

**KARVAKROLÜN *ras* TRANSFORM 5RP7 VE NORMAL
F2408 EMBRİYONAL FİBROBLAST HÜCRELERİ İLE
U-2 OS OSTEOSARKOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN *İN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Yıldız BODURLAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Nisan- 2012

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1101S004**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Yıldız Bodurlar'ın “**Karvakrolün *ras* Transform 5RP7 ve Normal F2408 Embriyonal Fibroblast Hücreleri ile U-2 OS Osteosarkoma Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin *İn Vitro* Araştırılması**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 15.03.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Hülya SİVAS

.....

Üye : Prof. Dr. Engin ULUKAYA

.....

Üye : Yrd. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARVAKROLÜN *ras* TRANSFORM 5RP7 VE NORMAL F2408 EMBRİYONAL FİBROBLAST HÜCRELERİ İLE U-2 OS OSTEOSARKOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Yıldız BODURLAR
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya SİVAS
2012, 117 sayfa

Bu çalışmada, bir bitkisel monoterpen olan karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etki MTT ve Nötral kırmızısı alım yöntemiyle, apoptotik etki ise morfolojik olarak AO/EB boyama ile belirlenmiştir. Buna ek olarak, karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde 84 genin ifade seviyesi RT²-PCR plaka yöntemiyle araştırılmıştır. Karvakrol ile 48 saat muamele edilen F2408, 5RP7 ve U-2 OS'lar için IC₅₀ değeri sırasıyla 300 µM, 300 µM ve 250 µM olarak belirlenmiştir. Hücrelerde zar tomurcuklanması, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması gibi karakteristik apoptotik morfoloji floresan mikroskop altında gözlenmiştir. Karvakrol ile inkübasyon U-2 OS hücrelerinde apoptoz ve MAPK yolağıyla ilgili 56 genin ifadesinde azalmaya ve 2 genin ifadesinde artışa yol açmıştır. Bu genlerden 13 tanesi ifade seviyesinde 2 kat ve üzeri azalma göstermiştir. Bu genler ERK1/2, JNK, p38 MAPK ve hücre döngüsü yolakları ile ilgili olduğundan hücre ölüm mekanizmasına açıklık getirilmiştir. Kemoterapötik bir ajan olan sisplatin ise aynı hücrelerde 8 genin ifadesinde değişikliğe neden olmuş ve karvakrolden daha az etkili olmuştur. Sonuç olarak karvakrol F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde önemli derecede sitotoksik ve apoptotik etki göstermiştir. Ayrıca bir osteosarkoma hücresi olan U-2 OS'larda ERK1/2, JNK, p38 MAPK ve hücre döngüsü yolaklarının baskılanması, karvakrolün en azından osteosarkoma olmak üzere çeşitli kanserler için güçlü bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Fibroblastlar, osteosarkoma, karvakrol, sitotoksisite, apoptoz, gen ifadesi

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF
CARVACROL ON *ras* TRANSFORMED 5RP7 AND NORMAL F2408
EMBRYONIC FIBROBLAST CELLS AND
U-2 OS OSTEOSARCOMA CELLS IN VITRO****Yıldız BODURLAR****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assoct. Prof. Dr. Hülya SİVAS
2012, 117 Pages**

In this study, the cytotoxic and apoptotic effects of carvacrol, a herbal monoterpene, were investigated on F2408, 5RP7 and U-2 OS cells. The cytotoxic effect was determined by MTT and neutral red uptake and the apoptotic effect was morphologically by AO/EB staining, respectively. In addition, the expression levels of 84 genes after carvacrol treatment of U-2 OS were studied using RT²-PCR array. IC₅₀ values for F2408, 5RP7 and U-2 OS treated with carvacrol for 48 hours were detected as 300 µM, 300 µM and 250 µM, respectively. The characteristics of apoptotic morphology such as membrane blebbing, chromatin condensation and fragmentation were observed under a fluorescence microscope. Incubation of U-2 OS with carvacrol caused a diminution in the expression level of 56 genes and an elevation of two genes related with apoptosis and MAPK pathway. Thirteen genes of them showed two fold or more reduction in the expression levels. Because of these genes are related with ERK1/2, JNK, p38 MAPK signaling pathways, mechanism of cell death was cleared. Cisplatin as a chemotherapeutic agent caused changes in the expression of 8 genes in the same cells and was effective less than carvacrol. In conclusion, carvacrol showed significantly cytotoxic and apoptotic effects on F2408, 5RP7 and U-2 OS cells. Furthermore, inhibition of ERK1/2, JNK, p38 MAPK and cell cycle pathways on an osteosarcoma cell, U-2 OS, indicate that carvacrol might be an efficient therapeutic agent for various cancers at least osteosarcomas.

Keywords: Fibroblasts, osteosarcoma, carvacrol, cytotoxicity, apoptosis, gene expression

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen, başarılı olabilmem için bana her konuda yol gösteren, tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hülya SİVAS'a teşekkür etmeyi borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE'ye çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen, laboratuvar ekip ruhunu paylaştığım değerli arkadaşlarım Handan EMİŞOĞLU, Reyhan VAROL ve Özlem TOMSUK'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirebilmem ve bu çalışmalar ile uluslararası bir kongreye katılabilmem için gerekli maddi desteği sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında sevgi ve ilgilerini hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, çok değerli babam Osman BODURLAR'a, canım annem Nuran BODURLAR'a ve sevgili kardeşim Tolga BODURLAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yıldız BODURLAR

NİSAN-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tıbbi Bitkiler.....	2
1.1.1. Tıbbi bitkilerin biyolojik aktiviteleri	3
1.1.2. Terpenler	5
1.1.3. Karvakrol ve karvakrolün biyolojik özellikleri	6
1.2. Kanser	9
1.2.1. Karsinojenler ve kanser oluşumu	10
1.2.2. Hücre döngüsü ve kanser	12
1.2.3. Onkogenler	15
1.2.4. <i>ras</i> onkogeni ve MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağı	16
1.2.5. Tümör baskılayıcı genler.....	20
1.2.6. Apoptoz: Programlanmış hücre ölümü.....	22
1.2.6.1. Kaspazların apoptozdaki rolü	23
1.2.6.2. Hücre ölümünde gerçekleşen morfolojik değişiklikler.....	24
1.2.6.3. Apoptoz mekanizmaları.....	25
1.2.7. Osteosarkoma	27
1.3. Kemoterapi ve Kemoterapötik Ajanlar	29
1.3.1. Sisplatin	30
1.3.2. 5-FU (5-Florourasil)	32
1.3.3. Karvakrol ve kanser.....	32
1.4. Amaç	33

2. MATERYAL VE YÖNTEM	34
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
2.2. Test Maddelerinin Hazırlanması	34
2.2.1. Karvakrol dozlarının hazırlanması	34
2.2.2. Sisplatin ve 5-FU dozlarının hazırlanması	34
2.3. Yöntem	35
2.3.1. Hücre Kültürü	35
2.3.2. Sitotoksikite deneyleri	35
2.3.2.1. MTT canlılık testi ile mitokondriyal aktivite belirlenmesi	35
2.3.2.2. Nötral kırmızısı (NR) alım testi ile lizozomal aktivite belirlenmesi.	36
2.3.3. Akridin Oranj/Etidyum Bromid (AO/EB) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi	37
2.3.4. U-2 OS hücrelerinde MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesinin RT ² -PCR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) plaka analizi	38
2.3.4.1. RNA izolasyonu	39
2.3.4.2. RNA miktarı ve saflığının belirlenmesi	40
2.3.4.3. Agaroz jel elektroforezi ile RNA kalitesinin belirlenmesi	40
2.3.4.4. RT ² RNA QC (Kalite kontrol) PCR plakası ile RNA saflığı ve kalitesinin kontrolü	41
2.3.4.5. RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (Reverz Transkripsiyon)	43
2.3.4.6. RT ² -PCR MAPK sinyal yolağı plaka analizi	44
2.3.4.7. RT ² -PCR plaka sonuçlarının analizi	46
2.3.5. İstatiksel analiz	47
3. BULGULAR	48
3.1. Karvakrolün Normal (F2408) ve H-ras Transform Sıçan Embriyonik (5RP7) Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	48
3.1.1. Karvakrolün F2408 ve 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	48
3.1.2. F2408 ve 5RP7 hücrelerinde apoptotik morfoloji	50

3.2. Karvakrolün İnsan Osteosarkoma Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi.....	54
3.2.1. Karvakrol, sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	54
3.2.2. U-2 OS hücrelerinde apoptotik morfoloji	56
3.2.3. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağı üzerine etkisinin RT ² -PCR ile analizi.....	62
3.2.3.1. RNA izolasyonu ve kalitesi	62
3.2.3.2. RT ² RNA QC (Kalite kontrol) PCR sonuçları	63
3.2.3.3. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesi üzerine etkisi.....	64
3.2.3.4. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağı ile ilgili genlerin ifadesi üzerine etkisi.....	68
 4. TARTIŞMA	 71
4.1. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerine sitotoksik etkisi	71
4. 2. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerindeki apoptotik etkisi	73
4.3. RT ² -PCR MAPK plaka analizi	77
4.3.1. Karvakrolün U-2 OS hücresi MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesine etkisi.....	77
4.3.1.1. ERK1/2 ve ERK5 yolağı.....	78
4.3.1.2. JNK yolağı	82
4.3.1.3. p38 yolağı	85
4.3.1.4. Hücre döngüsü yolağı	89
4.3.2. Sisplatinin U-2 OS hücresi MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesine etkisi.....	92
4.4. Sonuç.....	93
 KAYNAKLAR	 95

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Karvakrolün kimyasal yapısı.....	7
1.2. Hücre döngüsü fazlarındaki kontrol noktaları ve CDK/siklin komplekslerinin aktivite bölgeleri.....	13
1.3. p21 ^{ras} proteininin aktivasyonu	17
1.4. ERK1/2, JNK, p38 ve ERK5 MAPK yollarının aktivasyonunda görevli MAPK bileşenleri	19
1.5. Kaspazların aktifleşme mekanizması.....	24
1.6. Apoptotik bir hücrede gerçekleşen morfolojik değişiklikler	25
1.7. Apoptozda dış ve iç yolak	27
3.1. Karvakrolün F2408 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT (A) ve NR alım testi (B) ile değerlendirilmesi	49
3.2. Karvakrolün 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT (A) ve NR alım testi (B) ile değerlendirilmesi.	50
3.3. Karvakrolün F2408 hücrelerinin morfolojisine etkisi.....	51
3.4. Karvakrolün 5RP7 hücrelerinin morfolojisine etkisi.	53
3.5. Karvakrolün F2408 (A) ve 5RP7 (B) hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre yüzdesi.....	54
3.6. Karvakrolün U-2 OS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi (A) ve NR alım testi (B) ile değerlendirilmesi.....	55
3.7. Sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT deneyi ile değerlendirilmesi.....	56
3.8. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi.....	57
3.9. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi.....	59
3.10. 5-FU'in U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi.....	60
3.11. Karvakrolün (A) ve sisplatin ile 5-FU'in (B) U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre yüzdesi.	61
3.12. Formaldehit agaroz jel elektroforeziyle elde edilen RNA bandlarının UV transilimatör cihazındaki görüntüsü.	62

3.13. RT ² RNA QC PCR plakasında gerçekleşen reaksiyonların görüntüsü.....	63
3.14. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerine etkisi.....	65
3.15. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerindeki etkisinin RT2-PCR plaka sonuçlarının ısı haritasıyla gösterilmesi.....	67
3.16. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde ifade seviyesi 1,5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi	68
3.17. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerine etkisi.....	69
3.18. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerindeki etkisinin RT ² -PCR plaka sonuçlarının ısı haritasıyla gösterilmesi.....	70
3.19. Sisplatinle muamele edilen U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi	70
4.1. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde ERK1/2 yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması.....	79
4.2. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde JNK yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması	83
4.3. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde p38 yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması	86
4.4. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde hücre döngüsü yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması.....	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. RT ² RNA QC PCR plakasının yerleşim planı.....	42
2.2. RT PCR termal profili.....	43
2.3. İnsan MAPK sinyal yolağı RT ² PCR plakasının yerleşim planı	46
3.1. Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri	65
3.1. (devam) Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri.....	66
3.1. (devam) Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri	67
3.2. Sisplatinle muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri.....	69
4.1. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saat, sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücrelerindeki 24 ve 48 saat için yaklaşık IC ₅₀ değerleri.....	71
4.2. DMSO ve karvakrol ile 48 saat inkübe edilen F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde oluşan apoptotik hücre yüzdesi.....	74
4.3. Sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu hücre yüzdesi	75

1. GİRİŞ

Binlerce yıldır bitkilerden tedavi amaçlı faydalanılmaktadır ve özel bitki formları ve bunların kullanılma metodları nesilden nesile sözlü tarih yoluyla aktarılmıştır. Yakın tarihte tıbbi bitkilerin tedavi amaçlı kullanılmasına 19. yüzyılın başlarında aktif bileşen olarak opiumdan morfinin izolasyonu başlanılmıştır. Tıbbi bitkilerden, kokain, kodein, digitoksin ve kinin gibi günümüzde bazıları halen kullanılmakta olan ilk ilaçlar keşfedilmiş ve farmakolojik aktif moleküllerin izolasyon ve karakterizasyonu günümüzde halen önemle devam etmektedir. Tıbbi bitkilerden ilaç keşfi kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Yarım yüzyıldan fazladır bitki ikincil metabolit ve türevlerinin klinik uygulamaları kanserle mücadelede kullanılmaktadır (Balunas ve Kinghorn 2005). Bitkilerden elde edilen günümüzde klinik olarak kullanılan antikanser ajanları vinka alkaloidleri, epipodofillotoksinler, taksanlar ve kamptotesinler olmak üzere 4 sınıfa ayrılabilir. Metafaz tutuklanmasıyla mitozu baskılayan vinka alkaloidleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, metastatik meme ve yumurtalık kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA topoizomera II baskılayarak etki gösteren epipodofillotoksinlerden olan etoposid, eşey hücre maligniteleri, akciğer kanseri, non-hodgkin lenfoma, lösemi, kaposi sarkomu, nöroblastoma gibi çeşitli malignitelerin tedavisinde uygulanmaktadır. Antimikrotübül ajanı olan paklitaksel gibi taksanlar, meme, yumurtalık ve akciğer kanserlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA topoizomera I baskılayıcısı olan irinotesan, topotesan gibi kamptotesinlerin kolorektal, ovaryum, meme, serviks kanserleri ve hematolojik malignitelerde klinik aktivitesi bulunmaktadır (Hande 1998; Takimoto ve ark. 1998; Erdemoğlu ve Şener 2000; Kruczynski ve Hill 2001; Ishii ve ark. 2004; Wildiers ve Paridaens 2004; Balunas ve Kinghorn 2005).

Kanser günümüzde genetik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Tümörögenezin çok basamaklı genetik değişimleri içeren bir süreç olduğu bildirilmektedir. Bu genetik değişimler genellikle onkogen ve tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılan genlerdeki mutasyonlar veya anormal gen regülasyonlarını içine almaktadır (Diamandis 1997; Hanahan ve Weinberg 2000). Kanser, dokulara zarar vererek ve yaşamsal organ fonksiyonlarını bozarak ölüme

yol açan bir hastalıktır. Günümüzde kanser, öldürücü hastalıklar arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelerek, ikinci sırada bulunan önemli bir toplumsal problemdir (Yılmaz ve Altunok 2011). Dünya çapında yüz milyonlarca insanı etkilemekte ve her yıl 8 milyon insanın ölümüne neden olmaktadır (Lammers 2010). Bu ciddi sağlık sorununa çözüm bulunması birçok araştırmacının öncelikli hedefi konumundadır. Halen kesin çözüm bulmak bir yana, hastalığın seyrini düzeltmek, yaşam süresini uzatmak ve hayat kalitesini biraz olsun geliştirmek bile önem arz etmektedir (Topal ve ark. 2009). Son günlerde modern kanser tedavisinin temel yöntemlerinden birisi de kemoterapidir. Pek çok kemoterapötik ajanın kısa ve uzun dönemli olmak üzere farklı ve önemli yan etkileri bulunmaktadır. Bu sebeple bazı kanser tiplerin engellenmesi ve tedavisi için yapılan temel araştırmalar toksik olmayan bitki bileşenlerine odaklanmıştır (Yin ve ark. 2011).

