanılabilir olmasıdır. Kemosensitif hücrelerde apoptozu farklı şekillerde başlatan antikanser ajanlar rapor edilmiştir. Apoptozun başlama, uygulama, degradasyon gibi farklı safhaları vardır ve iki ana yolu aktive eder. Birincisi reseptör aracılı apoptozdur ve TNF-R1, CD95 (Fas) ve TRAIL-reseptör gibi TNF ailesi reseptörleri kullanır. Bu ekstrinsik hücre ölüm yolu olarak adlandırılır, yeni adaptör proteinler TRADD ve FADD, reseptör trimerizasyonu ve ligand bağlanması üzerinden sitoplazmik ölüm şeklidir. Bu sinyal kompleksi inhibitör kaspaz olan kaspaz 8'i ve diğer etkili kaspazları aktive eder. Diğer apoptoz yolu intirinsik yoldur, mitokondriden sitokrom c ve Apaf-1'i içeren proapopitotik faktörlerin salınımıyla aktive olur. ATP varlığında bu faktörler prokaspaz-9'u kaspaz-9'a çevirir ve kaspaz kaskatını aktive eden apoptoz kompleksinin bir parçası haline gelir (20).

Hiperforin in vivo ortamda birçok insan ve fare tümörler hücre hatlarında büyümeyi inhibe eder. Tümör hücrelerinin hiperforinle tedavisi doza bağımlı apoptotik oligonükleosom nesillerinin, tipik DNA zincirleri ve apoptoz spesifik morfolojik değişikliklerin oluşmasıyla sonuçlanmıştır. Hiperforin mitokondri aracılı apoptoz yolunu aktive eder. Anlamlı antitümör etkisinden, in vivo düşük toksisitesinden ve doğal bulunabilen bir bileşik olmasından dolayı, hiperforin ilgi çeken yeni bir antikanser ilaç olmuştur (20).

Hiperforinin tümör hücre apoptozunu artırdığı gibi hiperforinin stabil formu olan aristoforin de tümör hücre apoptozunu artırır (20).

2. 4. 1. 1. 1. 9. Antiinvaziv ve Antimetastatik Etki

İlişkili bir çalışmada hiperforinin disikloheksilamonyum tuzunun hiperforinin konsantrasyonundan çok daha düşük mikromolar konsantrasyonlarda bazal membranları yeniden yapılandırarak tümör hücre invazyonunu yeteri kadar inhibe ettiği açık olarak gösterilmiştir. Bu anti-invazif etki çoğunlukla doza ve ekstrasellüler matriksdeki elastaz, katepsin G, ürokinaz gibi değişik proteinazların nonkompetitif inhibisyonuna bağlıdır. Hiperforin MMP 2 ve 9'un ve diğer iki anahtar ekstrasellüler matriks düzenleyici enziminin salınımını anlamlı olarak azaltır ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 aktivitesini inhibe eder (20;38).

2. 4. 1. 1. 1. 10. Antianjiogenik Etki

Deneyisel karaciğer metastazlarının mikroskopik görüntüleri hiperforinle tedavi edilen farelerde kontrol grubuyla karşılaştırılınca yeni damar oluşumunu azaltarak metastazları azalttığını göstermiştir (20;38). Son zamanda yayınlanmış bir çalışmada hiperforinin hem invivo hem invitro anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Anjiogenez birçok kilit basamağı içeren karmaşık bir süreçtir. Aktive olmayan endotelial hücreler anjiogenik sinyalle aktive olur ve biyosinyalizasyondaki değişimleri içeren anjiogenik fenotip değişimler başlatılır, buna bağlı olarak da ekstrasellüler matriks enzimlerinin boşalması, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve son olarak da yeni damar oluşumuna gözlenir (40).

Hiperforin çok hedefli antianjiogenik ajan olarak davrandığı gösterilmiştir: i) Hiperforin endotelial büyümeyi inhibe eder; ii) Matrijel tabakada kapiller tüp oluşumunu inhibe eder; iii) Endotelial hücre matriksi MMP 2 ve ürokinazının üretim ve salınımını inhibe eder; iv) Endotelial hücrelerin migrasyon gücünü inhibe eder v) Endotelial hücrelerin Matrijel invazyonunu inhibe eder (9). Hiperforin bu multiinhibitör etki ile endotelial hücrelerde anjiogeneze ilgili biyosinyalizasyonda güçlü değişikliklere neden olur. Proliferasyonun inhibisyonu; p38 MAPK, ERK 1/2 ve/veya STAT 5 yolunun etkileşimi, biyosinyal yolunun inhibisyonu ve/veya apoptoz biyosinyal yolunun aktivasyonu tarafından düzenlenir (40). İnvaziv tümör hücrelerinde anjiogenik endotelial hücrenin ekstrasellüler matriks degradasyon gücüne etki, ekstrasellüler matriks degradasyon enzim ekspresyonu ile

ilişkili tanımlanmış birçok biyosinyal yollarının birbiri ile ekileşimi olduğu kadar proteaz aktivitesinin direkt inhibisyonunu da kapsayabilir (38). Bu nedenle hiperforin umut verici bir antianjiyogenik bileşik gibi görünmektedir.

Sonuç olarak son birkaç yılda hiperforinin lipofilik açılfloroglikinol derivesinin çok amaçlı farmakolojik kullanımına işaret eden birçok kanıt bulunmuştur. Bunlar ana etkisinin sadece antidepresan etkisi olmadığını, nörolojik etkilerinin, enflamasyonu düzenleyici etkisinin, antibakteriyel, antitümöral ve antianjiyogenik etkisinin de olduğunu göstermiştir. Hiperforinin farmakolojik kullanımını sınırlayan esas mesele insitabilitesi ve CYP3A4'ü aktive edici etkisine bağlı olarak gelişen diğer ilaçlarla güçlü bir interferansının olmasıdır. En azından aristoforin olarak adlandırılan hiperforin derivesi halihazırda kullanılabilir durumdadır ve diğerleri de sentezlenebilir. Aristoforin hiperforinin etkilerini gösterir fakat CYP3A4'ü aktive etmediği için daha kullanışlıdır.

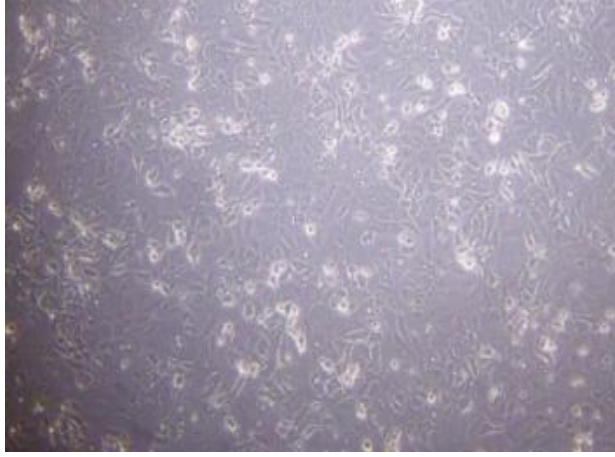
3. AMAÇ

Çalışmamızın amacı; hiperforinin, anti-tümöral ve anti-apoptotik etkilerinin hücresel düzeyde incelenmesi, hiperforinin, Caco-2 hücre hatlarının Huvec hücrelerinde oluşturduğu anjiogenezi nasıl etkilediğinin gösterilmesidir. Ayrıca hiperforinin kanserli hücrelerin yayılımında ve metastaz oluşturmada çok önemli olan tümör hücrelerinin proliferasyonlarını ve hücrelerin canlılığını nasıl etkilediğinin gösterilmesidir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4. 1. Materyal

4. 1. 1. Huvec Hücre Hatları :Huvec primer hücre hatları insan göbek kordon hücrelerinden elde edilmiş olup, GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, Tıbbi ve Kanser Araştırma Merkezi Sorumlusu, İç Hastalıkları ve Hematoloji Uzmanı Prof. Dr. Ali Uygur Ural tarafından 5. Pasajda hediye edilmiştir (Resim 8).



Resim 8. Huvec hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü

4. 1. 2. Caco-2 Hücreleri: Caco-2 hücreleri insan kolon kanseri hücrelerinden elde edilmiş olup, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Araştırma Laboratuvarı, Hücre Kültürü Laboratuvarında -196°C 'de muhafaza edilen, hücre hattı stoklarından temin edilmiştir (Resim 9).



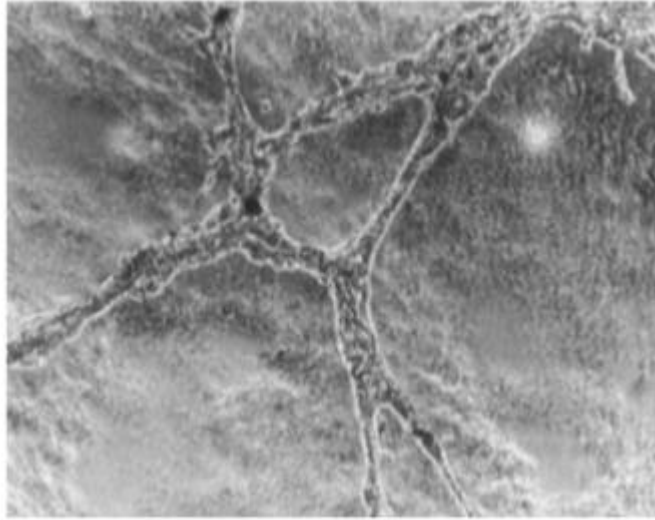
Resim 9. Caco-2 hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü

4. 1. 3. Matrijel: Anjiogenez için en spesifik testlerden biri de endotel hücrelerin üç boyutlu yapılar (tüp benzeri yapılar) oluşturmalarının ölçülmesidir. Kaynağı neresi olursa olsun tüm endotel hücreler kendiliğinden tüp benzeri yapılar oluşturma yeteneğindedir, tüp benzeri yapı oluşumu plastik kültür kaplarını fibrin pıhtısı veya kollajen ile kaplayarak sağlanabilir. Pıhtı üzerinde tüp oluşumu in vivo durumlar için uygundur ve elektron mikroskopu ile tesbit edilebilir. EHS tümör hücresi bazal membranının ana komponenti lamininden matrijelin elde edilmesi ile endotelyal hücrelerde 24 saat içinde tüp benzeri yapıların oluşması sağlanabilmiştir ve tüp benzeri yapıların belirlenmesi anjiogenez çalışmalarında önemli bir

yer almıştır (Resim 10). Ancak Matrijel içindeki protein konsantrasyonunu kontrol etmek kritik öneme sahiptir. Bu yüzden tüm ticari matrijelerde tüp benzeri yapılar oluşamayabilmektedir (Resim 11).