Bu çalışmada *Labiata* familyasının birçok türünün uçucuğu yağında aktif bileşen olarak bulunan karvakrolün sitotoksik ve apoptotik etkilerinin H-*ras* ile transfekte olan sıçan embriyonal fibroblast (5RP7), normal embriyonal fibroblast hücreleri (F2408) ve insan osteosarkoma hücreleri (U-2 OS) üzerinde araştırılması ve elde edilen sonuçların fibroblast ve osteosarkoma hücreleri arasında karşılaştırılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Tıbbi Bitkiler

Fitoterapi, tıbbi bitkilerle tedavi anlamına gelen bir terimdir ve ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır. Mezopotamya Uygarlığı döneminde yaklaşık 250, Grek'ler döneminde 600, Arap-Fars Uygarlığı döneminde 4.000, 19. yüzyılın başlarında 13.000 civarında bitki droğu kullanıldığı bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısının 20.000 civarında olduğunu bildirmiştir. Dünya nüfusunun %80'i, Afrika nüfusunun ise %95'i tıbbi bitkilere dayalı tedavi yöntemlerinden yararlanmakta ve gelişmiş ülkelerde reçeteli ilaçların %25'inin etken maddesinin bitkisel kökenli olduğu bilinmektedir (Toroğlu ve çenet 2006; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

1930'lu ve 1940'lı yıllarda organik kimyasalların sentezinin yapılmasıyla, ilaç sanayinde sentetik ve yarı sentetik ilaçların üretimi artmıştır ve dolayısıyla bitkisel ürünlerin bu sektörde kullanımı azalmıştır. Ancak daha sonraki yıllarda halkın sağlık alanında daha çok bilgilendirilmesi, sentetik ilaçların sebep olduğu ciddi yan etkiler bitkilerle tedaviyi yeniden önemli bir konuma getirmiştir (Özbek 2005; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011). Tıbbi bitkilerin, hastaya doğal bileşen kompleksi sağlaması, sentetik ilaçlara kıyasla daha düzgün etkiye sahip olması ve hasta tarafından daha iyi tolere edilebilmesi gibi avantajları vardır (Lovkova ve ark. 2001). Fitoterapinin, dünya çapında genel olarak yaygın kullanılması yanı sıra, özellikle kronik hastalığı olan ya da genel sağlığı bozuk, yüksek eğitim seviyeli ve yüksek gelirli orta yaşlı, yaşlı kadınlar ve depresyon hastalığı olan kadınlar arasında daha yaygın kullanıldığı yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Trabace ve ark. 2011). Tıbbi bitkilerin ve onlardan elde edilen doğal ürünlerin, kardiyovasküler, deri, solunum, gastrointestinal, nöromusküler, mental sağlık sorunlarının, kadın hastalıklarının ve hatta malignite gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Lovkova ve ark. 2001; Lampronti 2006; Mehdi ve ark. 2011). Ayrıca tıbbi bitkiler tansiyon düşürücü, antikolesteraz, analjezik, antiülser, spazmolitik ilaç olarak da kullanılmaktadırlar (Lovkova ve ark. 2001).

Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitki sayısının 500 civarında olduğu tahmin edilmekte ve yaklaşık 200 tıbbi ve aromatik bitkinin ihraç potansiyelinin olduğu belirtilmektedir. Türkiye'nin ihracatını yaptığı tıbbi bitkilerden en önemlileri kekik, defne yaprağı, kimyon, anason, rezene tohumu, ardıç kabuğu, mahlep, çemen, biberiye, meyan kökü, nane, sumak, adaçayı ve ihlamur çiçeğidir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

1.1.1. Tıbbi bitkilerin biyolojik aktiviteleri

Bitkilerin ve uçucu yağlarının içerdikleri bileşimlerin farklı olması, bitkilerin biyolojik aktivitelerinin de farklı olmasına neden olmaktadır. Tıbbi bitkiler, etken maddelerine göre karminatif (sindirim yardımcısı), koloretik (safra arttırıcı), diüretik (idrar söktürücü), antispazmodik (spazm çözücü), antimikrobiyal, uyarıcı ve sedatif (sakinleştirici) gibi farmakolojik özellikler

göstermektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011; Lovkova ve ark. 2011). Pek çok tıbbi bitkinin sahip olduğu farklı biyolojik aktiviteleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bunkova ve arkadaşları (2005) yaptıkları bir çalışmada yeşil çay ekstraktının %60'dan fazla, biber, havuç ve ıspanak ekstraktlarının ise %40-60 oranında antimutajenik etkiye sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca yeşil çayın antioksidan özelliğinin ve kolon, mide, özefagus ve akciğer kanseri gibi pek çok kanser türüne karşı koruyucu etkisinin olduğu da bildirilmiştir (Sung ve ark. 2000; Chen 2008; Fisunoğlu ve Besler 2008). Safran bitkisinin sitotoksik, antitümör, kemopreventif, antimutajenik ve bağışıklık uyarıcı özellikleri olduğu rapor edilmiştir (Fernandez 2006). Silici ve arkadaşları (2010) yaptıkları bir çalışmada, ormangülü ballarının antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Zencefilin, kanser koruyucu, antiinflamatuvar, antianaljezik, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri bildirilmiştir (Shukla ve Singh 2007; Stoilova ve ark. 2007; Ali ve ark. 2008). Adaçayı türlerinden olan *Salvia officinalis* L., *Salvia triloba* L., fesleğen ve nane uçucu yağlarının antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Delamare ve ark. 2007; Karagözlü 2011). Karanfil, biberiye, kekik (*Thymus vulgaris*), karabiber ve zerdeçal bitkilerinin antioksidan özellikte olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Çoban ve ark. 2010).

Tıbbi bitkilerin antitümör aktivitelerini de araştırmak amacıyla yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Tayland bitkilerinden olan *G. mangostana* (perikarp), *P. amarus*, (tamamı), *H. indicum* (tamamı), *P. foetida* (tamamı), *S. venosa* (soğan kısmı), *A. elliptica* (meyvesi), *T. laurifolia* (yaprağı), *M. citrifolia* (meyvesi), *A. marmelos* (meyvesi) bitkilerinden elde edilen uçucu yağların, insan meme kanser hücre hattı SKBR3 üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Moongkarndi ve ark. 2004). İçlerinde fesleğen, limon, karabiber, lavanta, ceviz gibi bitkilerin bulunduğu 17 tane Tayland bitki türünden elde edilen uçucu yağın, insan ağız epidermal kanser hücre hattı KB ve mürin lösemi hücre hattı P388 üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir (Manosroi ve ark. 2006). Başka bir çalışmada, *S. perfoliata*, *S. thymbra*, *S. officinalis*, *L. nobilis* ve *P. palestina* uçucu yağlarının ve bazı bileşenlerinin amelanotik melanoma hücre hattı C32, insan renal hücreli adenokarsinoma hattı LNCaP ve meme kanser hücre

hattı MCF-7 üzerinde sitotoksik etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Katsman ve ark. 2007). Mousavi ve arkadaşları (2009) safran bitkisinin de MCF-7 üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisinin olduğunu ileri sürmüşlerdir.

1.1.2. Terpenler

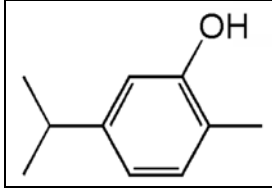
Bitkiler, geniş fonksiyonları olan birincil ve ikincil metabolitleri üretmektedirler. Hücresel süreçler için gerekli olan aminoasitler, basit şekerler, nükleik asitler ve lipidler birincil metabolitlerdir. İkincil metabolitler ise strese yanıtta üretilen çeşitli bileşenlerdir. Bitki ikincil metabolitleri terpen ve terpenoidler (yaklaşık 25.000 çeşit), alkaloidler (yaklaşık 12.000 çeşit) ve fenolik bileşikler (yaklaşık 8.000 çeşit) olmak üzere 3 geniş kategoriye ayrılmaktadır (Zwenger ve Basu 2008).

İzoprenler de denilen terpenler yapısal ve fonksiyonel olarak farklı sınıflar oluşturan doğal ürünlerdir (Zwenger ve Basu 2008; Başer 2008; Goto ve ark. 2010). 5-karbonlu izopren ünitelerinin kombinasyonlarından meydana gelmektedirler (Bakkali 2008; Salmien ve ark. 2008). İzopentil difosfat (IPP) ve izomeri olan dimetilalil difosfattan (DMAPP) sentezlenmektedirler. Terpenlerin biyosentezi bazı aşamalarla gerçekleşmektedir. Bu aşamalar; izopentil difosfat (IPP) öncüsünün sentezi, terpenlerin farklı sınıflarının prenildifosfat öncüsü formlarına IPP'ın tekrarlı eklenmesi, terpene özgü sentezler tarafından allelik prenildifosfatın terpen iskelet formlarına modifikasyonu ve son olarak terpenlere farklı fonksiyon yüklemek için, iskeletin ikincil enzimatik modifikasyonudur. Ana terpenler, monoterpenler (C_{10}) ve sesquiterpenlerdir (C_{15}). Ayrıca hemiterpenler (C_5), diterpenler (C_{20}), triterpenler (C_{30}) ve tetraterpenler (C_{40}) de bulunmaktadır. Oksijen içeren terpenler terpenoid olarak adlandırılmaktadır (Bakkali 2008). Terpenoidler bitkilerde hormon (giberelin, absisik asit), fotosentetik pigment (fitol, karotenoid), elektron taşıyıcı (ubikinon, plastokinon) ve zar bileşeni (fitosterol) olarak çeşitli fonksiyonel rollere sahiptir. Pek çok özgü terpenoidin bu fizyolojik, metabolik ve işlevsel fonksiyonları, polinatör ve tohum dağıtıcılar için cezbedici olma gibi çeşitli iletişim ve savunma görevlerini görmektedir (McGarvey ve Croteau 1995).

Monoterpenler, iki izopiren ünitesinin bağlanmasıyla oluşmaktadır ve genel formülleri $C_{10}H_{16}$ 'dır. Asiklik, monosiklik veya bisiklik yapıda olabilirler. Doğada pek çok monoterpen uçucudur ve monoterpenlerin pek çoğu terpenlerden oksidasyon, metilasyon ve glikozilasyonla modifiye edilerek türevlenebilmektedirler (Salmien ve ark. 2008). Doğal ürünlerde 1000'den fazla monoterpen tanımlanmıştır. Besinsel bileşen olan monoterpenler, turunçgil meyvelerinin, vişne, nane ve çeşitli tıbbi bitkilerin uçucu yağlarında bulunmaktadır (Crowell 1999; Zeytinoğlu ve ark. 2003). Konifer rezineleri, zengin terpen ve monoterpen kaynağıdır (Salmien ve ark. 2008). Bu 10 karbonlu izoprenoidler, bitkilerde mevalonatin yolağıyla elde edilirken memeli, mantar ve diğer canlı türleri tarafından üretilmemektedirler (Crowell 1999). Monoterpenlerden bazılarının antitümör aktiviteye sahip olduğu ve olan kötü huylu tümörlerin gerilemesini de sağladıkları bilinmektedir. Örneğin limonenin kemirgenlerde spontan neoplazma gelişimini, kimyasal olarak uyarılmış meme, deri, karaciğer, akciğer ve mide kanserlerini ve *ras* onkogen uyarımlı meme kanseri gelişimini engellediği gösterilmiştir (Crowell 1999). Kimyon tohum yağının başlıca monoterpeni olan karvon, karsinojenden önce uygulandığında kimyasal uyarımlı akciğer ve mide kanserlerinin gelişimini önlemektedir. Karveol ve mentol, sıçanlarda DMBA-uyarımlı meme kanserine karşı kemopreventif aktiviteye sahiptir. Asiklik monoterpen olan geraniol, tümör hücre transplantasyonundan önce ve sonra uygulandığında mürin lösemi, hepatoma ve melonoma hücrelerine karşı antitümör aktivite göstermektedir. Peril alkol ise kemirgen meme ve pankreas tümörlerine karşı kemoterapötik aktiviteye sahiptir (Crowell 1999).

1.1.3. Karvakrol ve karvakrolün biyolojik özellikleri

Karvakrol (5-izopropil-2-metilfenol), *Labiata* familyasının *Origanum*, *Satureja*, *Tymbra*, *Thymus* ve *Corydorthymus* türlerinin pek çoğunun uçucu yağında bulunan predominant monoterpenik bir fenoldür (Şekil 1.1). Karvakrol γ -terpinenden p-simen aracılığıyla sentezlenmektedir. Genel olarak güvenli bir gıda katkı maddesi olarak tanımlanan karvakrol, yiyeceklerde, tatlılarda, içeceklerde ve sakızda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Başer 2008; Mehdi ve ark. 2011).



Şekil 1.1. Karvakrolün kimyasal yapısı

Karvakrolün, pek çok farmalojik özelliği bilinmektedir. Bunlardan bazıları antimikrobiyal (Ultee ve Smid 2001; Rajkovic ve ark. 2005; Liolios ve ark. 2009), genotoksik (İpek ve ark. 2003), antiplatelet (Karkabounas ve ark. 2006), analjezik (Aydın ve Öztürk 1996), antiinflamatuvar (Landa ve ark. 2009), antioksidan (Puertas-Mejía ve ark. 2002; Safaei-Ghomi ve ark. 2009; Ündeğer ve ark. 2009), antielastaz (Kacem ve Meraihi 2006) ve insektisidal (Kordali ve ark. 2008) aktiviteleridir. Karvakrolün antimutajik etkileri de bazı çalışmalarla araştırılmıştır. UVB uyarımlı lipid peroksidasyonuna, oksidatif strese ve DNA hasarına karşı önemli derece koruma sağladığı bildirilmiştir ve karvakrol insan lenfositlerinde H_2O_2 indüklü oksidatif DNA hasarına karşı güçlü koruyucu etki gösterirken, yüksek dozlarda DNA hasarına neden olmuştur. Düşük dozlarda ise aynı hücrelerde IQ ve MMC indüklü DNA hasarına karşı koruyucu etki göstermiştir (Aydın ve ark. 2005a ve 2005b; Aristatile ve ark. 2010). İpek ve arkadaşları (2005) karvakrolün önemli derecede antimutajenik olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Karvakrolün etki mekanizmaları üzerine çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ultee ve arkadaşları (1998) zar akışkanlığı artmasıyla zarda çözünen karvakrol miktarının arttığını ve bunu sonucunda zarda oluşan hasarın da arttığını gözlemlemişlerdir. Bundan dolayı karvakrolün bakterisidal etki göstermesinde zar akışkanlığının önemli bir faktör olduğu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise karvakrol ile muamele edilen bakterilerin hücre yüzeyleri üç boyutlu olarak görüntülenerek morfolojileri incelenmişlerdir. Bu incelemeler sonucunda karvakrolün bakteri hücre yüzeyinde morfolojik değişikliklere sebep olduğunu ve gram negatif bakteri hücre morfolojisini, gram pozitiflere göre daha çok etkilediğini ortaya koymuşlardır (La Storia ve ark. 2011). Arfa ve arkadaşları (2006) karvakrolün kimyasal yapısıyla antimikrobiyal etkisi arasındaki ilişkisini araştırmışlardır. Buna göre karvakrol, hidrofobik özelliği sayesinde bakteri hücre

zarında birikmektedir ve antimikrobiyal aktivite göstermesinde serbest hidroksil fonksiyonu önemlidir. Karvakrolün iskelet kaslarında sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz'ı baskıladığı ve ryanodin reseptörlerini aktive ettiği ve köpek ve insan ventrikular kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} akımının bloke edilmesini uyardığı bildirilmiştir (Magyar ve ark. 2004; Sárközi ve ark. 2007). Karvakrolün karaciğer koruyucu etkisinin olduğu ve karaciğer yenilenme oranını arttırdığını ileri sürülmüştür (Uyanoğlu ve ark. 2008). Aydın ve arkadaşları (2007) karvakrolün normal tansiyona sahip sıçanlarda düşük tansiyon oluşturduğunu ve N (omega)-nitro-L-arjinin metil ester uyarımlı hipertansiyonu baskıladığını öne sürmüşlerdir. Karvakrolün sıçan atriumunda elektriksel uyarıyla oluşturulan kasılmaları baskıladığı ve bu nedenle kardiyoprotektif bir madde olabileceği bildirilmiştir (Arkan ve Aydın 2008). Başka bir çalışmada karvakrolün dişi sıçanlarda proestrus safhası boyunca plazma estradiol seviyesini önemli derecede azalttığı, östrojen seviyesine bağlı FST (zorunlu yüzdürme testi) sistemini etkilediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar ışığında karvakrolün dişi sıçanlar üzerinde prodepresif özellikleri olabileceğini öne sürülmüştür (Trabace ve ark. 2011). Sıçanlarla yapılan bir diğer çalışmada elde edilen histolojik ve biyokimyasal bulgulara göre karvakrolün iskemi ve reperfüzyon hasarlarına karşı karaciğeri koruduğu ve uygulanan dozlarda karvakrolün hepatotoksik olmadığı rapor edilmiştir (Canbek ve ark. 2008). Karvakrolün Drosophila TRPL (geçici reseptör potansiyel benzeri kanal) ve memeli TRPM7 (geçici reseptör katyon kanalı mukolipin alt ailesinin 7. üyesi) kanallarının baskılayıcısı olduğu bildirilmiştir (Parnas ve ark. 2009).