Resim 10. Bazal membran BD Biosciences (MA, USA) firmasından steril halde 10 mL'lik şişelerde temin edilmiştir.



Resim 11. Matrijeldeki tüp benzeri yapılar (6)

4. 1. 4. Hiperforin: Hiperforin, St. John's Wort bitkisinin yapraklarında ve çiçeklerinde en çok bulunan bioaktif bileşendir. Hiperforin kolaylıkla parçalanabilen bir bileşik olup, bu nedenle çalışılması zor bir maddedir. Havaya karşı hassas ve organik çözücünde çözülmeyen bir bileşiktir (Resim 12).



Resim 12. Hiperforin ekstresi

Hiperforin 1 mg'lık dozlarda tüpler içine konulmuş halde, Prof. Dr. Athanassios Giannis (Leipzig University, Faculty of Chemistry and Mineralogy, Institute of Organic Chemistry), tarafından çalışmamız için hediye edilmiştir.

Hiperforin ekstratının 1 mg'ı (argon gazı altında depolanmış olarak hazır olarak geldi) ilk olarak DMSO içinde 1 ml'lik çözelti oluşturacak şekilde karanlık bir ortamda çözüldü. Daha sonra bu çözeltiden 5, 15, 30, 60, 90 μ M olacak şekilde çalışma besiyeri içinde çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerde DMSO'un konsantrasyonunun %1'i geçmemesine dikkat edildi.

4. 1. 5. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar

- Otoklav
- Laminar Flow Kabin
- İnvert Mikroskop
- Binoküler Mikroskop
- CO₂'li Etüv
- Su Banyosu
- Santrifüj

4. 1. 6. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar ve sarf malzemeler

- Fetal Bovine Serum (FBS)Heat Inactivated-100 (PAA A11-104)
- Antibiyotik-Antimikotik (100X) (Penisilin/Streptomisin) (PAA P11-002)
- L-Glutamin 200 mM (100X) (PAA M11-004)
- Tripsin % 0.25 (1X) EDTA'lı (PAA L11-004)
- Enjektöre takılan filtre steril selüloz asetat, 0,2 mikron, (SARTORIOUS SM 16534K)
- Steril mavi kapaklı konik tüp Falcon 15ml (LPL111548)
- Hücre proliferasyon kiti, (Promega G3582)
- Fetal Calf Serum (FCS) Isı ile inaktive edilmiş (PAA A11-104)
- Medium 199 (PAA E15-838)
- DMEM (besiyeri) (PAA E15-080)
- Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS): Endotelyal hücre büyüme faktörleri
- Gentamycin 10 mg/ml (Promocell C42060)
- APOPercentage Apoptosis Assay Kit (Biocolor BT38 8YF, UK)
- Heparin sodyum tuzu (SİGMA H4784)
- Fungizone (Amphotericin B) (SİGMA A2942)
- ITS (Insulin/Transferrin/Selenium) Sıvı besiyeri katkı maddesi (SİGMA A29)
- EBM reaktifi (Endothelial Cell Basal Medium) (Promocell C-22210)
- Endotelyal Tüp oluşum Kiti (CBA-200 CellBiolabs -In Vitro Angiogenesis)
- Milipor katalog no: SCGPU05RE Stericup-GP, 0.22 µm, Polyethersulfone, 500 mL, radio-sterilized
- Milipor katalog no: SE1M003M00 Steriflip-HV, 0.45 µm, PVDF, radio-sterilized
- Milipor katalog no: PI8P01250 Millicell Cell Culture Insert, 12 mm, polycarbonate, 8.0 µm
- 6 kuyucuklu plak (Corning 3516)
- 24 kuyucuklu plak (Corning 3524)
- 5, 10 ve 25 ml'lik steril pipet (Corning 4787, 4788 ve 4789)
- 25 cm²'lik filtreli kapaklı flask (Corning 430641)

4. 2. Yöntemler

4. 2. 1. Donmuş Hücrelerin Çözdürülmesi

- Flaska hazırlanan besiyeri konur.
- Sıvı nitrojen tankından hücreler çıkarılır.
- Su banyosunda çözünür hale getirilir.
- Tamamen çözünmeden otomatik pipet yardımı ile flaska aktarılır.
- DMSO'nun oda sıcaklığında toksik etkisi çok fazladır. Bu hücrelerin ölümüne neden olabileceğinden çok hızlı hareket edilir.

4. 2. 2. Caco-2 Hücrelerinden Ortam Besiyeri (conditioned medium) Elde Edilmesi

Caco-2 hücreleri, her bir kuyucukta yaklaşık 125.000 hücre olacak şekilde besiyeri içinde (1.5 ml) her bir kuyucuğa ekilir. Ekim yapılan plaklar bir gece boyunca 37 °C/ % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Hücreler her bir kuyucuğun içini yaklaşık %75-80 doldurduğunda enkübasyon besiyeri döküldü. Hücreler 1.5 ml DPBS ile iki kez yıkandı. Her bir kuyucuğa DMEM + % 1 BSA içeren besiyerinden 1. 5 ml kondu ve bir gece daha enkübe edildi. Daha sonrabesiyeri steril bir tübe alındı, ölü hücrelerden arınması için 1.000 rpm/10 dakika santrifüj edilip, 0.22 µM filtreden geçirildi.

4. 2. 3. Huvec Besiyeri İçeriği ve Hazırlanması

- 500 ml MEDIUM 199
- 100 ml FCS
- 100 mg ECGS
- 5 ml Glutamin
- 250 µl Heparin
- 5 mL Penisilin/Streptomisin
- 280 µl Fungizon (stok 250 µl/ml içermektedir, ml besiyeri başına 50 µg/ml)
- 0. 5 ml Gentamisin

1. 5 ml Medium 199, 100 mg ECGS içeren şişenin içine konuldu ve eritildi.

2. 250 mL'lik steril şişe içine 100 ml FCS, 5 ml glutamin, 5 ml penisilin/streptomisin, 0. 5 ml gentamisin, 250 µl heparin, 280 µl fungizon konuldu.

3. Bu karışım içine, daha önce besiyeri ile çözülen 5 ml'lik ECGS çözeltisi eklendi.

4. Tüm içerik 0.2 mikron filtreden geçirilerek steril edildi ve Medium 199 içine eklendi.
5. Steril hale gelmiş olan Huvec hücre besiyeri 50 ml'lik steril konik tüpler içine porsiyonlanarak kullanıma hazır hale getirildi ve +4°C ye konuldu.

4. 2. 4. Caco-2 hücreleri besiyerinin hazırlanması

- 500 ml DMEM
- 50 ml FBS
- 5 ml Glutamin
- 5 ml Penisilin/Streptomisin
- 0. 5 mL Gentamisin

1. 100 ml'lik steril şişe içine 50 ml FBS, 5 ml glutamin, 5 ml penisilin/streptomisin, 0. 5 ml gentamisin konuldu.
2. Tüm içerik 0. 2 mikron filterden geçirilerek steril edildi ve DMEM besiyeri içine eklendi.
3. Steril hale gelmiş olan tümör hücresi besiyeri 50 ml'lik steril konik tüpler içine porsiyonlanarak kullanıma hazır hale getirildi ve +4°C ye konuldu.

4. 2. 5. Hücrelerin Pasajlanması (Bölünmesi)

- Öncelikle hücrelerin durumuna mikroskopta bakıldı, hücreler flaskın (T-75) yüzeyinin yaklaşık % 80'ini kapladığında pasajlama işlemi yapıldı.
- Flaksdaki eski besiyeri boşatılıp, flask içindeki hücreler 10 mL DPBS ile yıkandı.
- Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için 3.0 ml (75 cm²'lik flask için) tripsin/EDTA çözeltisi kullanıldı. Tripsin/EDTA çözeltisi tüm yüzeye yayıldı ve hemen boşaltılarak hücrelere temas eden tripsinin hücreleri kaldırması için ortalama 1 dakika 37 °C'deki CO₂ enkübatörüne kondu.
- Hücrelerin hemen hepsinin flask yüzeyinden kalktığından emin olmak için, invert mikroskop ile hücreler kontrol edildi.
- Flask içindeki tripsin/EDTA çözeltisini nötralize etmek için DMEM (Huvec hücreleri için Medium 199) /% 1 FBS (Huvec hücreleri için % 1 FCS) 3.0 mL flask içine eklendi.

- Daha sonra 5.0 ml besiyeri eklendi ve flask içindekiler steril 15 ml'lik konik tübe aktarıldı ve 400 g/10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda tübün üstündeki sıvı kısım boşaltıldı ve geri kalan çökelmiş hücreler 2.0 ml kültür besiyeri ile çözüldü (Buradaki besiyeri miktarı kaç tane ve hangi boy flaska kullanacak ise değişiklik gösterebilmektedir).
- Önceden içine 15 ml besiyeri konulmuş 2 adet T-75mL'lik flask içine 1.0'er ml olmak üzere hücrelerin içinde bulunduğu çözeltiden eklendi ve 37°C'lik % 5 CO₂ içeren etüvde enkübasyona bırakıldı.
- Hücre sayısı Tripan mavisini ile hücreler eşit oranda karıştırılarak hematometrede sayıldı. Böylece canlılık testi yapılmış oldu.