Gen düzeyinde karvakrol ile yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bunlardan biri Lee ve arkadaşlarının (2008) karvakrolün kollejen ifadesi uyarımı yoluyla, deri yaşlanmasını iyileştirdiğini öne sürdükleri bir çalışmadır. Bu çalışmaya göre karvakrol, AP-1 promotörünün aktivasyonunu ve JNK ile ERK1/2 fosforilasyonunu uyarmaktadır. Bunun yanında Ca^{2+} mobilizasyonunu ve PLC γ 1 fosforilasyonunu da uyarmaktadır. Bu bilgilere dayanarak karvakrolün PLC γ 1 yoluyla hücre içi kalsiyum mobilizasyonun aktivasyonu ve kollejen sentezini uyardığı ileri sürülmüştür. Karvakrol ile beslenen tavukların intestinal intraepitel lenfositlerinin gen ifadelerindeki değişimler mikroarray analizi ile incelenmiştir. Buna göre karvakrolün karbonhidrat, yağ, protein, fosfat ve nükleik

asit metabolizmaları gibi çeşitli metabolizmalarla ilgili 74 genin (ifadesi artan 26 gen, ifadesi azalan 48 gen) ifadesinde değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2010). Rao ve arkadaşları (2010) karvakrolün, *S. cerevisiae*'nin gen ifadelerinde değişikliğe sebep olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmaya göre karvakrol, enerji rezerv metabolizması, oksidatif strese yanıt ve otofaji gibi hücrel olaylarla ilgili genleri uyarmakta ve RNA sentez, RNA modifikasyonu, ribozom biyogenezi ve nükleik asit metabolizmasıyla ilgi genleri baskılamaktadır. Bir diğer çalışmada ise karvakrolün insan makrofaj benzeri U937 hücrelerinde, COX-2'yi baskıladığını ve PRAR α ve γ 'yı aktive ettiğini bildirmişlerdir (Hotta ve ark. 2011). Cho ve arkadaşları (2012) karvakrolün yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde adipogenez ve inflamasyonla ilgili genlerin ifadesini düzenleyerek obeziteyi engellediğini öne sürmüşlerdir. Karaciğer kanser hücre hattı HepG2'lerle yapılan bir çalışmada, karvakrolün ERK1/2 MAPK'ın fosforilasyonunu azalttığı, p38 MAPK'ın fosforilasyonunu aktive ettiği ve bundan dolayı MAPK sinyal yolağının karvakrol uyarımlı antiproliferasyon ve apoptoza dahil olduğu ileri sürülmüştür (Yin ve ark. 2011).

1.2. Kanser

Kanser, aşırı hücre büyümesiyle karakterize edilen birçok farklı hastalığı tanımlamada kullanılan bir terimdir. Normal hücreler durgun safhadan aktif çoğalma fazına geçebilmek için mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duymaktadır. Dolayısıyla büyüme sinyallerinin yokluğunda çoğalabilen normal bir hücre yoktur. Kanser olgularında ise pek çok onkogen çeşitli sinyal yollarlarında normal büyüme sinyali gibi etki etmektedir. Böylelikle kanser hücreleri kendi büyüme sinyalini oluşturabilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanser olgularında hücreler bu denli hızlı çoğalırken aynı oranda hücre kaybı olmaması sonucunda hücreler birikmeye başlamaktadır. Ortaya çıkan bu anormal durum, hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Bu biriken kütlelere **kanser** veya **tümör** adı verilmektedir (Yılmaz ve Altunok 2011).

Tümör iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere 2 çeşittir. İyi huylu tümörde, hücrelerin büyüme kontrolünde azalma olur ve bu hücrelerin vücudun diğer bölümlerine yayılma kabiliyetleri yoktur. Kapsül oluştur ve canlının yaşamı için çok tehlike oluşturmazlar. Sinir sistemi, damarlar ve kanallara basınç yaparak hastalık belirtileri oluştururlar. Ancak iyi huylu tümör zamanla kötü huylu bir tümöre dönüşebilir ya da kendiliğinden gerileme gösterebilir. Kötü huylu tümörler ise kapsül oluşturmazlar ancak başka dokulara yayılmak için dolaşım sistemine katılır ve gittiği dokularda kansere neden olurlar (metastaz) (Dilsiz 2004; Yılmaz ve Altunok 2011). Kanser, kalıtsal veya kazanılmış genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda meydana gelmektedir. Bu değişiklikler sonucu meydana gelen kanserli hücreler;

1. Kendi kendine yeterli olan büyüme sinyalleri üretme,
2. Büyüme karşıtı sinyallere duyarsız olma,
3. Apoptozdan kaçma,
4. Sınırsız replikasyon potansiyeline sahip olma,
5. Anjiogenezi uyarma ve
6. İnvazyon ve metastazı uyarma gibi çeşitli özellikler geliştirmektedir (Lammers 2010).

1.2.1. Karsinojenler ve kanser oluşumu

Kanser yanlış diyet, çevresel ajanlar ve genetik yatkınlık nedeniyle oluşabilmektedir. Dünya çapında tüm kanserlerin %35'i yanlış diyet sebebiyle ortaya çıkmaktayken, diyete sigara ve alkolün de eklenmesiyle bu oran %60'a kadar çıkabilmektedir. Yanlış diyet kolon kanseri vakalarının %80'inden sorumlu olduğu bilinmektedir. Diyetle aflatoksinler, nitrozaminler, bozulmuş katı ve sıvı yağlar, alkol, katkı ve koruyucu maddeler gibi ajanların bulunması karsinogenezin başlamasını tetiklemektedir. Yanlış diyete, çevre kirliliği, sigara içme, UV radyasyonu, serbest radikaller, egzersiz eksikliği ve stresin de eklenmesi DNA hasarı ve kanser gelişimi için bir aşama oluşturmaktadır (Reddy ve ark. 2003).

Karsinojenler 3 farklı sınıfa ayrılabilir;

1. Genotoksik karsinojenler: Oldukça reaktif elektrofillerdir (elektronu eksik atoma sahiptirler) ve hedef hücrede RNA, protein ve özellikle DNA'nın

elektronca zengin atomlarıyla direkt reaksiyona girerek kansere yol açan ajanlardır. Dimetil sülfat, etilen imin ve β -propiollaktonel gibi maddeler genotoksik karsinojenlerdir.

2. Prokarsinojenler: İndirekt olarak çeşitli moleküllerle reaksiyona giren ajanlardır. Metabolik dönüşümden sonra aktifleşirler ve nihai karsinojen adını alır. Dimetiltirozamin, kadmiyum ve plütonyum bu gruba dahil edilirler.

3. Epigenetik karsinojenler: Genetik materyalle etkileşmeyen, oluşturdıkları biyolojik etkilerle kanser oluşuma neden olan maddelerdir. Moleküler çeşitlilikleri metalden kompleks organik kimyasallara kadar değişebilen bileşenlerdir. Bu bileşenler arasında forbol esterleri, sakarin, asbestos, plastik, östrojenler, pürin analogları ve katekol bulunmaktadır (Hayashi 1992; Klein ve Costa 1997; Reddy ve ark. 2003; Kumar ve ark. 2003; Dilsiz 2004; Ilgın ve Ergun 2010)

Genetik faktörlere bağlı olarak bazı ailelerde kanser gelişme riski daha yüksektir. Sporadik olarak görülen kolon, meme, yumurtalık ve beyin kanseri gibi kanser tiplerinin ailevi şekilleri bildirilmiştir. Erken yaşta başlayan bulgular, iki veya daha fazla yakın akrabada aynı kanser tipinin bulunması ve bazen çoklu veya bilateral tümörlerin görülmesi ailevi kanserleri karakterize etmektedir. Genetik yatkınlık tek başına tüm kanserlerin %20'sine katkıda bulunmaktadır (Reddy ve ark. 2003; Kumar ve ark. 2003; Ilgın ve Ergun 2010).

Kanserler genellikle aşamalı olarak, yavaş gelişen iyi huylu tümör lezyonlardan milimetre boyutlu vaskülarize olmayan nodüllere, vaskülarize *in situ* tümörlere ve sonra hızlı gelişen birincil tümörlere dönüşmektedir. Daha sonra tümörler komşu dokulara sızmakta ve çeşitli organlarda metastatik lezyonlar gelişmektedir (Lammers 2010). Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesinin bazı süreçler ile gerçekleştiği bilinmektedir. Karsinogenez, başlama, gelişme ve ilerleme süreçlerini kapsamaktadır. Başlangıç aşaması hücrelerin karsinojenlere maruz kaldığı ve kanserli hücrenin olduğu karsinogenezin ilk basamağıdır. Karsinojenler ile DNA arasındaki reaksiyon bu aşamada gerçekleşmektedir. İkinci aşama olan gelişme aşamasında kanserli hücreler çoğalmakta ve klinik ve patolojik olarak tayin edilebilen neoplazmaların oluşumu gerçekleşmektedir. Üçüncü ve son aşama, kanserin ilerlemesi ve

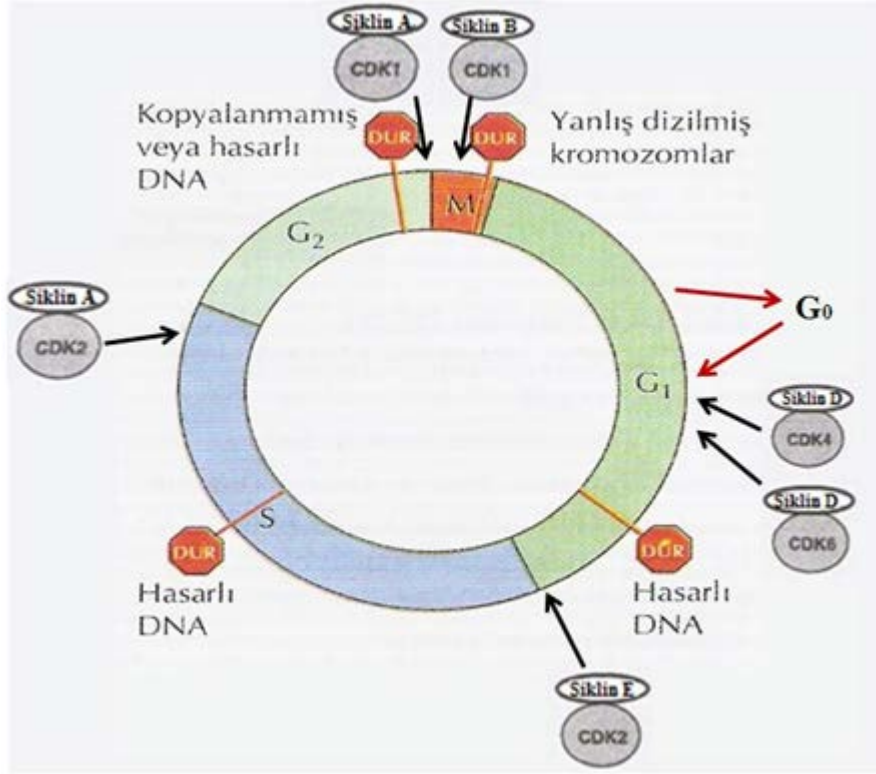
yayılmasını kapsamaktadır. Oluşan tümörün hastaya giderek artan bir şekilde zarar vermeye başladığı aşamadır. Bu aşamada tümör bulunduğu organın tamamına yayılmakta ve diğer organlara metastaz yapmaktadır (Reddy ve ark. 2003; Ilgın ve Ergun 2010).

1.2.2. Hücre döngüsü ve kanser

Hücre, büyüme sinyali almadığı sürece G1 S, G2 ve M fazlarını içeren hücre döngüsüne geçmez ve dinlenme fazı olan G0'da bekleme halinde kalır. Büyüme sinyali alındıktan sonra döngüye girer ve tamamlar. Hücre G1 fazında bölünme, farklılaşma ya da ölüm için karar verir ve bazı genlerde değişiklik başlar. Bu fazda hücre sinyalleri alır ve DNA sentezi için hazırlık yapılır. S fazında DNA sentezlenir. G2 fazında hücre büyümeye devam eder ve mitoz hazırlık yapılır. M fazında hücre sırasıyla profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez aşamalarından geçerek ikiye bölünür (Engin ve Özyardımcı 2001; Cabadak 2008).

Döngünün geçişinin düzgün olmasının sağlanması amacıyla G1-S geçişinde, S fazında, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır (Şekil 1.2). Hücrenin döngüye devam edip etmeyeceği kararı bu kontrol noktalarında verilir. G1 fazında bulunan kısıtlayıcı nokta (R noktası) oldukça önemli olup, burada hücrenin S fazına geçip geçmeyeceğinin kararı verilir ve geri dönüşü yoktur. Hücre DNA'sında herhangi bir hata saptanırsa hücre ya hatayı onarır ya da apoptoza giderek ölür. S fazı kontrol noktası DNA replikasyonu esnasında yanlış baz eşleşmesi ya da eksik DNA replikasyonu gibi oluşabilecek hataları bulma ve tamir etme şeklinde kalite kontrol görevi üstlenir. G2 fazında, tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA kontrol edilir. Hücre döngüsü inhibitörleri, hücreyi yeni oluşacak hücrenin doğru genetik kopyaya sahip olacağından emin olana kadar durdururlar. Ancak herşey başarıyla düzenlendikten sonra mitoz geçiş olur. Metafaz-anafaz geçişinde bulunan kontrol noktasında ise hatalı dizilime sahip olan kromozomlar belirlenir. Eğer hatalı bir dizilim varsa mitoz fazının metafazında döngü, kromozomların tam bir takımının yavru hücrelere dağılımı

düzenleninceye kadar durdurulur (Engin ve Özyardımcı 2001; Vermeulen ve ark. 2003; Cooper ve Hausman 2006; Cabadak 2008).



Şekil 1.2. Hücre döngüsü fazlarındaki kontrol noktaları ve CDK/siklin komplekslerinin aktivite bölgeleri (Vermeulen ve ark. 2003; Coopper ve Hausman 2006’den değiştirilmiştir)

Hücre döngüsü, bu kontrol noktalarında döngüye özgü proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) tarafından kontrol edilir. Aktif CDK/siklin kompleksleri hücre döngüsünün bir sonraki aşamaya geçmesini kontrol eder. CDI’ler ise ya CDK’lara ya da CDK-siklin kompleksine bağlanarak CDK’ların aktivitelerini engellerler (Engin ve Özyardımcı 2001; Vermeulen ve ark. 2003; Dilsiz 2004; Cabadak 2008).

Memeli hücrelerinde, hücre döngüsü kontrolünde 11 tane siklin bağımlı kinaz (cdk1-11), ve 16 siklin (siklin D; D₁, D₂ ve D₃, siklin E; E₁, E₂, siklin A; A₁, A₂ ve B; B₁, B₂) rol oynamaktadır. Siklin D ve E, G₁/S fazlarının sınırında sentezlenirler ve hücre S fazına geçince hızla yıkılırlar, Siklin A ve B, S/G₂/M faz

geçişlerinde sentezlenir. Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı safhalarında değişiklik gösterir; siklin E en yüksek seviyeye G1 fazının geç döneminde, siklin A ve B, G2 ve M fazlarında çıkar. Siklin D ise G1 fazının erken döneminde artmaya başlar ve fazın sonuna doğru gittikçe artar (Şekil 1.2). Bu şekilde siklinlerin periyodik olarak bir yandan sentezi yapılırken bir yandan da ubiquitin yolağıyla yıkımları gerçekleştirilir. Böylece hücre döngüsünün kontrolü sağlanmış olur (Engin ve Özyardımcı 2001; Vermeulen ve ark. 2003; Cabadak 2008).

Normal hücrelerin büyüüp bölünmesi, bağlantı kurması ve farklılaşması pek çok farklı genin programlı ifade edilmesi sayesinde olmaktadır (Diamandis 1997). Kanserde hücre bölünmesinin genetik kontrolünde bazı temel değişimler gerçekleşir. Siklin, CKI, CDK substratları ve kontrol noktası proteinleri gibi hücre döngüsü proteinlerini kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar hücrenin kontrolsüz çoğalmasına ve kansere neden olmaktadır (Vermeulen ve ark. 2003; Reddy ve ark. 2003; Cabadak 2008).

Tümör baskılayıcı genler hücre döngüsü ilerleyişini frenlemek şeklinde görev yapan genlerdir ve bunlarda oluşacak mutasyonlarda, hasarlı hücrelerin hücre döngüsüne devam etmesine ve sonuçta tümör oluşumuna neden olmaktadır (Cooper ve Hausman 2006; Cabadak 2008). Tümör baskılayıcı bir gen olan *Rb*, hücre döngüsünün ilerlemesini ve DNA sentezini sağlayan genlerin transkripsiyonunu baskılayarak, hücre döngüsünü G1 kontrol noktasında durdurur. Normal hücrelerde kontrol noktasından geçiş, pRb'yi fosforilleyerek inaktive eden CDK4/Siklin D kompleksi ile düzenlenmektedir. Bu sebeple tümörlerde, *Rb*'nin mutasyon ile inaktifleşmesi, onun hücre döngüsünün temel negatif düzenleyicisi rolünü ortadan kaldırır. Bir CDK inhibitörü olan p16'yı kodlayan *INK4* tümör baskılayıcı geni de aynı kontrol noktasından geçişi düzenlemektedir. *INK4*'ün inaktivasyonu Cdk4,6/Siklin D kompleksinin aktivitesinde artışa ve bu da pRb'nin kontrolsüz fosforilizasyonuna neden olmaktadır.

Tümör baskılayıcı *p53* geninin ürünü de hücre döngüsünün ilerlemesini düzenler. DNA hasarı ile *p53* sentezi uyarılır ve *p53* CDK inhibitörü p21'in transkripsiyonunu hızlandırır. p21, CDK/siklin kompleksine ve PCNA'e (çoğalan

hücre nükleer antijeni) bağlanarak DNA replikasyonunu engeller ve hücre döngüsünü durdurur. Mutasyon sonucu işlevini yitiren *p53*, hasarlı DNA'ya yanıt olarak G1'de duraksamayı engeller ve hasarlı DNA replike olarak tamir edilmeden yavru hücreye geçer. Hasarlı DNA'nın kalıtımı mutasyon sıklığının artmasına ve genomda genel bir kararsızlığa neden olur. Bu sebeple hücre kansere yatkın hale gelir. Meme ve yumurtalık kanserlerinden sorumlu olan *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genleri de hücre döngüsünün kontrolüyle ilişkilidirler (Cooper ve Hausman 2006).

1.2.3. Onkogenler

Kansere neden olan genomdaki değişimler arasındaki en önemli değişimler onkogenlerdeki mutasyonlardır (Hanahan ve Weinberg 2000). Tümör baskılayıcı genlerin aksine **onkogenler** direkt ya da dolaylı olarak kanser oluşumuna sebep olmaktadır. *ras*, *abl*, *c-myc*, *N-myc*, *c-erbB-2*, *akt*, *HER-2/neu* ve *Bcl-2* tanımlanmış onkogenlerden bazılarıdır. Onkogenlerin büyük bir kısmı hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü ile ilişkili **proto-onkogen** denen normal genlerin mutasyona uğramış veya anormal ifade edilmiş olan şekilleridir. Büyüme faktörleri, reseptörler, hücre içi sinyalleticileri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler ve transkripsiyon faktörleri proto-onkogen sınıfında bulunurlar (Köktürk ve ark. 2003; Dilsiz 2004; Cooper ve Hausman 2006; Cabadak 2008).

Proto-onkogenlerin onkogene dönüşüm süreci bazı mekanizmalarla gerçekleşmektedir (Diamanis 1997; Köktürk ve ark. 2003; Karp 2004; Cooper ve Hausman 2006; Yılmaz ve Altunok 2011). Bu mekanizmalar ise şunlardır:

1. Proto-onkogenlerin **translokasyonu** genlerin protein kodlayan bölgesinde değişikliklere neden olur. Bu da anormal gen ürününün ortaya çıkmasına yol açar. Bir tirozin kinaz proteini kodlayan *abl* proto-onkogeni kronik miyeloid lösemi ve akut lenfositik lösemi de ve integral mitokondriyal dış zar proteini kodlayan *bcl-2* proto-onkogeni ise folliküler B hücreli lenfomada translokasyona uğramıştır. Kronik miyeloid lösemide 9. kromozomdaki *abl* proto-onkogeni 22. kromozoma taşınır. Bu translokasyon sonucunda *abl*, 22

kromozomdaki *bcr* geni ile birleşir. Abl proteinine Bcr dizilerinin eklenmesi Abl'nin kontrolsüz aktivitesine neden olarak hücre transformasyonuna sebep olur.

2. Proto-onkogenlerin **amplifikasyonu** yüksek miktarda ifadesine neden olur. Serin/treonin protein kinaz kodlayan *akt* onkogeni meme, yumurtalık ve pankreas kanserlerinde, bir transkripsiyon faktörü kodlayan *c-myc* onkogeni ise meme ve akciğer kanserlerinde amplifikasyona uğramıştır.

3. Proto-onkogenlerde meydana gelen **nokta mutasyonları** onkogenik aktivasyonlara neden olur. *ras* genleri barsak, akciğer, pankreas, tiroid ve pankreas gibi pek çok kanser türlerinde nokta mutasyonu ile onkogenik aktivasyon kazanır.

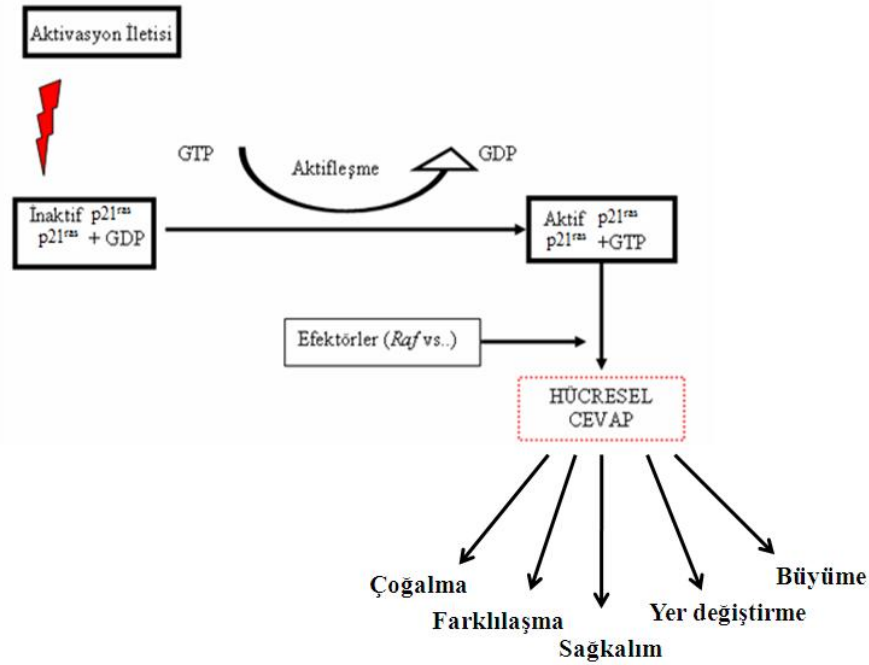
4. **Delesyonlar**, proto-onkogen aktivitesini düzenleyen düzenleyici bölgelerin kaybına, dolayısıyla aktivitesi kontrol edilemeyen onkogen proteinlerinin ortaya çıkmasına sebep olabilir. *Raf* onkogeni bu şekilde aktive olarak hücrede transformasyona neden olur.

1.2.4. *ras* onkogeni ve MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağı

Ras proteinleri normal olarak hücrede çoğalma, farklılaşma, büyüme, adezyon, yer değiştirme, hücre iskeleti bütünlüğü ve canlı kalma ile ilgili sinyal yolları gibi (1.3) birçok hücre gelişimin düzenlenmesinden sorumludur (Rajalingam ve ark. 2007). Memeli genomları N-Ras, H-Ras ve K-Ras4A ve K-Ras4B proteinlerini kodlayan 3 *ras* genini (*N-ras*, *H-ras* ve *K-ras*) bulundurmaktadır (Eisenberg ve Henis 2007). *ras* proto-onkogen ailesi üyelerinde *K-ras*, *H-ras* ve *N-ras*'da oluşan nokta mutasyonları insan kanserlerinde en sık rastlanan genetik değişim olarak saptanmıştır (Przybojewska ve ark. 2000). Tüm insan kanserlerinin %30'unda *ras* geni mutasyonları olduğu belirlenmiştir (Fehrenbacher ve ark. 2009). *K-ras* mutasyonu, küçük olmayan hücreli akciğer (%35), kolorektal (%45) ve pankreas kanserinde (%90); *N-ras* mutasyonu melanoma (%15), akciğer (%30) ve akut miyelogenous lösemide (%30); *H-ras* mutasyonu ise (%10) mesane ve (%10) böbrek kanserinde tespit edilmiştir (Downward 2003).

Ras hücre içi sinyali başlatan çeşitli ekstraselüler büyüme faktörleri, hormonlar ve farklılaşma faktörlerine yanıt olarak aktive olur (Jr ve Mccubrey

2002). G-protein ailesinden olan Ras ($p21^{ras}$) GTP-bağlı durumda aktifken, GDP-bağlı iken inaktif durumdadır (Şekil 1.3). Ras'ın aktif ve inaktif formları arasındaki dönüşümünü GAP ve SOS proteinleri gerçekleştirir. GAP, instirinsik Ras-GTPaz'ı uyararak bağlı olan GTP'nin hidrolizini ve böylece Ras inaktivasyonunu sağlar. SOS ise tirozin kinaz reseptörünün fosforilizasyonu sonucu Grb2 tarafından aktiveleştirilir ve GDP ile GTP'nin yer değiştirmesini sağlar. Aktif hale geçen Ras, sinyali diğer proteinlere ve hücre içindeki ikincil habercilere iletir. Daha sonra Ras GTPaz aktivitesiyle tekrar inaktif hale geçer (Güneş 2003).



Şekil 1.3. $p21^{ras}$ proteininin aktivasyonu (Güneş 2003'den değiştirilmiştir)

Aktif Ras daha sonra Raf/serine treonin kinazı ve MEK'i fosforile ederek aktif hale geçirir. Bunun sonucunda ERK yolağı aktive olur ve kinaz şelalesi, sırasıyla Raf (MAP3K), MEK (MAP2K) ve ERK (MAPK) proteinlerinin aktivasyonu ile devam eder. Aktif MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları ve diğer protein kinazlar) ve/veya çekirdeğe geçerek bazı özel transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Siklin D1 ifadesinin Ras'a bağlı olarak uyarılması ve $p27^{kip1}$ 'in baskılanması temel olarak RAF/MEK/ERK yolağının aktivasyonuna bağlıdır. Ayrıca hücre döngüsü ilerlemesinde Ras sinyali ile pRb

regülasyonu arasında özel bir bağlantı bulunmaktadır. Ras'ın inaktivasyonu, G1 tutuklanmasında katkısı olan hipofosforile pRb'nin aktivasyonuna sebep olur (Macaluso ve ark. 2002; Güneş 2003). Ancak *ras* proto-onkogenlerinde mutasyon meydana geldiğinde, proteinlerin aktif-inaktif durumları arasındaki denge bozulur. *ras* onkogeninde GTPaz aktivitesi ortadan kalkar veya guanin nükleotidlerinin ayrılma hızı artar. Bu durumda Ras'ın hep aktif halde kalması sürekli bir sinyal iletimine ve bölünmeye yol açar (Güneş 2003).

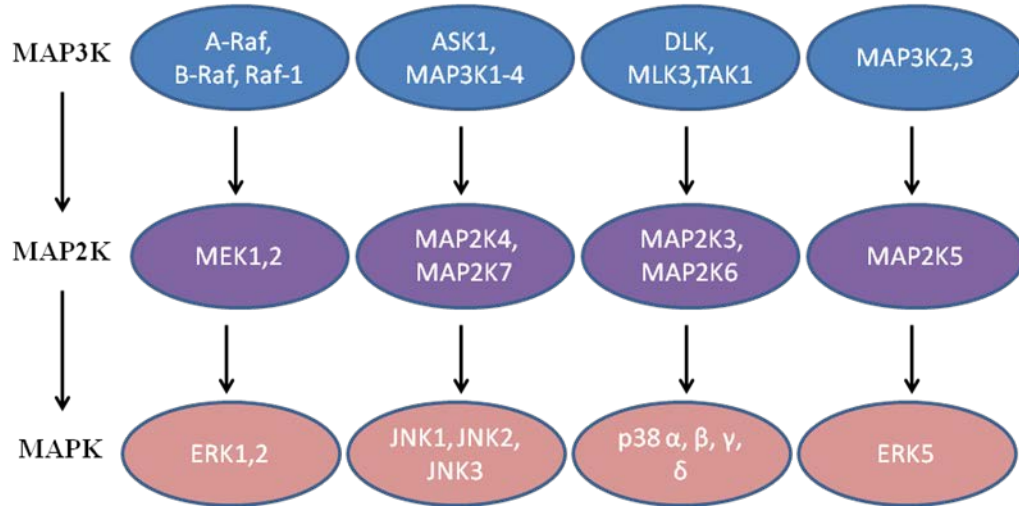
Mitojen aktif protein kinaz (MAPK) şelaleleri evrimsel olarak korunmuş hücre içi sinyal yollarıdır. Ökaryotik tüm hücrelerde bulunan MAP kinazlar, hücre zarından çekirdeğe sinyal aktarımında önemli rol oynayan proteinlerdir (Doğan ve Güç 2004). MAPK'lar hedef protein substratlarının özel serin ve treoninlerini fosforlayarak, hücre çoğalması, hareket, sağ kalım, farklılaşma ve apoptoz gibi ana hücrel süreçlerin kontrolünü sağlarlar (Johnson ve Lapadat 2002; Jr ve Mccubrey 2002; Plotnikov ve ark. 2011). Pek çok önemli hücrel fonksiyonu kontrol etmelerinden dolayı MAPK'lar fizyoloji ve insan hastalıklarındaki rolünün belirlenmesi için geniş ölçüde çalışılmışlardır. Bugüne kadar memelilerde MAPK yolağının 6 ayrı grubu belirlenmiştir:

1. Ekstraselüler regüle kinazlar (ERK1/2)
2. Jun NH₂ terminal kinazlar (JNK1/2/3)
3. p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$)
4. ERK 7/8
5. ERK 3/4
6. ERK 5

Bu gruplardan en geniş ölçüde çalışılanlar ise ERK 1/2, JNK ve p38 kinaz yollarıdır (Krishna ve Narang 2008).