4. 2. 6. Hücre Sayısı (ml'de) Hesaplaması

Thoma lamında her iki kısma da hücre konmuş olup, 16 adet olan karelerden her bir taraftan 5 kare sayılmış olup, her iki taraftan toplam 10 kare sayılmıştır. Toplam hücre sayısı 10'a bölünüp bir karedeki ortalama hücre sayısı elde edilmiştir. 10 µl hücre alınıp, 10 µl tripan mavisini ile boyadığı için dilüsyon katsayısı olan 2 değeri ile çarpılmıştır. Bir kare içindeki toplam hücre sayısının ortalama 20-50 arasında olmasına dikkat edilmiş olup (toplam 16 kare içinde 200-500 adet) bu değerler dışında bir değer elde edilmiş ise, hücrelerin dilüsyonu tekrar yapıp, sayım tekrarlanmıştır.

$$\text{Sayılan hücre} \times \text{dilüsyon katsayısı} \times 10^4$$

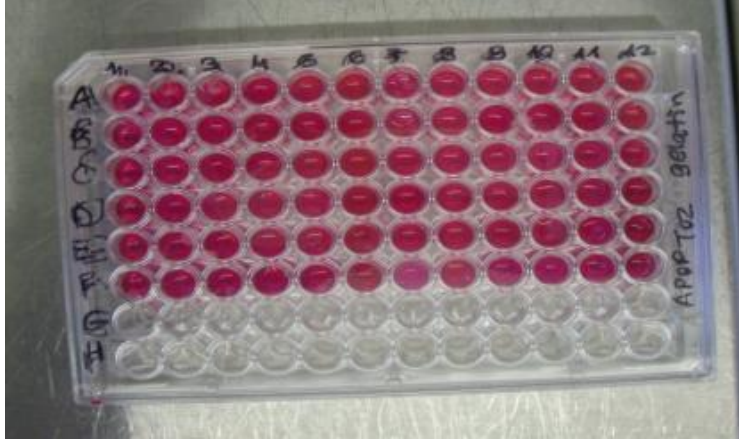
4. 2. 7. Caco-2 Hücrelerinde Hiperforinin Oluşturduğu Apoptozun Saptanması

Caco-2 hücrelerinde apoptozun saptanması APOPercentage Apoptoz Kiti (Biocolor life science assays, Biocolor Ltd, 8 Meadowbank Road, Carrickfergus, County Antrim, BT38 8YF, UK) ile saptanmıştır (Resim 13).



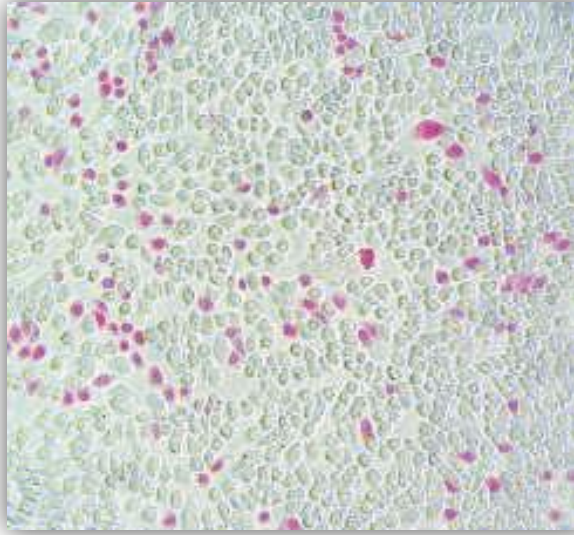
Resim 13. Ticari olarak satın alınan APOPercentage Apoptoz Kiti

1. Steril kabin içinde, 96 kuyucuklu steril plak içindeki kuyucukların içine hazır halde kit içinde verilen % 0. 4'lük jelatin çözeltisinden 100 µl kondu ve en az 10 dakika steril kabin içinde bekletildi.
2. Caco-2 hücreleri 200 µl besiyeri içinde yaklaşık 3×10^4 olacak şekilde jelatin kaplı plağa ekilmiştir (kit içeriğinde hücrelerin ekim aralığı 2×10^4 ile 5×10^4 olarak verilmiştir).
3. Hücreler 37°C/ % 5 CO₂ etüvde, kuyucukları kaplayacak şekilde yaklaşık 24 saat inkübe edildi.
4. Enkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklar taze besiyeri ile yıkanarak, inkübasyon besiyeri ile jelatin çıkartıldı.
5. 100 µl taze besiyeri içinde değişik konsantrasyonlarda hiperforin (5, 15, 30, 60 ve 90 µM) çözeltisi eklenir veya yaklaşık 48 saat daha 37°C/ % 5 CO₂ etüvde inkübasyona bırakıldı.
6. Inkübasyon süresinin bitmesine 30 dakika kala, her kuyucuğa tam ortasına, 100 µl taze kültür besiyeri içinde 5 µl APOPercentage Dye (boya çözeltisi) konuldu ve tekrar 37°C/ % 5 CO₂ etüvde son 30 dakikalık inkübasyona bırakıldı (Resim 14).



Resim 14. Boya eklenen ve inkübasyona bırakılan kuyucuklar

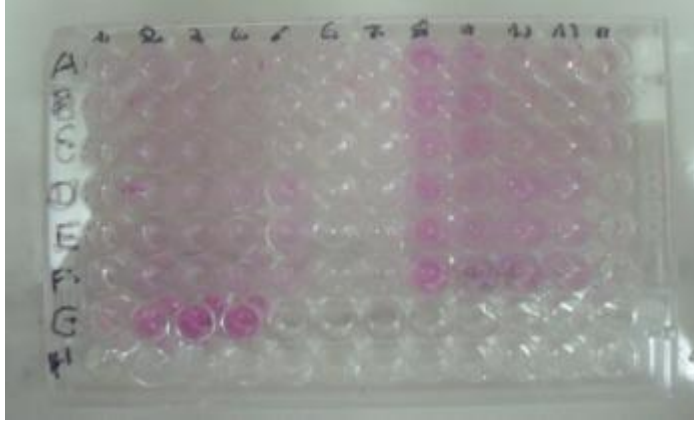
7. İnkübasyon süresinin sonunda, kültür besiyeri ve boya karışımı aspire edildi ve hücreler 200 µl PBS çözeltisi ile yıkandı.
8. İnvirt mikroskopta görüntüler incelendi.



Resim 15. Apoptotik hücrelerin mikroskopta görünümüne örnek

Mikroskopik alandan çekilen resimlerde istenirse hücre sayımı göz ile ya da program ile yapılabilir. Yaptığımız deneyde çok fazla hücre yığılması olduğundan, apoptoz miktarı hücrelerin aldığı boyanın çözülmesi sonucunda absorbans miktarı ölçülerek saptanmıştır (Resim 16)

1. Hücreler yıkandıktan sonra 100 µl boya salıcı eklendi ve plak 10 dakika 100 rpm’de plak çalkalayıcıda çalkalandı.



Resim 16. Kuyucuklara boya salıcı eklendikten sonraki görünüm

2. Bu sürenin sonunda, her kuyucuktan alınan 100 µl çözünmüş olan boya içeren kısım diğer iki kuyucuktan alınan örnekler ile birleştirilerek 300 µl olan çözelti, başka bir 96 kuyucuklu steril olmayan plak içine kondu ve 550 nm’de ELISA okuyucuda okundu.

4. 2. 8. İn vitro Tüp Benzeri Yapıların Oluşturulması

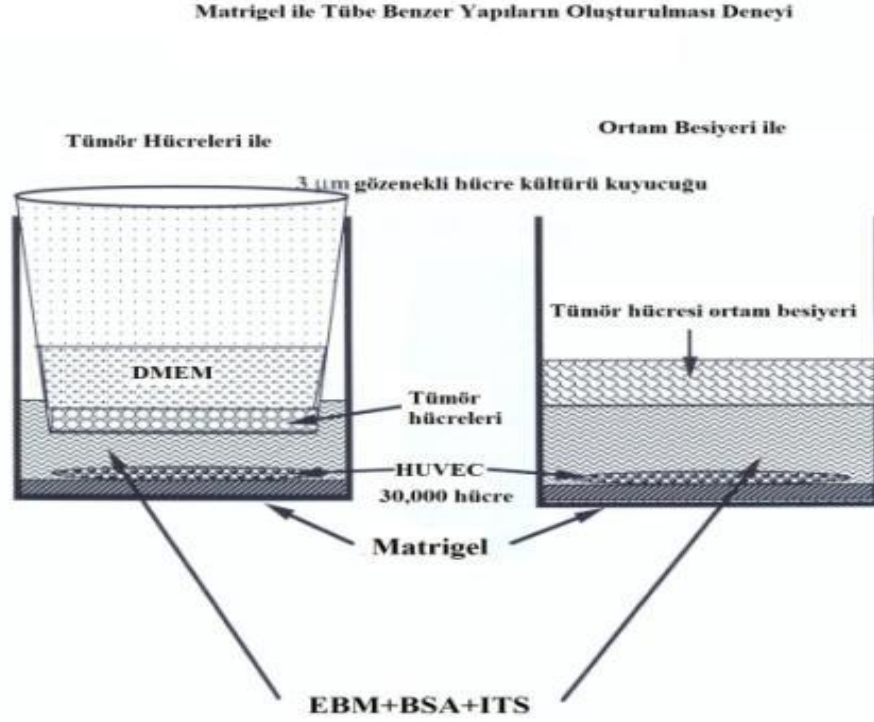
(İnsan Vücudunda Kapiller Damar Yapılarının Oluşmasının Örneklenmesi)

Tümör hücreleri ve tümör ortam besiyeri kullanılarak endotel hücrelerinin kapiller damarları oluşturması Grant ve arkadaşlarının metodu kullanılarak gerçekleştiril (Şekil 9)(15)

Bu denemede amacımız şöyle özetlenebilir; kapiller tüp yapılarının oluşması sadece endotel hücrelerine özgü bir durum olup, diğer hücre tipleri farklı yapılar oluşturmaktadırlar. Bu tüp yapılarının oluşması aynı zamanda ölçülebilir olup (tüp yapılarının uzunluğu, tüp dallanma bölgelerinin sıklığı v. b) bu yöntem ile anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörlerin damar oluşmasında ve tümörlerin yayılım göstermesindeki etkilerinin anlaşılmasında, anjiogenezdeki etkili mekanizmaların anlaşılmasında iyi bir model oluşturduğu belirtilmiştir. Bu model sistemi in vitro olarak damar oluşumlarının gösterilmesinde kullanılmaktadır.