ERK1 ve ERK2 tüm dokularda farklı miktarda ifade edilen ve %83 aminoasit benzerliği olan izoformlardır. ERK şelalesi (A-Raf, B-Raf, Raf1-MEK1, 2-ERK1, 2) büyüme faktörleri, sitokinler, virüs enfeksiyonu, tirozin kinaz reseptörleri, G proteinleriyle kenetli reseptörleri (GPCR) ve karsinojenleri içine alan çok sayıda ekstraselüler ve intraselüler uyarı ile aktive olur (Şekil 1.4) (Johnson ve Lapadat 2002; Junttila ve ark. 2008; Krishna ve Narang 2008). ERK aktivasyonu, bir transkripsiyon faktörü olan c-myc'yi aktive eder. Diğer yandan

onkogenik *ras*, ERK1/2 yolağını devamlı olarak aktive ederek tümör hücrelerinin çoğalma oranının artmasına sebep olur (Junttila ve ark. 2008; Krishna ve Narang 2008).



Şekil 1.4. ERK1/2, JNK, p38 ve ERK5 MAPK yollarının aktivasyonunda görevli MAPK bileşenleri

JNK'lar stres aktif protein kinazlar olarak JNK1, JNK2 ve JNK3 olmak üzere 3 farklı şekilde bulunurlar. JNK'lar sitokinlere, UV radyasyonuna, büyüme faktörü yoksunluğuna ve DNA hasar ajanlarına yanıt olarak kuvvetli bir şekilde aktive edilirler. Bu uyarılar ASK1, HPK1, MLK-3, MAP3K1-4, TAK-1 ve TPL-2 gibi MAP3K'larını aktive etmektedir. MAP3K'lar tarafından aktive edilen MAP2K4 ve MAP2K7 de JNK MAPK'larını (JNK1, JNK2 ve JNK3) aktive eder (Şekil 1.4) (Johnson ve Lapadat 2002; Roux ve Blenis 2004; Junttila ve ark. 2008; Krishna ve Narang 2008).

DNA bağımlı onkoprotein olan c-jun'a bağlanarak pek çok genin önemli düzenleyicisi olarak rol oynayan AP-1 transkripsiyon kompleksini oluştururlar (Krishna ve Narang 2008). JNK aktivitesi ve c-jun fosforilasyonunun Ras uyarımlı tümör oluşumunda kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Hücrel transformasyonda Ras ve c-jun birlikte çalışırlar. JNK'ın kimyasal indüklü hepatokarsinogeni teşvik ettiği de bildirilmiştir (Krishna ve Narang 2008). JNK'ların programlı hücre ölümünün kontrolünde önemli rolleri bulunur. Pro-apoptotik JNK sinyalinin hedefi tümör baskılayıcı p53'tür. p53'ün JNK'a

bağlanması, ubiquitin aracılı degradasyon teşvikiyle p53'ü kararsız hale getirdiği bildirilmiştir. JNK'ın pro-apoptotik sinyalde diğer hedefleri arasında c-myc ve Bcl-2 ailesinin hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri bulunur. Bcl-xL ve Bcl-2 proteinlerinin JNK tarafından fosforlanarak baskılandığı bildirilmiştir (Krishna ve Narang 2008).

p38 bağışıklık sitokinleri tarafından aktive edilerek bağışıklık yanıtı aktivasyonunda önemli rol oynayan bir proteindir. İnsanlarda astım ve otoimmünite gibi hastalıklarda ortaya çıkarlar. Bunun yanı sıra, p38 MAPK'lar, hormonlar, G protein reseptör ligandları, osmatik şok, sıcaklık şoku ve çevresel stresler gibi uyaranlarla da aktive edilirler (Johnson ve Lapadat 2002; Krishna ve Narang 2008). α , β , γ , δ olmak üzere dört tane izoformu bulunan p38'in aktivasyonunda, MLK2/MST, MLK3, DLK, ASK1 ve TAK1 gibi MAP3K'lar görev yapmaktadır. Bütün MAPK'lar gibi p38 kinazları da, MAP2K'lar ile aktive edilirler (MAP2K'lar MAP2K3 ve MAP2K6). Bunun yanı sıra JNK'nın yukarı kinazları olan MAP2K4 ve MAP2K7'de p38 izoformlarını aktive edebilir (Şekil 1.4) (Johnson ve Lapadat 2002; Krishna ve Narang 2008; Plotnikov ve ark. 2011). p38'in ayrıca tümör baskılayıcı olarak görev aldığı pek çok çalışmada bildirilmiştir. Bu tümör baskılayıcı etkisinin p53'ün ve p53-bağımlı apoptozun aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Pek çok kemoterapötik ajanın apoptoz uyarımı için p38 aktivitesine ihtiyaç duyduğu da belirtilmiştir (Krishna ve Narang 2008).

ERK5 yolağı stres, büyüme faktörleri ve mitojenler ile aktive edilmektedir. Bu yolağın MAP3K'ları olan MAP3K2,3, MAP2K5'i aktive etmekte ve o da ERK5 (BMK1)'i aktive etmektedir (Şekil 1.4). ERK5 yolağı, kanser de dahil olmak üzere birkaç patolojiye dahil edilmektedir. Bu yolakla ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmadığından dolayı, yolağın işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Krishna ve Narang 2008; Plotnikov ve ark. 2011).

1.2.5. Tümör baskılayıcı genler

Hücre büyümesinin negatif regülatörü olarak işlev gören genler **tümör baskılayıcı genler** veya **antionkogenler** olarak adlandırılırlar. Tümör baskılayıcı

genlerin kaybı veya inaktivasyonunun hücreleri negatif büyüme sinyallerinden mahrum bırakacağı ve hatta malignant transformasyona sebep olacağı bilinir. (Diamandis 1997; Yılmaz ve Altunok 2011). Onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyon süreçleri arasında önemli bir fark bulunur. Onkogenler, diğer normal allellerinin eş zamanlı ifade edilmesine rağmen hücreleri transforme edebildiklerinden dolayı dominant genlerdir. Tümör baskılayıcı genler ise resesif genlerdir. Çünkü alellerden birinin kaybı veya inaktivasyonu hücrelerin fonksiyonunda bir değişikliğe yol açmaz. *p53*, *Rb*, *p21 (WAF+1/CIF 1)*, *BRCA 1-BRCA 2*, *APC*, *HF1*, *NF2*, *PTC*, *PTEN*, *Smad2*, *Smad4*, *TβRII*, *VHL*, *WT1* ve *INK4* tümör baskılayıcı genler arasında bulunur (Diamandis 1997; Cooper ve Hausman 2006; Yılmaz ve Altunok 2011).

İlk bulunan tümör baskılayıcı gen olan *Rb* (retinoblastoma) S fazına geçiş kontrolünü etkileyen pRb proteinini kodlar (Bertram 2001). E2F ailesi transkripsiyon faktörlerine bağlanarak onları baskılar ve hücre çoğalmasını kısıtlar (Ahlander ve Bosco 2009). pRb, E2F'ye bağlı olduğu sürece S fazına geçiş için gerekli genleri tetikleyemediği gibi pek çok onkogeni de baskılar. Mitojen uyarımından sonra, G1 fazının sonunda, siklinD/cdk4 kompleksi pRb'yi fosforlayarak E2F'nin serbest kalmasına neden olur. Serbest E2F, S fazı girişi için gerekli kritik genlerin transkripsiyonunu tetiklerken, p16, p21, p27 ve siklin/CDK komplekslerini baskılar (Bertram 2001; Liu ve ark. 2004). *Rb* geninde oluşan çeşitli mutasyonlar ve düşük seviyede ifadesi p16 inaktivasyonuna, siklin D1 ve CDK 4-6'nın aşırı ifade edilmesine neden olur, hücre döngüsünün dengesini bozar ve kontrolsüz çoğalmaya yol açar (Diamandis 1997).

Rb geninde heterozigot kaybı retinoblastoma, osteosarkoma, Wilm tümörü, hepatoblastoma, rabdomiyosarkoma ve özafagusu içine alan pek çok tümör tipinde bulunmuştur (Diamandis 1997; Liu ve ark. 2004). Ayrıca meme, küçük hücreli akciğer, mesane, meme kanserleri ve lösemi gibi tümör çeşitlerinde de *Rb* geninde değişimler gözlenmiştir. Retinoblastoma, çocukluk çağında görülen en yaygın malignant tümördür. Vakaların yaklaşık %40'ı ailesel ve kalanı ise sporadiktir (Bertram 2001). Kalıtsal retinoblastoma ve osteosarkomalarda hastanın eşey hücrelerindeki *Rb* lokusu heterozigottur. Buna rağmen sporadik

retinoblastoma ve diğer sporadik tümörlerde Rb lokusunda her iki allel de somatik olaylar sonucunda inaktifleşirler (Diamandis 1997).

p53 geni, gen transkripsiyonu, DNA sentez ve tamiri, genom bütünlüğünü koruma, hücre döngüsü durdurulması, büyümeyi sonlandırma ve programlı hücre ölümü gibi önemli hücresel işlevlerde rolü olan bir protein kodlar (Yılmaz ve Altunok 2011). *p53*'ün aktivitesi ise bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 tarafından kontrol edilir. Normalde Mdm2 *p53*'e bağlanarak onun aktivitesini baskılar. Ancak DNA'da hasar oluştuğunda *p53*'ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da *p53* Mdm2'den ayrılır (Ozaki ve Nakagawara 2011; Yılmaz ve Altunok 2011). Normal koşullar altında *p53*'ün ifade seviyesi oldukça düşüktür. DNA hasarı, hipoksemi, onkogen aktivasyonu, oksidatif hasar ve nükleotid düzensizliği gibi birçok hücresel strese yanıt olarak, fosforilasyon ve asetilasyon gibi kimyasal modifikasyonlarla *p53* hızlıca çekirdekte biriktirilir. *p53* geni, *p21^{WAF1}*, *p53R2* ve *GADD452* genlerini aktive ederek G1'de hücre döngüsünün durdurulmasını sağlar. Ciddi DNA hasara sahip olan ve tamir yapamayan hücreler *p53*'ün pro-apoptotik fonksiyonuyla uzaklaştırılır. Böyle durumlarda, *BAX*, *PUMA*, *NOXA* ve *p53AIP1* genleri *p53* tarafından aktive edilirler ve mitokondriyal zar potansiyelinin bozulmasına katkıda bulunurlar. Ancak mutant *p53*'e sahip hücreler DNA tamiri olmadan kontrolsüz bir şekilde çoğalmayı sürdürür. *p53* mutasyonlarına karsinogenezin erken safhalarında rastlanır. Bu sebeple erken tanıda önem taşıyan bir genidir (Köktürk ve ark. 2003; Ozaki ve Nakagawara 2011). Mutant *p53* tüm insan kanserlerinin %50'sinde görülürken küçük hücreli akciğer kanserlerinin %90'ında, yassı hücreli kanserlerin %65'inde, büyük hücreli kanserlerin %60'ında ve adeno kanserlerin %33'ünde saptanmıştır. Pek çok kanser dokusunda *p53* geninde heterozigot kaybı olduğu ve *p53* mutasyonlarının %95'inin merkezi diziye özgü DNA bağlanma bölgesinin içinde bulunduğu belirlenmiştir (Köktürk ve ark. 2003; Ozaki ve Nakagawara 2011).

1.2.6. Apoptoz: Programlanmış hücre ölümü

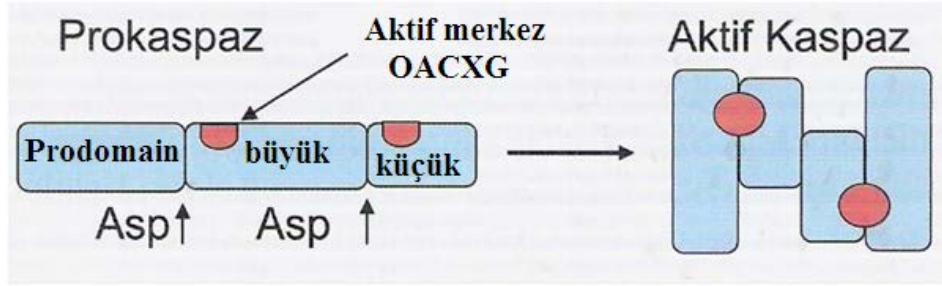
Apoptoz, gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümü olarak tanımlanan fizyolojik bir mekanizmadır (Öktem ve ark. 2001; Engin ve Özyardımcı 2001). Hücre dışarıdan

ve içeriden olmak üzere çeşitli olumsuz uyaranlara karşı apoptoz yolağını aktive eder. Hücrede oluşan DNA hasarları önce onarılmaya çalışılır, onarılamaması durumunda hücre apoptoz sürecine girer. Böylelikle hasarlı hücrelerin çoğalması ve tümör oluşumu gibi anormal gelişimler de engellenmiş olur (Altunkaynak ve Özbek 2008).

Apoptozu hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenler bulunur. Sfingolipid yolu da apoptoza neden olan bir hücre dışı sinyaldir. Hücre zarındaki sfingomiyelin çeşitli etkenler ile uyarılan sfingomiyelinaz enzimi tarafından seramide dönüştürülür. Seramidden oluşturulan sfingozin ise Bid proteinini aktive ederek mitokondriyal yolak üzerinden apoptozu uyarır. Bazı durumlarda apoptoz hücrel stres takiben iç sinyallerle başlatılır. Hücrel stres, radyasyon, kimyasallar ya da viral enfeksiyona maruziyet sonunda oluşabilir. Genellikle iç sinyaller mitokondri aracılığıyla apoptozu başlatır (Engin ve Özyardımcı 2001; Güneş 2003; Kandaş 2004; Akşit ve Bildik 2008; Solakoğlu 2009).

1.2.6.1. Kaspazların apoptozdaki rolü

Apoptoz süreci kaspaz olarak isimlendirilen proteolitik enzimlerle gerçekleştirilir. Şimdiye kadar 14 tane kaspaz tanımlanmıştır. Bunlar başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10), efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar kaspazlardır (kaspaz 1, 4, 5, 11) (Engin ve Özyardımcı 2001; Zhang ve ark. 2003; Gewies 2003; Elmore 2007). Bütün kaspazlar inaktif zimojenler olarak sentezlenen, N-terminalinde prodomain taşıyan, küçük ve büyük alt üniteye sahip proteazlardır (prokaspaz) (Şekil 1.5). Etkilerini substratlarını aspartik asit rezidüllerinden keserek gösterirler (Oliver ve Valette 2005).



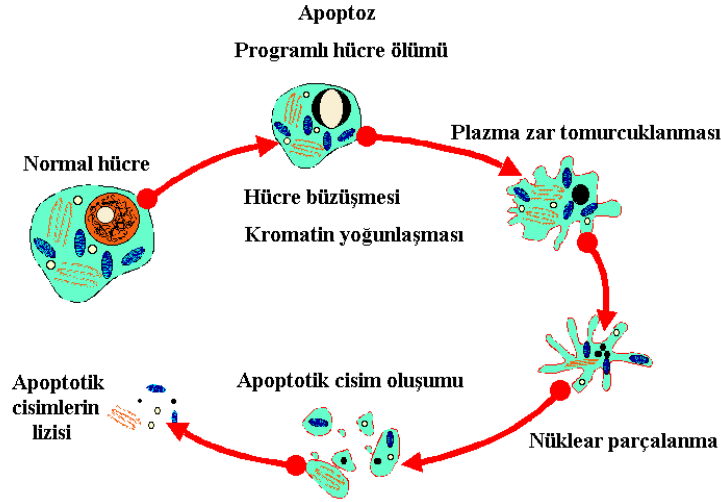
Şekil 1. 5. Kaspazların aktifleşme mekanizması (Yıldırım ve ark. 2007'den değiştirilmiştir)

Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelaleyi oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyali efektor kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlardan bazıları lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı gibi proteinlerini parçalar. Kaspaz-3, DNA onarımında görevli olan PARP'ı inaktive ederek DNA onarımını engeller. Bazıları ise bir DNaz'ı aktifleştirip DNA'nın parçalara ayrılmasına neden olur. (Engin ve Özyardımcı 2001; Güneş 2003; Oliver ve Valette 2005). IAP (apoptoz inhibitörleri) sitozolde lokalize olan, kaspazların inaktif veya aktif formlarına bağlanarak onların fonksiyonlarını baskılayan apoptoz inhibitörleridir. Smac/DIABLO ise IAP bağlanma motifi içeren, mitokondrinin iç zarında bulunan ve apoptoz boyunca sitokrom-c ile beraber salınan proteinlerdir ve IAP'lerin baskılanmasını sağlayarak kaspaz aktivasyonunu sağlarlar (Zimmermann ve Green 2001; Zhang ve ark. 2003).