Hazır ticari olarak satılan bazal membran -20°C’de donmuş bir halde bulunmakta olup, +4°C’de sıvı halde, 37°C’de ise katı jel hale dönüşmektedir. Bu nedenle, 24 kuyucuklu

plak ile çalışırken plaklar ve pipet uçları daha önceden buzdolabında soğutulmuştur. Matrijel oda ısısında katı hale geçmeye başladığından ve 37 °C’de katı bir jel haline geçtiğinden ve bu halden sonra tekrar sıvı hale geçemediğinden, çalışma buz içinde gerçekleştirilmiş, plaklar daha sonra inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 9. Tübe benzer yapıların oluşturulması deneyinin şematik gösterilmesi

4. 2. 8. 1. Caco-2 hücreleri ile tüp benzeri yapıların oluşturulması

1. 24 kuyucuklu plaklarda belirlenen kuyucuklara 275 µl matrijel kondu
2. Plak 30 dakika 37°C’de/%5 CO₂’li etüvde enkübasyona bırakıldı.
3. Enkübasyon sonunda kuyucuklara 800 µl serum içermeyen besiyeri (EBM çözeltisi içinde % 1 BSA ve %1 ITS) kondu.
4. Hemen ardından kuyucuklara 200 µl M199 çözeltisi içinde yaklaşık 30,000 Huvec hücresi ekildi.
5. Bir saat 37°C’de/%5 CO₂’li etüvde inkübasyondan sonra kuyucuklara 0. 3 µM membran içeren küçük yuvalar yerleştirildi ve içlerine içinde % 2 BSA içeren 1.0 mL DMEM besiyeri içinde Caco-2 hücre hatları ml’de 10,000, 50,000 ve 100,000 olacak şekilde ekildi.

6. Plak 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde 16 saat inkübasyondan sonra insertler çıkartıldı, içindeki besiyeri dikkatlice döküldü ve invert mikroskopta resimleri çekildi.



Resim 17. Caco-2 hücrelerinin Matrijel içeren 24 kuyucuklu plakta ekilmiş hali

4. 2. 8. 2. Caco-2 hücrelerinden elde edilen ortam besiyeriyle tüp benzeri yapıların oluşturmaları

1. 24 kuyucuklu plaklarda belirlenen kuyucuklara 275 µl matrijel kondu
2. Plak 30 dakika 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde enkübasyona bırakıldı.
3. Enkübasyon sonunda kuyucuklara 300 µl serum içermeyen besiyeri (EBM çözeltisi içinde % 1 BSA ve %1 ITS) kondu.
4. Hemen ardından kuyucuklara 200 µl M199 çözeltisi içinde yaklaşık 30,000 Huvec hücresi ekildi.
5. Bir saat 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde enkübasyondan sonra içlerine Caco-2 tümör hücrelerinin ortam besiyeri ve hiperforinin değişik konsantrasyonlarını içeren ortam besiyerleri 500 µl olacak şekilde eklendi.
 - İlk kuyucukta yalnızca Huvec hücreleri kontrol olarak bırakıldı.
 - Sonraki 5 kuyucuğa (5, 15, 30, 60 ve 90 µM) hiperforin çözeltisi eklenmiş tümör hücresi ortam besiyerinden kondu.
 - Son kuyucuğa ise Caco-2 tümör hücresinin sadece kendisi ortamda iken elde edilen ortam besiyerinden kondu.

6. Plak 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde 16 saat inkübasyondan sonra içindeki besiyeri dikkatlice döküldü ve invert mikroskopta resimleri çekildi.

4. 2. 9. Hücre Canlılığının Saptanması

Hücre canlılığının saptanması için ticari kit kullanıldı. (Calcein AM Cell Viability Assay Kit, Biotium, Inc. 3423 Investment Blvd. Suite 8, Hayward, CA 94545, USA. Katalog Numarası 30026). Calcein AM boyası geniş olarak kullanılan ve yeşil floresan ışık veren bir belirleyicidir. Canlı hücrelerde floresans hale gelen Calcein AM boyası hücre içinde girmekte ve burada kalmaktadır ve böylece canlı hücre sayılarının saptanmasında kullanılmaktadır.

1. 96 kuyucuklu steril plağa, denemenin gerçekleştirilmesinden bir gün önce 100 µl yalnızca DMEM çözeltisi içinde, hücre sayısı yaklaşık 5.000 olacak şekilde Caco2 hücreleri ekildi.
2. Yaklaşık 24 saat bir gece 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde enkübasyona bırakıldı.
3. Bu sürenin sonunda, Caco-2 hücrelerini içeren birer kuyucuk kontrol amaçlı bırakıldıktan sonra, diğer kuyucuklara sırasıyla hiperforin örneklerinden hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki (3, 15, 30, 60 ve 90 µM hiperforin) çözeltilerden 100'er µl kondu ve plak yine bir gece 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde enkübasyona bırakıldı.
4. Bu süre tamamlandıktan sonra, kuyucukların içindeki besiyeri aspire edildi.
5. Her bir kuyucuğa PBS içinde stok çözeltiden hazırlanmış 100 µl, 2 µM Calcein-AM boyasından kondu.
6. 37°C'de/%5 CO₂'li etüvde en az 30 dakika olmak üzere enkübe edildi.
7. Bu sürenin sonunda floresan mikropalak okuyucuda (ThermoLabsystem Fluoroskan Ascent FL) 485-530 nm dalga boylarında emisyon katsayıları ölçüldü. Hücre canlılığı için örnekler üçer kez çalışılmış ve ortalama değerler alınmıştır.

4. 2. 10. Proliferasyon Deneyi

Proliferasyonun saptanması için Promega Firmasına ait ticari kit kullanılmıştır. (CellQNon-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road-Madison, WI, USA).

1. Huvec hücreleri 50 µl M 199 içinde yaklaşık 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa ekildi.
2. İki kuyucuk sadece Huvec hücreleri (kontrol) içermekte idi ve 50 µl M 199 eklenip toplam miktar 100 µl'ye tamamlandı.
3. Diğer kuyucuklara Caco-2 hücrelerinin ortam besiyerinin farklı miktarlarından (10, 20, 30, 40, 50 µl) eklendi ve her biri 50 µl olacak şekilde DMEM ile tamamlandı ve böylelikle kuyucuklardaki çözelti miktarları 100 µl'ye tamamlanmış oldu.
4. Daha önceden Huvec ekilmiş farklı kuyucuklara ise, hiperforinin farklı konsantrasyonlarından (5, 15, 30, 60 ve 90 µM) 50 µl eklendi.
5. Plak 37°C/% 5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edildi.
6. Bu sürenin sonunda kuyucuklara 20 µl MTS/PMS çözeltisi kondu.
7. Plak tekrar 37°C/% 5 CO₂'li etüve kondu ve 2 saat bekletildi (yöntemde bunun 1-4 saat arasında olması gerektiği belirtilmiştir) ve absorbanslar 490 nm'de ELISA plak okuyucusunda (ThermoLabsystem Multiskan Specturum) saptandı.

Her kontrol ve örnek konsantrasyonu üçer kez çalışılmış ve ortalama değerler kullanılmıştır.

5. BULGULAR

5. 1. Caco-2 hücreleri ile indüklenen tüp benzeri yapı oluşumunun hiperforin ile inhibisyonu



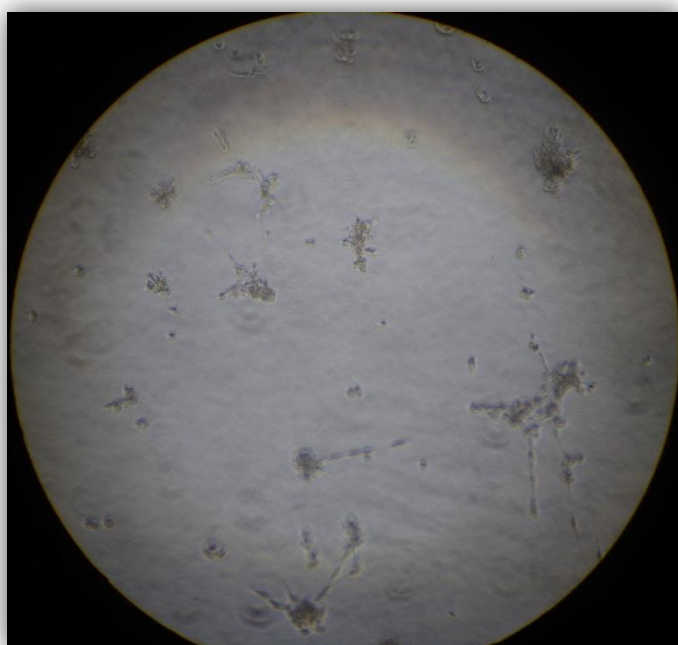
Resim 18. Huvec + Caco-2 (50.000 hücre /ml)



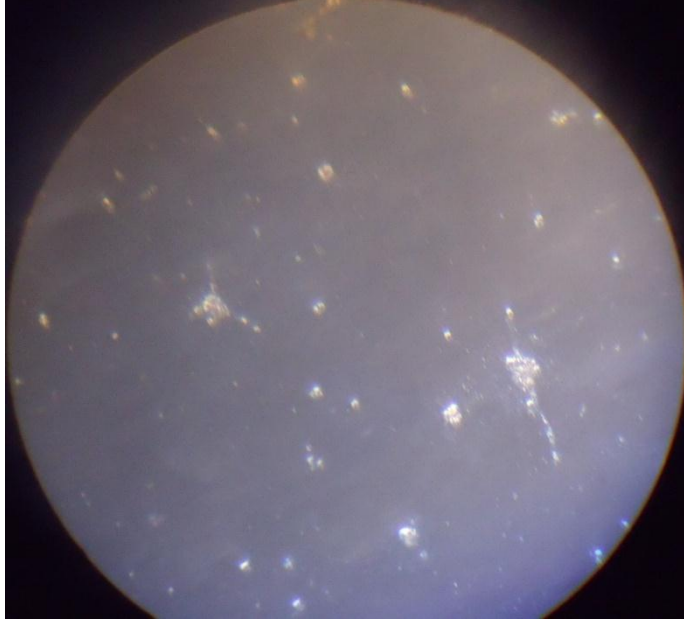
Resim 19. Huvec + Caco-2 +15 µM Hiperforin