1.2.6.2. Hücre ölümünde gerçekleşen morfolojik değişiklikler

Bir hücre apoptoza giderken morfolojik bir seri değişikliğe uğrar. Apoptotik hücreler, büzüşme, piknoz (hücre çekirdeğinin küçülmesi, büzüşmesi), deformasyon ve komşu hücrelerle bağlantı kaybı gibi sergiledikleri tipik özellikler ile tanınırlar. Apoptozda stoplazma yoğunlaşır ve organeller daha sıkı paketlenir. Bunun yanında organellerin bütünlükleri korunur ve organeller sağlam plazma zarının içinde sarılı durumda bulunurlar. Apoptotik hücrelerde kromatin çekirdek zarında toplanarak yoğunlaşır ve plazma zarı tomurcuklanır (Şekil 1.6). Son olarak hücre sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren apoptotik cisim denen zarla sıkı çevrili yapıların içinde fragmente olur. Oluşan bu apoptotik

cisimler makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir. Bu sayede apoptotik cisimler inflamasyon yanıtına sebep olmadan dokudan uzaklaştırmış olur (Bold ve ark. 1997; Zimmermann ve ark. 2001; Zhang ve ark. 2003; Gewies 2003; Elmore 2007).



Şekil 1.6. Apoptotik bir hücrede gerçekleşen morfolojik değişiklikler (<http://mutation.blogspot.com/2011/08/apoptosis.html>)

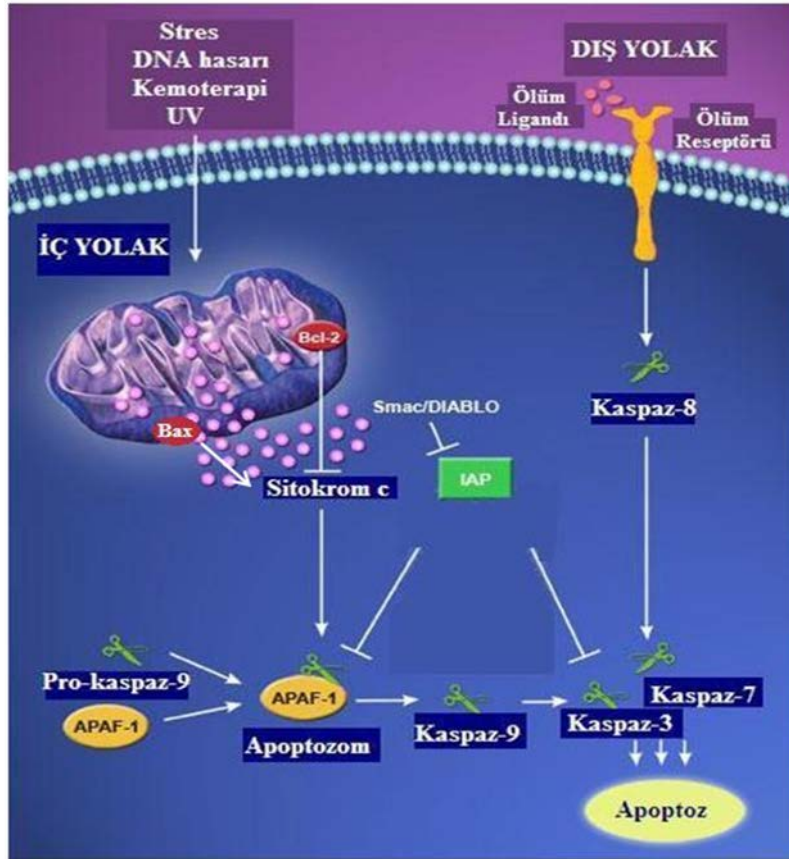
Diğer bir ölüm şekli olan nekroz (nekrotik ölüm) hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görerek şişip, patlayarak ölmesi olarak tanımlanır. Apoptoz gibi programlı fizyolojik bir mekanizma değildir, kontrolsüz gerçekleşir. Nekrozda hücre çekirdeği normal görünümündedir ancak organeller bütünlüğünü kaybetmiştir. Hücrenin şişerek patlamasıyla hücre içeriği dışarıya yayılır ve komşu hücreler bu durumdan zarar görürler (Cruchten ve Broeck 2002; Yıldırım ve ark. 2007; Akşit ve Bildik 2008).

1.2.6.3. Apoptoz mekanizmaları

Bugüne kadar araştırmacılar dış yolak (ölüm reseptör yolağı) ve iç yolak (mitokondriyel yolak) olarak adlandırılan iki tane ana apoptotik yolak belirlemişlerdir. Bu iki yolağın birbirine bağlı olduğu, bir yolaktaki moleküllerin diğer yolağı etkileyebileceğine dair bulgular olduğu bildirilmiştir.

Ölüm reseptör yolağı, hücre zarında bulunan TNF ve Fas gibi bazı hücre ölüm reseptörlerine ligandların bağlanmasıyla aktive edilebilir. Bu ölüm reseptörlerinin hücre içine bakan kısımlarında prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlayan reseptöre özgü TRADD ve FADD gibi ölüm bölgesi bulunur. Ölüm reseptörlerine kendilerine özgü ligandın bağlanması, reseptörün trimerik yapıya dönüşmesine sebep olur. Ölüm bölgesi bazı adaptör moleküllerle etkileşerek prokaspazı 8'i keser. Prokaspaz 8 'in aktif hale geçmesi, sırasıyla kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu bir kaspaz kaskatını harekete geçirir (Şekil 1.6). Kaspaz 8'in aktif hale geçmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına da neden olur. Aktif Bid, mitokondriden sitokrom c, SMAC ve kalsiyumun salınımına yol açar. Bu sebeple ölüm reseptörleri yolu mitokondriyel yolu da aktifleştirir (Engin ve Özyardımcı 2001; Solakoğlu 2009).

Apoptozda mitokondriyal yolak pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olan Bcl-2/ Bax gen ailesi ile düzenlenmektedir. Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2 ve Bcl-XL, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınımını engelleyerek hücrenin yaşamasını teşvik ederler. Bax, Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH3-only gibi proteinler ise hücreyi apoptoza sevkeden pro-apoptotik üyelerdir. Büyüme faktörünün uzaklaştırılması gibi çeşitli uyarılar Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in ve UV ışını Bmf'nin aktive olmasına neden olurken, pro-apoptotik üyeler tarafından Bcl-2 baskılanır. Normal durumda Bcl-2 tarafından inaktif halde tutulan Bak ve Bax proteinleri, Bcl-2'nin inaktif hale geçmesinden dolayı etkinleşerek mitokondri dış zarında porların oluşumuna ve zar potansiyelinin değişime sebep olurlar. Bundan dolayı da sitokrom c ve AIF (apoptozis-indükleyici faktör) mitokondriden sitozole geçer (Engin ve Özyardımcı 2001; Akşit ve bildik 2008; Altunkaynak ve Özbek 2008; Solakoğlu 2009). Sitokrom c, mitokondri iç zarında bulunan bir proteindir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması ile kaspaz aktivasyonu başlar (1.7). Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanarak onu aktive eder, bu yapıya ATP'nin de katılımıyla apoptozom denilen kompleks oluşur (Şekil 1.6). Bu kompleks prokaspaz 9'u, o da prokaspaz 3'ü aktive eder (Engin ve Özyardımcı 2001; Zhang ve ark. 2003; Akşit ve Bildik 2008; Altunkaynak ve Özbek 2008).



Şekil 1.7. Apoptozda dış ve iç yolak (http://imgenex.com/view_data_page.php?id=168)

Aktif kaspaz-3 ICAD'ünü keserek CAD'ı serbest bırakır ve aktiveleştirir. CAD normal hücrelerde ICAD'üne (Kaspaz Aktif DNaz inhibitör) bağlı ve inaktif halde bulunur. CAD (Kaspaz Aktif DNaz) enzimi bir DNaz olduğu için aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal fragmentlere kesilmesine neden olur (Yıldırım ve ark. 2007).

p53 geni de apoptozda rol oynar. Hücrelerde hasar tamir edilemeyecek boyutta olduğu zaman *p53* gen ürünü, hücreyi apoptoza yönlendirir. Ayrıca *p53*'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülür (Tomatır 2003).

1.2.7. Osteosarkoma

Osteosarkoma çocuklukta ve ergenlikte görülen en yaygın birincil malignant kemik kanseridir (Strander 2007; Oto 2008; Trougakos ve ark. 2010). ABD'de tüm sarkomların yaklaşık %30'unu oluştururken, birincil malign kemik

tümörlerinin %20'si olup birinci sırada yer alır (Oto 2008). Osteosarkoma karsinojenleri arasında UV ve iyonize radyasyon gibi fiziksel, asbest, anilin boyaları ve alkol gibi kimyasal ve virüsler, mikotoksi ve mantar gibi biyolojik ajanlar bulunur (Tan ve ark. 2009; Broadhead ve ark. 2011).

Osteosarkoma temel olarak hücreden hücreye değişen kompleks kromozom anomalileriyle karakterize edilir. Bazı çalışmalarda, osteosarkoma hücrelerinin yüksek derecede anöploidi, gen amplifikasyonu ve çoklu dengesiz kromozomal yeniden düzenlenmeler gösterdiği öne sürülmüştür. Biyopsi örnekleriyle yapılan bir çalışmada 6p21, 8q24 ile 12q14 kromozomlarında amplifikasyon ve 10q21.1'in heterozigoti kaybı osteosarkomada görülen en yaygın genetik değişimler olarak tanımlanmıştır. Hem 9, 10, 13, ve 17. kromozomların kaybını ve hem de 1. kromozomun artışı içeren sayısal kromozom anomalileri de osteosarkomayla ilişkilendirilmiştir (Broadhead ve ark. 2011).

Kromozomal anomalilerinin yanı sıra bazı sendromlar da osteosarkomayla ilişkilendirilmiştir. Bloom, Rothmund-Thompson, Werner ve Li-Fraumeni gibi sendromlu hastalarda osteosarkoma saptanmıştır (Tan ve ark. 2009; Broadhead ve ark. 2011). Retinoblastoma sendromu da hastanın osteosarkomaya yatkın hale gelmesine neden olur (Tan ve ark. 2009; Broadhead ve ark. 2011). Osteosarkoma patogeneğinde de *p53* ve *Rb* genlerinde mutasyon olduğu gösterilmiştir (Tan ve ark. 2009; Broadhead ve ark. 2011). Osteosarkomada transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmeme durumu da ortaya çıkabilir. Fos ve Jun proteinlerinden oluşan myc düzenleyicisi olan aktivatör protein 1 kompleksi (AP-1), hücre çoğalması, farklılaşması ve kemik mekanizmasının kontrolünü sağlar. Yüksek dereceli osteosarkomada Fos ve Jun proteinleri yüksek seviyede ifade edilir (Broadhead ve ark. 2011).

Osteosarkoma hücreleri otokrin ve parakrin etki oluşturan büyüme faktörleri üretirler. TGF (transforme edici büyüme faktörü), IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) ve CTGF (bağ doku büyüme faktörü) büyüme faktörlerinin düzensiz ifade edilmesi hücrelerin hızlı çoğalmasına sebep olur. Yüksek dereceli osteosarkomalarda TGF- β ailesinin ve IGF-1 ve IGF-2 ifade seviyesi oldukça yüksektir. Bu ligandların IGF-1R gibi reseptörlere çapraz bağlanması PI3K ve

MAPK sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. Bunun sonucunda hücre çoğalması ve apoptozun baskılanması teşvik edilir (Broadhead ve ark. 2011).

Osteosarkoma hastalarının tedavisi son yıllarda ciddi olarak geliştirilmiştir. Bu gelişme süreci ise tanıda, cerrahi tekniklerde, konformal radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarındaki ilerleme sayesinde gerçekleşmiştir. Yüksek dereceli osteosarkomalı hastaların hayatta kalmaları %15'den %70'e yükseltilmiştir. Buna rağmen tekrarlayan hastalıkların prognozu hala çok zayıftır (Muraro ve ark. 2007). Şimdilerde pek çok ülkede standart terapi cerrahi ve kemoterapinin farklı kombinasyonlarından oluşur. Sisplatin, doksorubisin ve metatreksat osteosarkomada en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaçlardır. Ayrıca ifosamid ve etoposid de kullanılır (Strander 2007; Tan ve ark. 2009).

Bu çalışmada ise epitelyal benzeri morfolojiye sahip insan osteosarkoma hücre hattı olan U-2 OS'lar kullanılmıştır. İlk olarak osteosarkomalı 15 yaşında bir kızıdan elde edilen U-2 OS hücreleri yabancı tip *p53* ve *Rb* genlerini ifade etmekteyken, *CDKN2A* ve *CDKN2B* genlerini ifade edemezler (Trogakos ve ark. 2010).

1.3. Kemoterapi ve Kemoterapötik Ajanlar

Kanser anlaşılması kadar tedavisinin de oldukça zor olduğu kompleks bir hastalıktır. Kanser tedavileri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarıyla uygulanır (Lammers 2010). Antikanser terapilerinin başarı oranı, hastalığın tanı anındaki evresiyle yakından ilişkilidir. Kanserinin erken teşhis edilmesinin daha iyi bir tedaviyi sağladığı dolayısıyla hastanın hayatının uzamasına katkıda bulunduğu inanılır (Diamandis 1997; Lammers 2010). Eğer erken teşhisi yapılırsa pek çok malignite, mümkün olduğu kadar çok tümör hücrelerinin cerrahi ile uzaklaştırılmasıyla iyi bir şekilde tedavi edilebilir. Cerrahi olarak tümör alınamıyor ya da ancak lezyonun bir parçası çıkarılabiliyorsa radyoterapi ve kemoterapi kullanılır (Lammers 2010). Pek çok antikanser ilacı kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmaya yöneliktir (Mehdi ve ark. 2011). Rutin olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar arasında sisplatin, mikrotübül baskılayıcısı paklitaksel ve antimetabolit gemsitabin bulunur. Böyle prototipik antikanser ajanlar, DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi süreçleri

baskılayarak hücre büyümesini engellerler. Kemoterapötik ilaçlar yalnızca kanser hücrelerini değil, hızlı bölünen diğer hücreleri de etkiler. Bu sebeple kemoterapi ilaçları bulantı, kan sayımlarında düşme ve saç kaybı gibi yan etkiler oluşturabilir. (Dilsiz 2004; Lammers 2010). İdeal olarak kemoterapötik ilaç, yalnızca neoplastik hücreleri özel olarak hedeflemelidir. Normal hücrelerde mümkün olduğunca az hasar oluşturarak sitotoksik ve/veya sitostatik etkiyle tümör yükünü azaltmalıdır (Johnstone ve ark. 2002).

Kemoterapötik ajanlar, en fazla etkiyi hücreler çoğalma dönemindeyken gösterirler. S fazına dönük ilaçlar (antimetabolitler) hücre metabolizmasını ve DNA sentezini bozarak etki gösterirler. Metotreksat, 5-Florourasil ve 6-tioguanin S fazına dönük ilaçlardır. M fazına dönük ilaçlar (bitki alkaloidleri) hücre bölünmesini mitoz safhasında durdular ve ana hücreden iki yavru hücre oluşmasını engeller. Vinkristin, vinblastin, etoposid, paklitaksel ve dosetaksel bu gruba dahil edilirler. G2 fazına dönük ilaçlar RNA, DNA ve protein sentezini etkilerler. Bleomisin, aktinomisin-D, daunorubisin G2 fazına dönük ilaçlardır. Alkilleyici ajanlar, estrogen ve kortikosteoid gibi hormonlar ve adriamisin gibi antibiyotikler faz özgü olmayan kemoterapötik ilaçlardır. Alkilleyici ajanlar hücre çekirdeğinde DNA ve RNA sentezini etkiler ve hızlı çoğalan hücrelerin ölümüne yol açarlar. Nitrojen mustard, sisplatin, ifosfamid, karboplatin ve prokarbazin alkilleyici ajanlardandır (Akyol 2004; Demir 2007).