Resim 20. Huvec + Caco-2 +30 μ M Hiperforin



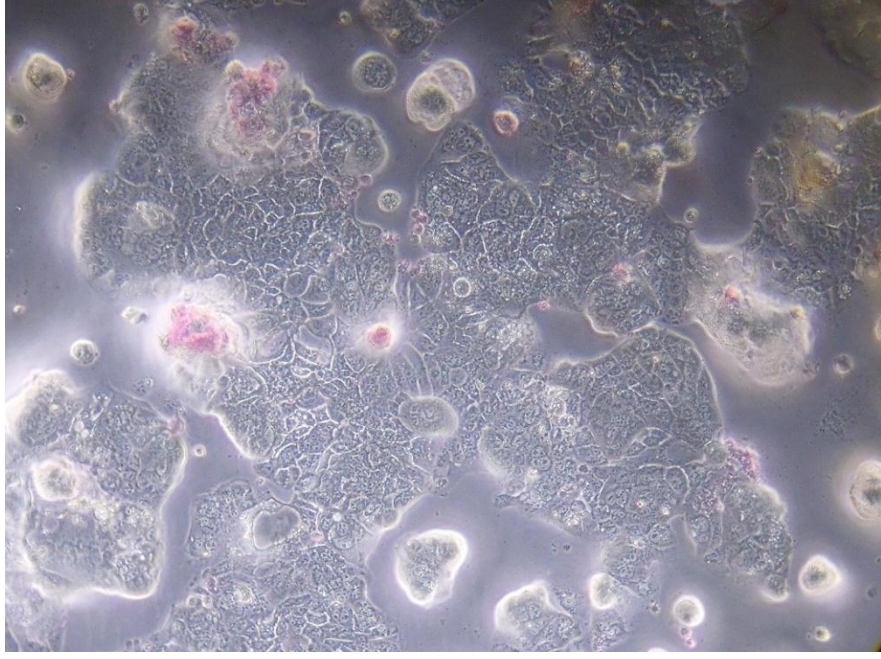
Resim 21. Huvec + Caco-2 +60 μ M Hiperforin



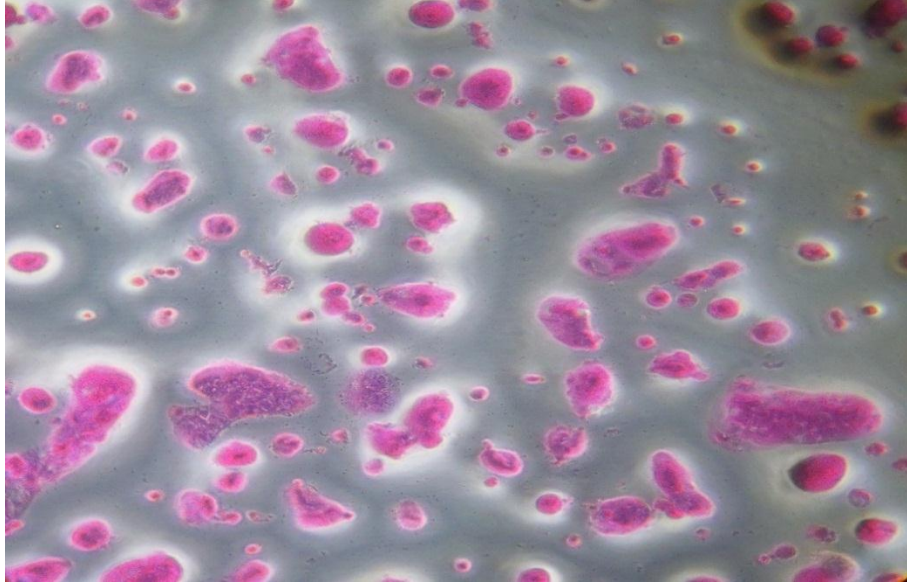
Resim 22. Huvec + Caco-2 +90 µM Hiperforin

5. 2. Hiperforinin Caco-2 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkisi

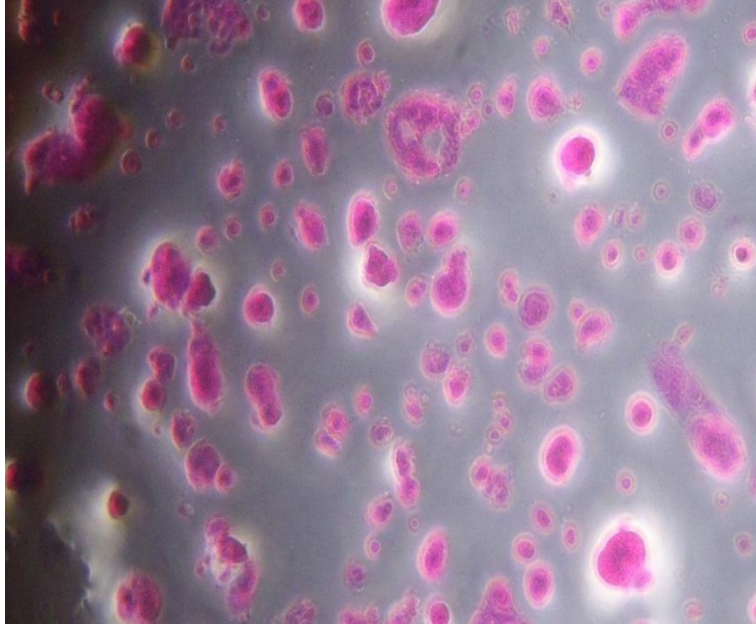
Apoptoz deneyinin sonlanmasından önce kuyucuklara boya çözeltisi konduğunda Caco-2 hücrelerinin bulunduğu kuyucuklarda hücreler canlı haldeydiler. Oysa, hiperforin çözeltilerinin eklendiği kuyucuklarda hücreler gittikçe artan miktarlarda birbirlerine tutunmuş ve canlılıklarını kaybetmiş durumda idiler. Hiperforinin en yüksek düzeyde bulunduğu (90 µM) kuyucukta hemen hiç canlı hücreye rastlanmamış olup hücreler birbirleri üzerinde kümelenmiş durumda idi.



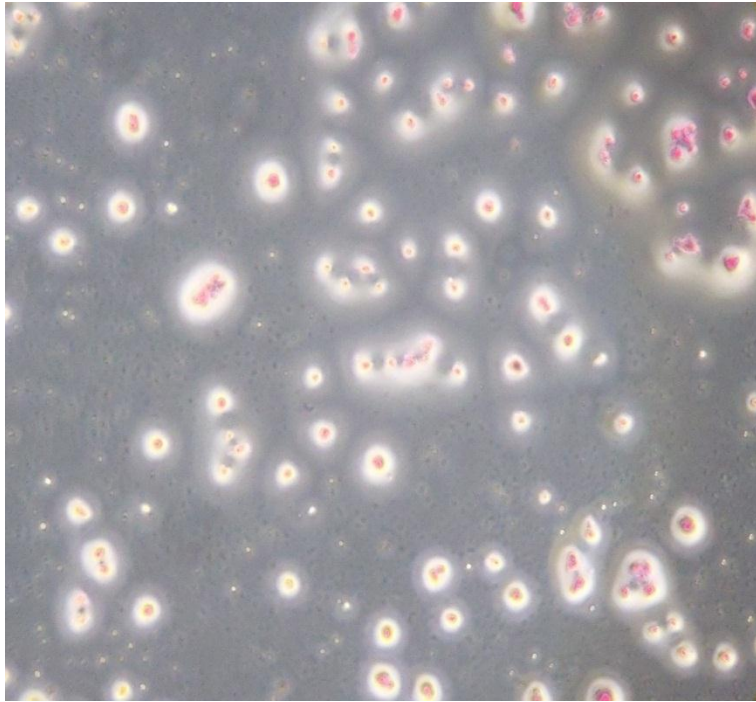
Resim 23. Caco-2 Hücreleri (Kontrol)



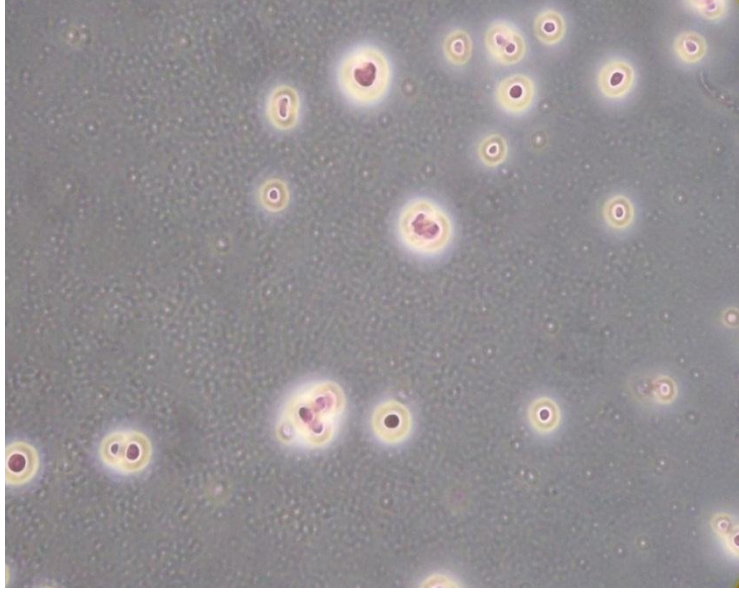
Resim 24. 15 µM Hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri



Resim 25. 30 µM Hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri



Resim 26. 60 µM Hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri

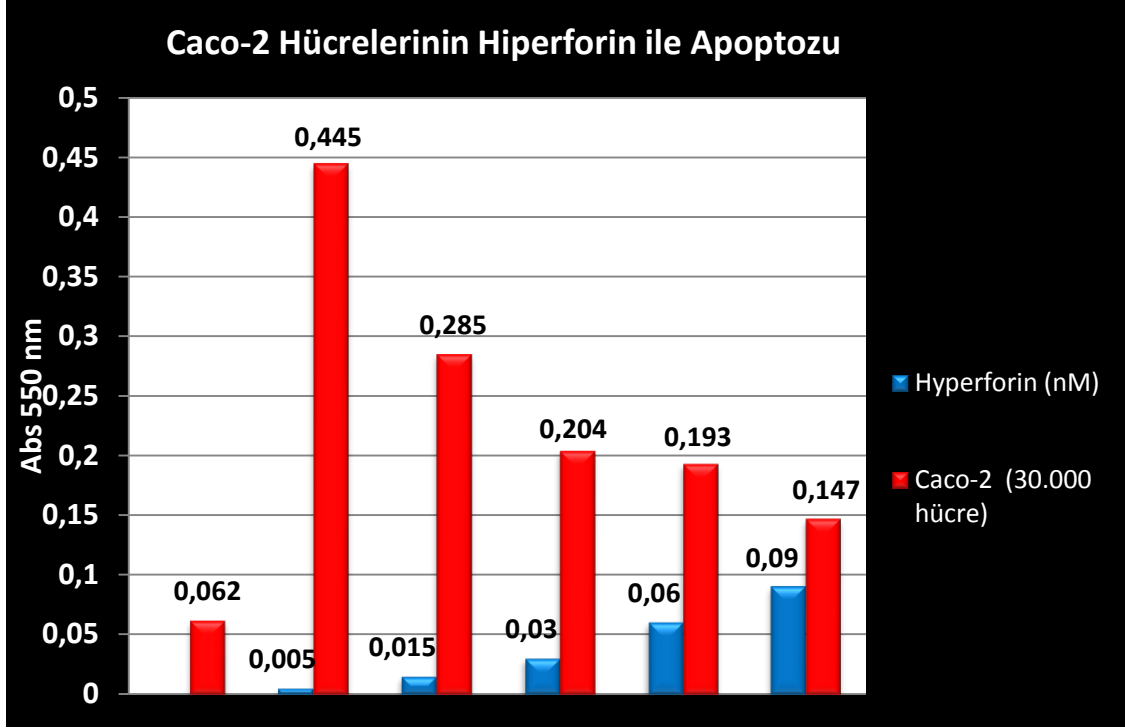


Resim 27. 90 μ M Hiperforin uygulanmış Caco-2 hücreleri



Resim 28. 90 μ M Hiperforin uygulanmış Caco-2 hücrelerinin tüm objektif sahası görünümü

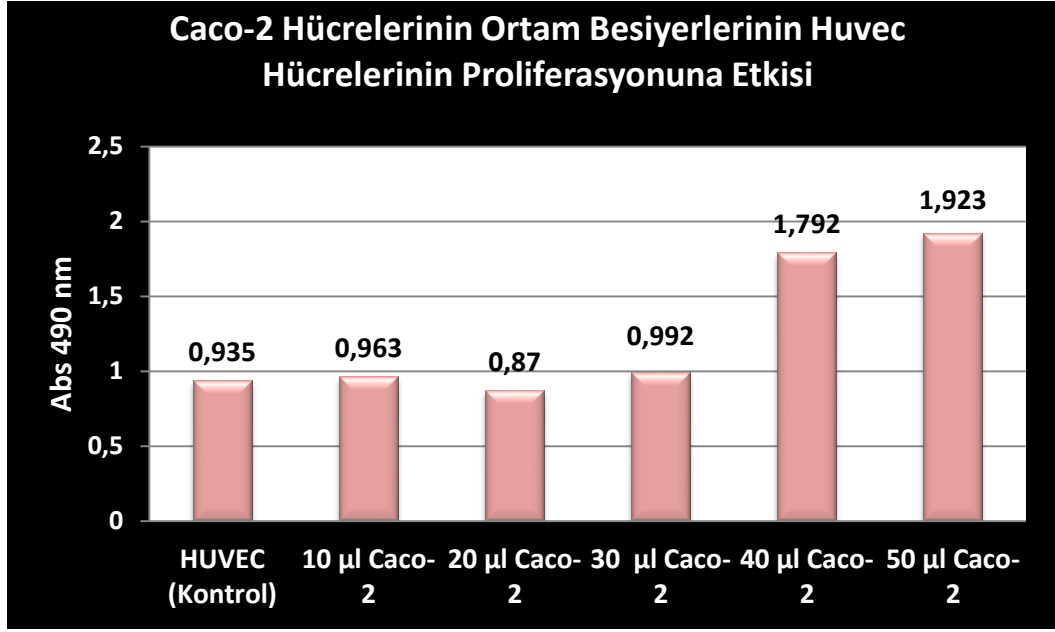
Hiperforinin artan konsantrasyonları ile birlikte apoptotik hücre oranının arttığı gözlenmekle birlikte, en düşük ikinci konsantrasyon olan 15 μ M dozunun dahi hücrelerin %80-90'ını apoptoza götürdüğü saptanmıştır. En yüksek dozlara ulaşıldığında ise, hücreleri apoptoza götürmekten çok bilinmeyen bir nedenle nekroza götürdüğü saptanmıştır. Caco-2 hücrelerinin hiperforinin farklı dozları ile apoptoza uğratılması şekil 10'da gösterilmiştir.



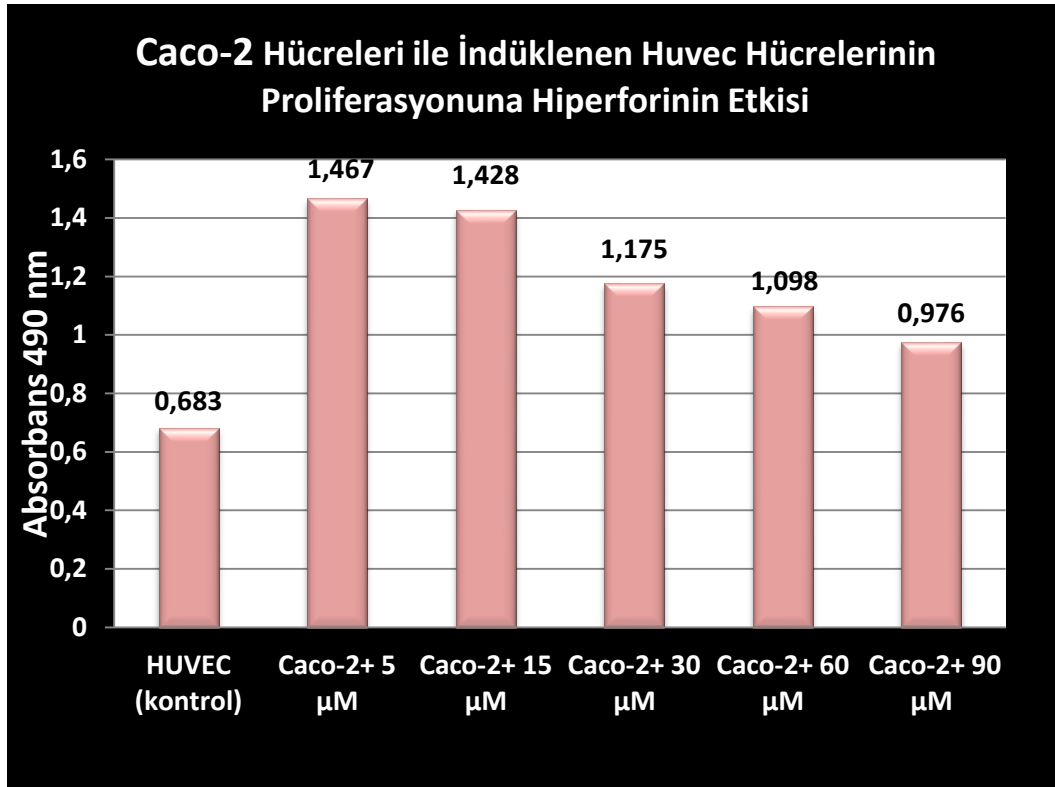
Şekil 10. Caco-2 hücrelerinin hiperforin yoluyla apoptozu

5. 3. Hiperforinin Huvec Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi

Caco-2 tümör hücrelerinden elde edilen ortam besiyerinin farklı konsantrasyonlarının Huvec hücrelerinin proliferasyonuna etkisi şekil 11'de gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin besiyerine hiperforinin değişik konsantrasyonları eklendikten sonra elde edilen ortam besiyerinin Huvec hücrelerinin proliferasyonuna etkisi şekil 12'de gösterilmiştir.



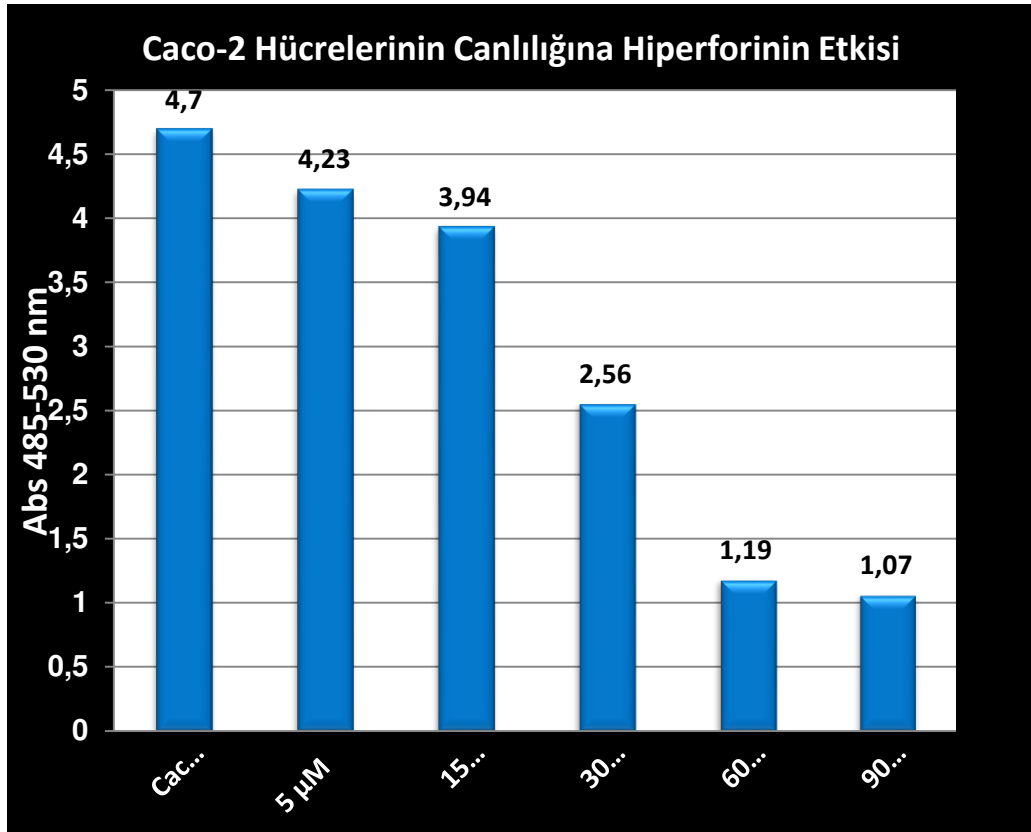
Şekil 11. Caco-2 hücrelerinden elde edilen ortam besiyerinin farklı konsantrasyonlarının Huvec hücrelerinin proliferasyonuna etkisi



Şekil 12. Caco-2 hücreleri ile indüklenen Huvec hücrelerinin proliferasyonlarına farklı konsantrasyonlardaki hiperforinin etkisi

5. 4. Hiperforinin Tümör Hücrelerinin Canlılığına Etkisi

Caco-2 hücrelerinin canlılığının üzerinde hiperforinin farklı konsantrasyonlarının etkileri incelendiğinde, artan konsantrasyonlarla birlikte hücre canlılığında önemli ölçüde azalma olduğu saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 90 μ M’de ise absorbansın çok düşük olduğu bunun da direkt olarak canlı hücrenin konsantrasyonunun çok az olduğunu göstergesi olduğu düşünülmektedir (şekil 13).



Şekil 13. Caco-2 hücrelerinin canlılığına hiperforinin değişik konsantrasyonlarının etkisi

6. İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Verilerin analizinde ANOVA kullanılmıştır. İstatistik'te ANOVA (veya Varyans Analizi), gözlenen varyansı çeşitli kısımlara ayırma yöntemiyle bazı değişkenlerin başka bir değişken üzerindeki etkisini incelemeye yarayan modelleme türüne verilen genel isimdir. Bu yöntem istatistikçi ve genetikçi Ronald Fisher tarafından 1920'li ve 1930'lu yıllarda geliştirilmiştir.

ANOVA ile hiperforinin farklı konsantrasyonlarının Caco-2 tümör hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan uygulamaların deney ve kontrol grupları arasında incelenen değişkenler bakımından anlamlı bir fark yaratıp yaratmadığını belirlemek üzere Varyans Analizi (Univariate Analysis of Variance) uygulanmıştır.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Epidemiyolojik veriler, doğada bulunabilen, diyetle alınabilecek kadar sağlıklı ve toksik olmayan ve uzun süre kullanılabilir maddelerin yararlı etkilerinin olduğu ve insan sağlığının sürdürülmesinde alternatif olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Hiperforin son yıllarda yeni bir anti-kanser ve anti-metastatik ilaç olarak önerilmektedir.

Kanserin ilerlemesi anjiogeneze bağımlı olup, geleneksel olarak kullanılan ilaçlar anjiogeneze bağlı prosesleri tedavi etme amacı gütmektedir. Anjiogenez inhibitörleri sıralanan basamaklardan herhangi birini bloklamaktadır; bazal in vivo membranın yıkılması, endotel hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu, son olarak endotel hücrelerin tübe benzer yapılar oluşturması yani yeni kan damarlarının oluşmasıdır.

Anjiogenez sürecinde endotelyal hücre şekillenmesinde önemli bir basamak yeni damar oluşturmak üzere endotelyal hücrelerin değişim ve yeniden şekillenmesidir. Lorusso ve arkadaşları Huvec hücrelerini matrijel üzerine yerleştirdikten 6 saat sonra Huvec hücrelerinin anjiogenik uyarıya cevap olarak tüp benzeri yapılar oluşturduğunu, hiperforinin Huvec hücrelerindeki bu oluşumu artan dozla artan bir şekilde etkilediğini ve tüp benzeri yapıları engellediğini göstermişlerdir (42).

Martinez-Poveda ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada matrijel üzerine ekilmiş endotelyal hücrelerde birkaç saat içinde tüp benzeri yapıların oluştuğunu ve bu yapıların inhibisyonu için en düşük hiperforin konsantrasyonunun 2,5 μ M olduğunu tesbit etmişlerdir (9).

Araştırmamızda Caco-2 hücrelerinin Huvec hücrelerinde tüp benzeri yapıların oluşumunu tetiklediğini ve bunun hiperforin yolu ile inhibe edildiğini saptadık. Aynı zamanda, hiperforinin tümör hücrelerinin Huvec hücrelerinde indüklediği proliferasyonu da engellediği gözlenmiştir. Ayrıca, hiperforinin doza bağlı olarak Caco-2 hücrelerinde canlılığı önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur.

Elde ettiğimiz in vitro sonuçlar açıkça göstermiştir ki, hiperforin anjiogenezin en önemli iki basamağını olan endotel hücrelerde tümör hücrelerinin oluşturduğu proliferasyonu ve tube benzer yapıların oluşumunun inhibe etmiştir.

Rotley ve arkadaşları çalışmalarında, hiperforinin lenfatik endotelial hücre hatlarında (LEC) proliferasyon ve lenfoanjiogenezi inhibe ettiğini (58), ayrıca hiperforinin doza bağlı olarak, Caco-2 hücrelerinde ciddi bir şekilde apoptozu indüklediği ve hücreleri ölüme götürdüğünü saptamışlardır (43).

Lorusso ve arkadaşlarının endotelial hücre büyümesi, yayılımı ve apoptozu üzerine hiperforinin etkisini inceledikleri çalışmada; anjiogenik uyarı ile Huvec hücrelerinde proliferasyon sağladıktan sonra farklı konsantrasyonlarda hiperforin eklemiş; 72 saat sonra hiperforinin 9-27 μM 'lık düzeylerinde hücre proliferasyonunun anlamlı olarak inhibe edildiğini, hiperforinin 3-9 μM 'lık düzeylerinde ise uzun sürede bile bu etkinin gözlenmediğini belirtmişlerdir (42).

Schempp ve arkadaşları HDMEC (insan derisi kılcal damar endotelial hücresi) ile yaptıkları çalışmada; hiperforinin apoptozu uyarak hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak azalttığını (IC_{50} : 2 $\mu\text{g/ml}$), yüksek hiperforin konsantrasyonlarında (100 $\mu\text{g/ml}$ üzerinde) apoptozun olmadığını, hiperforinin 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda tüp benzeri yapıların oluşumunun tamamen engellendiğini göstermişlerdir (25).

Martinez-Poveda ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada hiperforinin hücre kültüründe endotelial hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini ve IC_{50} nin $7\pm3 \mu\text{M}$ olduğunu, endotelial olmayan hücrelerde ise benzer eğrilerin elde edildiğini ancak IC_{50} değerinin MDA-MB 231 insan meme kanseri hücrelerinde 12 ± 4 , NIH-3T3 ölümsüz fare fibroblastlarında ise $49\pm12 \mu\text{M}$ olduğunu tesbit etmişlerdir (9).

Çalışmamızda, çeşitli araştırmacıların kullandığı hiperforin dozlarından yola çıkılmış olup, bu dozun aşılmasına dikkat edilmiştir. Caco-2 tümör hücre hattında en çok apoptotik hücre sayısını hiperforinin 15 ve 30 μM 'lık konsantrasyonlarında saptadık. Yüksek

konsantrasyonlarda hiperforine maruz kalan hücrelerin, apoptotik hücre aktivasyonundan önce nekrotik yolda öldüğünü düşünmekteyiz. Bu nedenle, hastalarda tedavide hiperforin ekstraktının optimum dozun ayarlanmasında bu verilerin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Kanserlerin tedavisinde yeni bir ilaç geliştirilirken istenen en önemli şey önemli ölçüde anti-tümöral aktivitesi olması ve aynı zamanda da toksisite göstermemesidir. Bitkilerden türetilen yeni bir kanser ilacının, kemoterapötik ajan olarak kullanılabilmesi için elde edileceği bitkiden کافی derecede bol üretilebilmesi gereklidir. Hiperforinin başlıca bileşeni olduğu açılfloroglukinol tipi bileşikler, St John's wort bitkisinde en çok bulunan gruptur. İlacın kuru ekstraktı % 5'den fazla hiperforin içermektedir. İn vivo olarak kullanıldığında toksisitesinin çok düşük olması ve doğal olarak bulunabilmesi nedeniyle hiperforinin potansiyel anti-tümöral bir ilaç olarak üzerinde daha fazla çalışılmasını ve araştırma yapılmasını hak etmektedir.

Şimdiye kadar hiperforin ile ilgili yurt dışı ve yurt içinde çalışmaları incelendiğinde, bu konuda yapılan çalışmaların henüz sınırlı sayıda olduğu gözlenmiş olup, Caco-2 hücreleri üzerinde apoptoz, in vitro anjiogenezin modellenmesi, proliferasyon ve hücre canlılığı ile ilgili tüm çalışmaların bir arada yürütüldüğü bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda, çalışmamızda elde ettiğimiz veriler henüz çok yeni olup, tümör hücrelerinin hiperforin yolu ile inhibisyonunun farklı deneyler ile saptandığı ilk çalışma olmuştur.

Gelecekte çalışmalara ışık tutabileceğini düşündüğümüz önerilerimiz şöyledir;

1. Hiperforin yoluyla, apoptozun, proliferasyonun, tüpe benzer yapıların oluşmasının engellenmesi ve hücre canlılığının inhibisyonu ile ilgili olarak hiperforin bileşiğinin en düşük dozu kullanılması ile ilgili çalışmaların yapılmasının zorunlu olduğu düşünülmektedir.
2. Tümör hücrelerinden ve onların hiperforin ile muamele edilmesinden elde edilen ortam besiyerlerinden çeşitli kaspazların aktiviteleri saptanarak apoptoz mekanizmasının moleküler düzeyde saptanabilmesi mümkün olabilir.
3. Yine, farklı kanser hücrelerinde aynı mekanizmalar kullanılarak ve Huvec hücrelerinin migrasyonunun da hiperforin yolu ile inhibisyonunun gösterilmesinin, yeni kan damarları oluşumunun mekanizmasının aydınlatılmasında önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Bütün bu bilgilerin ve in vivo çalışmaların ışığında hiperforinin kanseri önleyici ve/veya tedavi edici bir bileşik olarak kullanılması mümkün olabilecektir. Hiperforinin bu tür antianjiogenik özelliklerinin daha ileri düzeyde incelenmesi gereklidir. Hiperforinin anti-anjiogenik etkilerinin saptanması yoluyla yakın gelecekte insanlarda kanserlerin tıbbi olarak önlenmesi ve tedavi edilmesinde ilerleme kaydedileceğini düşünmekteyiz.