1.3.1. Sisplatin

Bir platinum analogu olan sisplatin 30 yıldan fazladır kanser tedavisinde kullanılır ve testis, yumurtalık, baş, mesane, servikal, özofajiyal, boyun ve akciğer kanserlerini (küçük hücreli ve küçük hücreli dışı) içine alan pek çok kanserde yüksek etkinliğe sahiptir (Gately ve Howell 1993; Eskicioğlu ve ark. 2005; Stordal ve Davey 2007; Cepeda ve ark. 2007; Demir 2007; Tan ve ark. 2009; Gürbüz ve ark. 2011). Sisplatin hücreye girdikten sonra pozitif yüklü hale gelir ve DNA, RNA ve proteinleri içine alan nükleofilik moleküllerle etkileşebilir. Sisplatin RNA transkripsiyonunu ve DNA zincirinde çapraz bağlar oluşturarak DNA replikasyonunu baskılayarak hücre döngüsünün S fazında tutuklanmasına neden olur ve bazı sinyal yollarını aktive ederek apoptozu uyarır (Stordal ve

Davey 2007; Demir 2007). İlaç alınımının azalması, sızmanın artması, detoksifikasyonun artması, apoptozun baskılanması ve DNA onarımının artması gibi pek çok mekanizma sisplatin direnci oluşmasına katkıda bulunur (Gately ve Howell 1993; Eskicioğlu ve ark. 2005; Stordal ve Davey 2007).

Sisplatinin apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. İnsan glioma, HeLa ve nöroblastoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada, sisplatin uyarımlı apoptozda ERK aktivasyonun önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark. 2004). Qin ve Ng (2002) ise, sisplatinin HepG2 ve Hep3B hücrelerinde, çoğalmayı engellediğini ve apoptotik hücre ölümünü teşvik ettiğini öne sürmüşlerdir. İnsan baş ve boyun skuamöz karsinoma hücre hatlarında (HNSCC) sisplatin indüklü apoptozda NF-kB aktivasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2006). Bir başka çalışmada sisplatinin, U-2 OS hücrelerinde apoptotik yanıtı indüklediği ve p53 ifadesinin ve Ser15 uyarılmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Gatti ve ark. 2002). Jirsova ve arkadaşları (2006) insan Schwann hücrelerinde DNA hasarı uyarılmasında sisplatinin, yüksek etkinliğe sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sisplatin, hücre yanıtında MAPK'ların önemli bir düzenleyicisi olarak görev alır. Ras süper aile üyeleri, protein kinaz C (PKC), EGFR, S-1-P ve Akt ailesini içine alan farklı proteinler sisplatin indüklü MAPK'ların aktivasyon düzenleyicisi olarak tanımlanır (Brozovic ve Osmak 2007). Kolon kanser hücre hattı olan HCT116'larda sisplatin uyarımlı hücre ölümü p53/ROS/p38α MAPK şelalesi aracılığıyla gerçekleşir (Brago ve ark. 2007). PKC aracılı p38 sinyalinin azalmasının, glioblastoma hücrelerini sisplatin sitotoksitesinden koruduğu gösterilmiştir (Brozovic ve Osmak 2007).

MAP3K ailesinin bir üyesi olan ASK1 (MAP3K5) yolağının sisplatin uyarımlı apoptozdaki bağlantısı insan yumurtalık kanser ve insan böbrek embriyonik hücrelerinde belirlenmiştir. Sisplatinle muameleyi takiben ASK1, SAPK/JNK ve p38'i aktive eden MAPK SEK1 (MKK4) ve MKK3/MKK6'nın aşağı altgrubunu aktive eder. ASK2 (PI3K/Akt sağkalım sinyal yolağının üyesi) sisplatin uyarımlı SAPK/JNK ve p38 aktivasyonunu ASK1'in fosforilasyonu ile baskılar (Brozovic ve Osmak 2007; Wu ve Cederbaum 2010). Sisplatin uyarımlı MAPK'ların aktivasyonu hücre tipine özgüdür ve bu ilaca karşı hücresel yanıtta

temel rol oynar. Jurkat T hücrelerinde SAPK/JNK aktivasyonu ölüm teşvikinden sorumluyken, SK-OV-3 hücrelerinde ERK aktivasyonu sağkalım teşvikiyle sonuçlanır. Sisplatin uyarımlı insan osteosarkoma hücrelerinde (MG-63 ve SaOS-2) SAPK/JNK aktivasyonu pro-apoptotik rol oynar (Brozovic ve Osmak 2007).

1.3.2. 5-FU (5-Florourasil)

Kemoterapötik bir bileşik olan 5-FU, C-5 pozisyonunda florlanmış bir urasil analogudur. DNA ve RNA metabolizmasını bozma etkisine sahip S-fazına özgü pro-apoptotik bir ajandır. 5-FU, 40 yılı aşkın bir süredir gastrointestinal, meme, baş, boyun ve kolon kanserlerini içine alan farklı insan kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Gradishar ve Vokes 1990; Li ve ark. 2004; Borralho ve ark. 2007; Akao ve ark. 2011). Buna rağmen hala, tümör hücre direnci, 5-FU'in klinik kullanımını önemli derecede sınırlandırır (Borralho ve ark. 2007).

5-FU'in %80-85'i dihidroprimidin dehidrogenaz tarafından (DPD) inaktif metabolitlere katabolize edilmekte ve yalnızca orjinal dozunun %1-3'ü tümör hücreleri ve normal hücrelerde anabolik etkiyle, DNA sentezi baskılanması ve RNA oluşum ve fonksiyonunun baskılanması yoluyla sitotoksik etkiyi oluşturur (Miura ve ark. 2010). 5-FU'in hücre döngüsünü etkilediği ve kanser hücrelerinin apoptotik ölümünü uyardığı da bilinir. Li ve arkadaşları (2004) ağız kanseri hücre hatlarıyla yaptıkları bir çalışmada 5-FU'in G1/S fazı tutuklanmasını uyardığını ve bunun, p21, siklinD, siklin E değişiminden ve CDK4'ün p21'e bağlanmasının artmasından dolayı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

1.3.3. Karvakrol ve kanser

Karvakrolün antitümör etkisi olup olmadığını araştırmak için bugüne kadar çeşitli çalışmalar yapılmıştır. He ve arkadaşları (1997) karvakrolün, fare melonoma hücre hattı B16 üzerinde *in vivo* ve *in vitro* sitotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Karvakrol, DMBA-uyarımli sıçanlarda güçlü antitümör aktivite göstermiştir (Zeytinoglu ve ark. 1998). Stamatti (1999) karvakrolün insan larinks kanser hücre hattı olan Hep-2 üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu

bildirmiştir. Karvakrolün fare *N-ras* transform miyoblast hücresi olan CO25 üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve bu hücrelerde DNA sentezini baskıladığı öne sürülmüştür (Zeytinoglu ve ark. 2003). Başka bir çalışmada karvakrol ile muamele edilen A549 hücrelerinde, sayıca azalış, morfolojik dejenerasyon, total protein miktarı azalışı gözlemlendiği ve bu bilgiler ışığında karvakrolün A549 hücreleri için güçlü bir baskılayıcı olduğu bildirilmiştir (Koparal ve Zeytinoglu 2003). Karvakrolün, 3,4-benzopiren indüklü sıçanlarda güçlü antitümör aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Karkabounas ve ark. 2006). Karvakrol, meme kanser hücre hattı MDA-MB 231 üzerinde de antiproliferatif ve apoptotik etki göstermiştir (Arunasree 2010). Mehdi ve arkadaşları (2011) servikal kanser hücre hattı olan HeLa ve SiHa hücreleriyle yaptıkları bir çalışmada, karvakrolün bu hücrelerde sitotoksik etki gösterdiğini ve apoptozu teşvik ettiğini ileri sürmüşlerdir. Karvakrolün insan hepatokarsinoma hücre hattı HepG2 üzerinde önemli sitotoksik ve apoptotik etkisi olduğu bildirilmiştir (Sivas ve Tomsuk 2011; Yin ve ark. 2011). Akalın ve İncesu (2011) karvakrolün *H-ras* transform 5RP7 ve *N-ras* transform CO25 hücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara doğrultusunda karvakrolün her iki hücre hattında da sitotoksik ve apoptotik etki gösterdiğini ve 5RP7 hücrelerinin karvakrole daha hassas olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bütün bu çalışmalar karvakrolün etki mekanizmasını moleküler seviyede ve özellikle gen ifadesi seviyesinde açıklamada yetersiz kalmaktadır.

1.4. Amaç

Bu çalışmada, bir bitki bileşeni olan karvakrolün *H-ras* ile transfekte olan sıçan embriyonal fibroblast (5RP7) ve normal embriyonal fibroblast hücreleri (F2408) ile insan osteosarkoma hücreleri (U-2 OS) üzerine sitotoksik ve apoptotik olası etkilerinin araştırılması ve kanser tedavisinde kullanma potansiyelinin olabileceğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla MTT ve nötral kırmızı alım yöntemi ile sitotoksik ve AO/EB çift boyama yöntemiyle apoptotik etkilerinin belirlenmesi planlanmıştır. Ayrıca karvakrolün U-2 OS hücrelerinde apoptoz ve MAPK sinyal yolağı ile ilgili bazı genlerin ifadeleri üzerine etkilerinin ise RT²-PCR plaka yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

RNeasy Mini Kit, QIAshredder Homojenizer, DNase I seti, RT² Profiler™ Human MAP kinase signaling pathway PCR Array, RT² RNA QC PCR Array, RT² qPCR Master Mix ve RT² First Strand Kiti SABioscience™ firmasından temin edilmiştir. Karvakrol, sisplatin, 5-Florourasil (5-FU), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5difenil tetrazolyum bromid (MTT), dimetil sülfoksit (DMSO), ksilen siyanol, ethidyum bromid ve akridin oranj Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır. Fötal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin ve Tripsin/EDTA PAA Laboratories GmbH firmasından elde edilmiştir. McCoy's 5A medium Biological Industries, β-merkapto etanol Carlo Erba, dietil pirokarbonat (DEPC) Applichem, nötral red Fluka ve 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (MOPS) Alfa Aesar firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Test Maddelerinin Hazırlanması

2.2.1. Karvakrol dozlarının hazırlanması

Karvakrol DMSO içinde çözülerek 100 mM ana stok olarak hazırlanmıştır. Ana stok küçük hacimlere bölünerek +4 °C'de saklanmıştır. Taze medyum içinde ana stok seyreltilerek 10 mM ara stok elde edilmiştir. Deneyler için kullanılan 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM, 600 µM, 800 µM karvakrol dozları taze medyum içinde 10 mM karvakrolün seyreltilmesiyle elde edilmiştir. Hücreler direkt olarak bu medyumda kültüre edilmişlerdir. Elde edilen tüm dozlardaki DMSO oranı %0,1'in altındadır.

2.2.2. Sisplatin ve 5-FU dozlarının hazırlanması

Sisplatin DMSO içinde çözülerek 100 mM ana stok hazırlanmıştır. Taze medyum içinde ana stok seyreltilerek 1 mM ara stok elde edilmiştir. Deneylerde kullanılan 10 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 40 µM sisplatin dozları taze medyum

içinde ara stokun seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen dozlardaki DMSO oranı %0,1'in altındadır.

5-FU DMSO içinde çözülerek 500 mM ana stok hazırlanmıştır. Ana stok taze medyum içinde seyreltilerek 100 mM ara stok elde edilmiştir. Ara stok taze medyum içinde seyreltilerek deneylerde kullanılan 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM 5-FU dozları hazırlanmıştır. Dozlardaki DMSO oranı %0,3'ün altındadır.

2.3. Yöntem

2.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmalarda sıçan embriyo fibroblast hücresi (F2408), H-ras geni ile transforme edilmiş sıçan embriyo fibroblast hücresi (5RP7) ve insan osteosarkoma hücresi (U-2 OS) kullanılmıştır. F2408 ile 5RP7 hücreleri %10 (v/v) FBS, %1 L-glutamin, 100 ünite/ml penisilin/streptomisin, %9,2'lik NaHCO₃ içeren DMEM içinde, U-2 OS hücreleri ise %10 (v/v) ve 100 ünite/ml penisilin/streptomisin, %7,2'lik NaHCO₃ içeren McCoy's 5A içinde, %5CO₂ ve % 95 hava bulunduran 37 °C olan inkübatörde büyütülmüştür. Hücreler 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda büyütülüp, %70 oranında yoğunluğa ulaştıktan sonra %1'lik tripsin/EDTA ile kaldırılmışlardır. Deneyler için kaldırılan hücreler medyum içinde süspanse edilerek Thoma lamında tripan mavisi ile en az 3 kere sayılmışlardır.

2.3.2. Sitotoksisite deneyleri

2.3.2.1. MTT canlılık testi ile mitokondriyal aktivite belirlenmesi

MTT testi hücre canlılığını belirlemede sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, suda çözülebilir bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin tetrazolyum halkasının canlı hücre mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimiyle kırılmasıyla suda çözünmeyen mor formazanlara dönüşüm prensibine dayanmaktadır (Abe ve Matsuki 2000; Fotakis ve Timbrell 2006).

MTT deneylerinde Mosmann'ın (1983) kullandığı yöntem uygulanmıştır. F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücreleri medyum içinde süspanse edilerek 100 µl'de sırasıyla 2×10^3 , 2×10^3 ve 8×10^3 hücre olacak şekilde 96'lık plakanın her bir kuyucuğuna ekilmiştir. Hücreler ekimden sonra ortama uyum sağlayabilmeleri için 24 saat için inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda plakalara test maddeleri eklenmiştir ve hücrelerin maddelere 24, 48 ve 72 saat süre maruz kalması sağlanmıştır. F2408 ve 5RP7 hücreleri için karvakrolün 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400µM, 500µM, 600µM, 800 µM dozları, U-2 OS hücreleri için ise 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 400 µM, 600 µM, 800 µM dozları kullanılmıştır. Ayrıca U-2 OS hücrelerinde sisplatinin 10 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 40 µM dozları ile 5-FU'in ise 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM ve 2,5 mM dozları kullanılmıştır. Hücrelerin maddeler ile muamelesi sonunda plakalardan medyum uzaklaştırılmıştır. Final konsantrasyonu 5mg/ml olacak şekilde medyum ile hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 125 µl eklenerek hücreler 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra plakadaki MTT medyum solüsyonu da uzaklaştırılıp, canlı hücrelerin oluşturduğu formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl DMSO eklenmiştir. Plakalar 15 dakika için plaka çalkalayıcıya (GFL-3012) bırakılmış ve plakaların OD değerleri ELISA (ELx808-IU) cihazında 570nm dalga boyunda okutulmuştur. MTT deneyleri her bir doz için 4-8 kuyucuk olmak üzere en az 3 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.2.2. Nötral kırmızısı (NR) alım testi ile lizozomal aktivite belirlenmesi

Hızlı kolorimetrik bir yöntem olan NR testi nötral kırmızısı boyasının canlı ve sağlıklı hücrelerin lizozomlarında birikmesi prensibine dayanmaktadır. Hücre yüzeyinin ya da hassas lizozomal zarın hasar görmesi NR alımını ve bağlanmasını azaltmaktadır. Bu sayede canlı sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri ayırt edebilmek mümkün olmaktadır (Babich ve Borenfreund 1991; Chiba ve ark. 1998; Komissarova ve ark. 2005; Fotakis ve Timbrell 2006; Repetto ve ark. 2008).