8. ÖZET: Bitkilerin tedavide kullanımları insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. Bitkilerden türetilen yeni bir kanser ilacının, kemoterapötik ajan olarak kullanılabilmesi için elde edileceği bitkiden کافی derecede bol üretilebilmesi, önemli ölçüde anti-tümöral aktivitesi olması ve aynı zamanda da toksisite göstermemesi gereklidir.

Anjiogenez, hali hazırda var olan kan damarlarından, yeni kan damarlarının oluşumu olup; anjiogenez için en spesifik testlerden biri endotelial hücrelerin üç boyutlu yapılar (tüp benzeri yapılar) oluşturmasının ölçülmesidir. Anti-anjiogenik bir ilacın, sadece tümör hücreleri damar yapısına ait olan endotel hücrelerin büyümesini spesifik olarak inhibe ederek, tümörün büyümesini engellemesi umulmaktadır.

Hiperforinin başlıca bileşeni olduğu açılfloroglukinol tipi bileşikler, St John's wort bitkisinde en çok bulunan gruptur. Birbiri ile ilişkili bir çok araştırma hiperforinin antikarsinojenik, antiproliferatif, proapoptotik, antiinvaziv ve antimetastatik etkilerinin toplamı olan antineoplastik gücünü göstermiştir.

Bizim bu çalışmada amacımız; hiperforinin, anti-tümöral ve anti-apoptotik etkilerinin hücresel düzeyde incelenmesi, hiperforinin, Caco-2 hücre hatlarının Huvec hücrelerinde oluşturduğu anjiogenezi nasıl etkilediğinin gösterilmesi, ayrıca hiperforinin kanserli hücrelerin yayılımında ve metastaz oluşturmada çok önemli olan tümör hücrelerinin proliferasyonlarını ve hücrelerin canlılığını nasıl etkilediğinin gösterilmesidir.

Araştırmamızda Caco-2 hücrelerinin Huvec hücrelerinde yeni kan damarları oluşumunu (tübe benzer yapıların) tetiklediği ve bunun hiperforin yolu ile inhibe edildiğini, hiperforinin; tümör hücrelerinin Huvec hücrelerinde indüklediği proliferasyonu da engellediğini, hiperforinin doza bağlı olarak Caco-2 hücrelerinde canlılığı önemli ölçüde azalttığını, tümör hücrelerinin besiyerine hiperforinin değişik konsantrasyonları eklendikten sonra elde edilen ortam besiyerinin artan konsantrasyonla artan bir şekilde Huvec hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve hiperforinin artan konsantrasyonları ile birlikte apoptotik hücre oranını artırdığını gözlemledik.

Bütün bu bilgilerin ışığında toksisitesi çok düşük olan ve doğal olarak bulunabilen hiperforinin anti-anjiogenik etkilerinin saptanması yoluyla yakın gelecekte insanlarda kanserlerin tıbbi olarak önlenmesi ve tedavi edilmesinde ilerleme kaydedileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hiperforin, Anjiogenez, Apoptoz, Tüp Benzeri Yapılar

9. SUMMARY:

The use of plants in treatment of diseases dates back to ancient times. A new anticancer drug derived from plants should be able to be obtained in large quantities and have sufficient anti-tumour effects and should not have toxicity so that it can be used as a chemotherapeutic agent.

Angiogenesis is formation of new blood vessels from already available vessels and one of the most specific tests for angiogenesis is to measure three dimensional tube-like structures created by endothelial cells.

It is expected that an anti-angiogenic drug inhibits only proliferation of endothelial cells of the tumour cells and thus prevents tumour growth.

Phloroglucinol compounds, the leading element of hiperforin, are most found in St John's wort. Many studies have shown anti-neoplastic power of hiperforin involving its anti-carcinogenic, anti-proliferative, pro-apoptotic, anti-invasive and anti-metastatic effects.

The aim of this study was to investigate anti-tumour and anti-apoptotic effects of hiperforin on cells, to show how hiperforin affects angiogenesis in Huvec cells caused by Caco-2 cell lines and to reveal how hiperforin affects tumour cell proliferation and cell viability which play an important role in invasion of cancerous cells and metastases.

We found that Caco-2 cells triggered formation of new vessels (tube-like structures) and that hiperforin inhibited this formation, prevented proliferation in Huvec cells induced by tumour cells and decreased viability of Caco-2 cells depending on its dose. In addition, increased concentrations of the conditioned medium obtained through adding various concentrations of hiperforin to tumour cell conditioned medium increasingly inhibited Huvec cell proliferation and higher concentrations of hiperforin increased the rates of apoptotic cells.

It can be concluded that anti-angiogenic effects of hiperforin, found in the nature and having low toxicity, should be investigated, which can contribute to prevention and treatment of cancer in the future.

Key Words: Hiperforin, Angiogenesis, Apoptosis, Tube Like Structure

10. KAYNAKLAR

- (1) Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 2009;12(3):267-74.
- (2) Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J Pathol* 2003 July;200(4):465-70.
- (3) Ferrara N, Follis G. *Tissue Growth and Repair*. 2011.
Ref Type: Online Source
- (4) Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 2009;12(3):267-74.
- (5) Olgar Ş, Yetgin S. Anjiogenezis. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003;(46):139-47.
- (6) Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003 January;49(1):32-40.
- (7) Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992 April;3(2):65-71.
- (8) Folkman J. Diagnostic and therapeutics application of angiogenesis research. *Sciences de la vie, Life sciences* 1993;316:914-8.
- (9) Martinez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA. Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int J Cancer* 2005 December 10;117(5):775-80.
- (10) Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005 October;15(5):378-86.
- (11) Grant DS, Kleinman HK, Martin GR. The role of basement membranes in vascular development. *Ann N Y Acad Sci* 1990;588:61-72.
- (12) Grant DS, Lelkes PI, Fukuda K, Kleinman HK. Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991 April;27A(4):327-36.
- (13) Grant DS, Kibbey MC, Kinsella JL, Cid MC, Kleinman HK. The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract* 1994 October;190(9-10):854-63.

- (14) Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 1997;79:317-33.
- (15) Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene* 2002 July 18;21(31):4765-77.
- (16) Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α --> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res* 2000 November 15;60(22):6248-52.
- (17) Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2003 April;13(2):159-67.
- (18) Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008;6(2):93-104.
- (19) Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Tıp Bilimleri Dergisi* 2003;23:499-508.
- (20) Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* 2006 June 6;79(2):105-11.
- (21) Baytop T. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün). 1999.
- (22) Çaycı MK. *Hypericum perforatum* ve *Tarantula cubensis* Özütlерinin Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Mide Mukozası Hasarına Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi; 2006.
- (23) Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sci* 2002 May 17;70(26):3077-96.
- (24) Di CG, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol Sci* 2001 June;22(6):292-7.
- (25) Schempp CM, Kiss J, Kirkin V, Averbek M, Simon-Haarhaus B, Kremer B, Termeer CC, Sleeman J, Simon JC. Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Med* 2005 November;71(11):999-1004.
- (26) Muller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin--antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* 2001 July;34 Suppl 1:S98-102.
- (27) Chatterjee SS, Biber A, Weibezahn C. Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 2001 July;34 Suppl 1:S11-S19.

- (28) Muller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res* 2003 February;47(2):101-9.
- (29) Eckert GP, Keller JH, Jourdan C, Karas M, Volmer DA, Schubert-Zsilavecz M, Muller WE. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neurosci Lett* 2004 September 2;367(2):139-43.
- (30) Kiewert C, Buchholzer ML, Hartmann J, Chatterjee SS, Klein J. Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *Neurosci Lett* 2004 July 8;364(3):195-8.
- (31) Froestl B, Steiner B, Muller WE. Enhancement of proteolytic processing of the beta-amyloid precursor protein by hyperforin. *Biochem Pharmacol* 2003 December 1;66(11):2177-84.
- (32) Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:489-517.
- (33) Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 October;307(1):254-61.
- (34) Schempp CM, Winghofer B, Ludtke R, Simon-Haarhaus B, Schopf E, Simon JC. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol* 2000 May;142(5):979-84.
- (35) Schempp CM, Hezel S, Simon JC. [Topical treatment of atopic dermatitis with *Hypericum* cream. A randomised, placebo-controlled, double-blind half-side comparison study]. *Hautarzt* 2003 March;54(3):248-53.
- (36) Albert D, Zundorf I, Dinger mann T, Muller WE, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 2002 December 15;64(12):1767-75.
- (37) Zhou C, Tabb MM, Sadatrafiei A, Grun F, Sun A, Blumberg B. Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *J Clin Immunol* 2004 November;24(6):623-36.
- (38) Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della BM, Donella-Deana A, Appendino G, Borsarini A, Caniato R, Garbisa S. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2004 September 1;64(17):6225-32.
- (39) Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 2002 February 14;21(8):1242-50.

- (40) Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel MM. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2004 September;61(17):2224-43.
- (42) Lorusso G, Vannini N, Sogno I, Generoso L, Garbisa S, Noonan DM, Albin A. Mechanisms of Hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. *Eur J Cancer* 2009 May;45(8):1474-84.
- (43) Rothley M, Schmid A, Thiele W, Schacht V, Plaumann D, Gartner M, Yektaoglu A, Bruyere F, Noel A, Giannis A, Sleeman JP. Hyperforin and aristoforin inhibit lymphatic endothelial cell proliferation in vitro and suppress tumor-induced lymphangiogenesis in vivo. *Int J Cancer* 2009 July 1;125(1):34-42.