Nötral kırmızısı deneyleri NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) tarafından hazırlanan protokole göre gerçekleştirilmiştir. F2408, 5RP7

ve U-2 OS hücreleri sırasıyla medyum içinde süspanse edilerek 100 µl'de sırasıyla 2×10^3 , 2×10^3 ve 8×10^3 hücre olacak şekilde 96'lık plakanın her bir kuyucuğuna ekilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra plakalara test maddeleri eklenmiş ve 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz kalmaları sağlanmıştır. F2408 ve 5RP7 hücreleri için karvakrolün 100 µM, 200 µM, 300 µM, 400 µM, 500 µM, 600 µM ve 800 µM dozları; U-2 OS hücreleri için ise 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 400µM, 600 µM ve 800 µM dozları kullanılmıştır. Hücrelerin karvakrol ile muamelesi sonunda plakalardan medyum uzaklaştırılmıştır. Kuyucukların her biri 100 µl DPBS-A ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa medyum içinde hazırlanmış %1'lik nötral kırmızısından 250 µl eklenmiş ve 3 saat 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonrasında her bir kuyucuk 100 µl DPBS-A ile yıkanıp, canlı hücrelerde oluşan NR kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl DESORB (%1 glasiyal asetik asit, %49 etanol) eklenerek plakalar 15 dakika plaka çalkalayıcıya konulmuştur. Daha sonra ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda plakaların OD değerleri okutulmuştur. NR deneyleri her bir doz için 4-8 kuyucuk olmak üzere en az 3 ayrı deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Akridin Oranj/Ethidyum Bromid (AO/EB) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Akridin oranj ve ethidyum bromid boyaları iyi bilinen DNA interkalatörleridir (Gherghi ve ark. 2003). Akridin oranj hem canlı hem de cansız hücreler tarafından alınmakta ve çift zincirli nükleik aside (DNA) bağlandığında yeşil, tek zincirli nükleik aside (RNA) bağlandığında kırmızı floresans yaymaktadır. Ethidyum bromid ise yalnızca sitoplazmik zar bütünlüğü bozulmuş hücreler tarafından alınmakta ve DNA'ya bağlandığında kırmızı floresans yaymaktadır. Akridin oranj/ethidyum bromid karışımı ile boyama sonucunda floresan mikroskop altında incelenen hücreler canlılıklarına göre farklı ışıma gösterirler. Canlı hücreler normal parlak yeşil çekirdeğe, erken apoptotik hücreler yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatinli parlak yeşil çekirdeğe sahip görünürken, geç apoptotik hücrelerin kırmızı yoğunlaşmış veya fragmente olmuş çekirdeğe sahip oldukları gözlenir. Nekrotik veya ölü hücreler ise yapısal olarak

normal kırmızı veya turuncu çekirdeğe sahiptir (Baskic ve ark. 2006; Wang ve ark. 2007).

AO/EB boyama için Hisham ve arkadaşlarının (2009) kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. F2408, 5RP7, U-2 OS hücreleri 6'lı plakalara sırasıyla 6×10^4 , 6×10^4 , 23×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında F2408, 5RP7 karvakrolün 200 μ M ve 300 μ M dozlarına ve U-2 OS hücreleri ise 150 μ M ve 250 μ M dozlarına 48 saat maruz bırakılmışlardır. Ayrıca U-2 OS hücreleri pozitif kontrol olarak sisplatinin 30 μ M ile 20 μ M ve 5-FU'in 2 mM ile 1 mM dozlarıyla 24 saat muamele edilmiştir. Maddelerle inkübasyon sonrası her bir kuyudaki hücreler tripsin/EDTA ile kaldırılarak 1 ml medyum içerisinde toplanmış ve 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında medyum aspirasyonla uzaklaştırılmış ve üzerine 25 μ l medyum eklenerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Diğer yandan 100 mg/ml akridin oranj ve 100 mg/ml ethidium bromid 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan boya solüsyonundan, 1:9 oranında medyum ile seyreltilerek ara stok hazırlanmıştır. Ara stok akridin oranj/ethidium bromid karışımından 1 μ l alınıp hazırlanan hücre süspansiyonuna eklenmiştir. Hızlı bir şekilde hücreler preparat haline getirilerek ilk 10 dakika içinde floresan mikroskopta (Olympus BX50) FITC filtre kullanılarak görüntülenmiştir. Çekilen fotoğraflardaki hücreler incelenerek aşağıdaki formülasyona (Duke 2004) göre apoptotik indeks belirlenmiştir.

$$\text{Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi} = \frac{LA+DA}{LN+LA+DN+DA} \times 100$$

LN: Normal çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücreler

LA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak yeşil canlı hücreler

DN: Normal çekirdeğe sahip parlak kırmızı veya turuncu ölü hücreler

DA: Apoptotik çekirdeğe sahip parlak kırmızı veya turuncu ölü hücreler

2.3.4. U-2 OS hücrelerinde MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesinin RT²-PCR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) plaka analizi

Karvakrolün U-2 OS hücrelerindeki etkisi, moleküler seviyede MAPK sinyal yolağında rolü olan genlerin ifade edilip edilmemesi seviyesinde RT²-PCR

plaka yöntemiyle yolağa özgü 96-kuyucuklu hazır plakalar kullanılarak araştırılmıştır. Tüm deneyler kitlerin sağlandığı firmanın (Qiagen) protokolüne göre yapılmıştır. Deneylerde RNaz ve DNaz içermeyen su kullanılmış ve cam malzemeler RNaz içermeyecek şekilde muamele edilmiştir. Deneylerin tüm aşamaları steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

2.3.4.1. RNA izolasyonu

U-2 OS hücreleri 200 μ M karvakrol ile 24 saat inkübe edildikten sonra 8×10^6 hücre olacak şekilde mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra 600 μ l liziz tamponu (RLT) ve 6 μ l β -Mercapto etanol eklenmiştir. Hücre lizati homojenize olması için lizat QIAshredder homojenizer kolona aktararak 14000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek homojenize edilmiştir. Lizat üzerine eşit hacimde %70 etanol eklenip, dikkatlice pipetleyerek karıştırılmıştır. Örnekler RNeasy spin kolonlara aktarılıp, 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmişlerdir. Böylece lizatin spin kolona bağlanması sağlanmış ve toplama tüpünün dibine toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Kolon üzerine 350 μ l yıkama tamponu (RW1) eklenerek 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilip, dipte toplanan sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Bir mikrosantrifüj tüpüne her bir örnek için DNaz I seti içindeki 70 μ l RDD tampona 10 μ l DNaz I stok solüsyonu eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Hazırlanan 80 μ l DNaz I inkübasyon karışımı RNeasy spin kolonların üzerine aktararak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 350 μ l yıkama tamponu (RW1) eklendikten sonra kolonlar 12000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonlar iki kez de 500 μ l RPE tamponu ile yıkanmıştır. Kurutma işlemi için kolonlar yeni bir toplama tüpüne alınarak 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmişlerdir. RNA elüsyonu için kolonlar 1,5 ml'lik kapaklı mikrosantrifüj tüpüne alınmışlardır ve kolon üzerine 50 μ l su eklendikten sonra 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmişlerdir. Kolon üzerine 30 μ l su eklenerek işlem tekrarlanmıştır. RNA elüsyon işleminde RNA moleküllerinin su ile kolon filtresinden yıkanarak mikrosantrifüj tüpüne toplanmasını sağlamıştır.

2.3.4.2. RNA miktarı ve saflığının belirlenmesi

RNA miktarı ölçmek ve RNA saflığını kontrol etmek amacıyla Nanodrop spektrofotometre (ND-1000) kullanılmıştır. Doğru ölçüm yapabilmek için öncelikle cihazın probu distile su ile temizlenmiştir. Cihazın bilgisayardaki programı açılarak RNA ölçümleri için kullanılan **RNA-40** seçilmiştir. Proba 2 µl RNaz içermeyen su aktarılıp kör işlemi gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra RNA örneklerinden 2 µl proba yüklenerek ölçümler yapılmıştır. Cihazdan okunan RNA miktarlarından stok RNA miktarları hesaplanmıştır. Saf bir RNA'nın 260/280 nm absorbansının 1,8 ve 2,1 arasında ve 260/230 nm absorbansının 1,7'den yüksek olması gerekmektedir. Bu koşullara uyan RNA örnekleriyle diğer deneylere devam edilmiştir.

2.3.4.3. Agaroz jel elektroforezi ile RNA kalitesinin belirlenmesi

Agaroz jel elektroforezi için Sambrook ve arkadaşlarının (1989) oluşturduğu protokol değiştirilerek uygulanmıştır. Elektroforez için gerekli olacak tüm cam malzemeler %0,1 DEPC içeren suda bir gece bekletilmiştir. Sonrasında malzemeler ultra saf suyla durulanıp otoklav ile steril edilmiştir. Tüm kullanılan solüsyonlar DEPC ile muamele edilmiş su ile hazırlanmıştır.

İlk olarak 5X-formaldehit jel yürütme tamponu (0,1 M MOPS, 40 mM sodyum asetat, 5 mM EDTA) hazırlanmış ve tampon steril filtreden geçirildikten sonra ışıktan korumak için alimünyum folyoyla sarılmıştır. Daha sonra %1'lik agaroz jel hazırlamak için 0,45 gram agaroz 19 ml DEPC ile muamele edilmiş su eklenerek mikrodalgada agarozun çözünmesi sağlanmıştır. Karışım biraz soğutulduktan sonra karışıma 5,5 ml formaldehit, 6 ml 5X-formaldehit jel yürütme tamponu eklenerek karıştırılmış ve dikkatli bir şekilde tank yatağına dökülmüştür. Jelin donması beklenirken RNA örnekleri hazırlanmıştır. Her bir RNA örneği için bir mikrosantrifüj tüpüne 4 µl RNA, 2 µl 5X-formaldehit jel yürütme tamponu, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid eklendikten sonra tüpler 15 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler buza batırılmış ve 1-2 dakika sonra 5 saniye santrifüj edilmiştir. Hazırlanan RNA örneklerinin her birine 1 µl ethidyum bromid ve 1,5 µl yükleme tamponu (%50 gliserol, 1 mM

EDTA %0,25 bromofenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol) eklenmiştir. Örnekler yüklemeye hazırlandıktan sonra donmuş olan jelden tarak çekildikten sonra jel tanka yerleştirilmiştir. 5X-formaldehit jel yürütme tamponunun DEPC ile muamele edilmiş su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 1X-formaldehit jel yürütme tamponu tanka dökülmüştür. Örneklerin jele yüklenmesinden önce 5 dakika elektroforez çalıştırılmış ve ön yürütme yapılmıştır. Daha sonra RNA örnekleri kuyucuklara dikkatlice yüklenmiş ve 70 V'da 2 saat boyunca elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında jel UV transimilatör cihazında (M02 4611) görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

2.3.4.4. RT² RNA QC (Kalite kontrol) PCR plakası ile RNA saflığı ve kalitesinin kontrolü

RT²RNA QC PCR Array, RT²ProfillerTM PCR plakaları ile gen ifadesi analizleri öncesinde 12 adet RNA örneğinin eş zamanlı olarak kalitesinin değerlendirilmesi için geliştirilen bir yöntemdir. Hazır olarak sağlanan plaka (Qiagen) RNA bütünlüğü, reverz transkripsiyon inhibitörü, PCR amplifikasyon inhibitörü, genomik DNA kontaminasyonu ve genel DNA kontaminasyonu kontrollerini içermektedir (Çizelge 2.1). Bu yöntem için firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır.

Çizelge 2.1. RT² RNA QC PCR plakasının yerleşim planı

SAMPLE			↓ 96-well →		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12	
			384-well ↓		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
cDNA template	A	A	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		B	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1	HK1
	B	C	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		D	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2	HK2
	C	E	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		F	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC
	D	G	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		H	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC
	E	I	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		J	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC	GDC
RNA	F	K	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		L	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	NRT	
H ₂ O	G	M	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		N	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC		
	H	O	1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5		1 3 5	
		P	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	

A satırı: Yüksek ifade seviyeli house keeping genlerin kontrolü (HK1)

B satırı: Düşük ifade seviyeli house keeping genlerin kontrolü (HK2)

C satırı: Reverz transkripsiyon kontrolü (RTC)

D satırı: Pozitif PCR kontrolü (PPC)

E satırı: Genomik DNA kontrolü (GDC)

F satırı: Reverz transkripsiyon yokluğunun kontrolü (NRC)

G satırı: Deneyisel bir kalıp olmaksızın PCR kontrolü (PPC)

H satırı: Kalıp yokluğunun kontrolü (NTC)

RT² RNA QC PCR plakasına yüklenmek üzere 12 RNA örneğinin her biri için 1,5 ml'lik santrifüj tüpleri içinde 3 ayrı kokteyl hazırlanmıştır. Kokteyller kuyucuklara 25 µl olacak şekilde aktarılmışlardır. Herhangi bir kontaminasyon olmaması için her bir kuyucuk için yeni bir RNaz ve DNaz içermeyen pipet ucu kullanılmıştır. Kokteyllerin içerikleri aşağıdaki gibidir:

Kokteyl 1 (Master karışımı ve kalıp) aşağıdaki gibi hazırlanmış ve A satırından E satırına kadar olan kuyulara aktarılmıştır.

2X SABiosciencesTM PCR master karışım 75 µl

Seyreltilmiş cDNA sentez reaksiyonu 6 µl

RNaz DNaz içermeyen su 69 µl

Toplam hacim 150 µl

Kokteyl 2 (Sadece master karışımı) aşağıdaki gibi hazırlanmış ve G ve H satırlarındaki kuyulara aktarılmıştır.

2X SABiosciences™ PCR master karışımı	45 µl
RNaz ve DNaz içermeyen su	45 µl
Toplam hacim	90 µl

Kokteyl 3 (RNA içeren master karışımı) aşağıdaki gibi hazırlanmış ve F satırındaki kuyulara aktarılmıştır.

2X SABiosciences™ PCR master karışımı	13 µl
Toplam RNA'nın 1:100 dilüsyonu	1 µl
RNaz ve DNaz içermeyen su	13 µl
Toplam hacim	27 µl

Tüm kuyulara kokteyl aktarılma işlemi bittikten sonra plakanın üzeri özel kapaklarıyla kapatılmıştır. Kuyucuklarda oluşan kabarcığın giderilmesi ve kokteylin dibe inmesini sağlamak için plaka 250 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak plaka RT-PCR (Mx3005P) cihazına yerleştirilmiştir. RT-PCR cihazının bağlı olduğu MxPro programında termal profil Çizelge 2.2'deki gibi ayarlandıktan sonra reaksiyon başlatılmıştır.

Çizelge 2.2. RT PCR termal profili

Segment 1	1 döngü	95 °C de 10 dk
Segment 2	40 döngü	95 °C de 15 sn, 60 °C de 1 dk
Segment 3	1 döngü	95 °C de 1dk, 55 °C de 30 sn, 95 °C de 30 sn

2.3.4.5. RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi (Reverz Transkripsiyon)

cDNA sentezi, firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Her bir RNA örneği için PCR tüpüne 2 µg RNA, 2 µl GE (genomik DNA eliminasyon tamponu) eklenmiş ve hacim 10 µl'ye suyla tamamlanarak genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım hafifçe pipetlenerek 42°C'de 5

dakika süre için inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir örneğe ait genomik DNA temizleme karışımı en az 1 dakika buzda tutulmuştur. Bu sırada PCR tüpüne her bir reaksiyon için 4 µl BC3 (5X RT Tampon 3), 1 µl P2 (Primer ve External Kontrol Karışımı), 2 µl RE3 (RT Enzim Karışımı 3) ve 3 µl su eklenerek RT kokteyli hazırlanmıştır. Genomik DNA eliminasyon karışımı üzerine 10 µl RT kokteyli eklenerek örnekler 42°C’de 15 dakika inkübe edilmiş ve hemen ardından 95 °C’de 5 dakika bekletilerek reaksiyon durdurulmuştur. Her bir cDNA sentez reaksiyonuna 91 µl su eklenmiştir. Elde edilen cDNA plakalara yüklenene kadar buzda bekletilmiştir.

2.3.4.6. RT²-PCR MAPK sinyal yolağı plaka analizi

RT-PCR için, insan MAPK sinyal yolağı ile ilgili 84 gen ve 12 kontrol için primerler içeren RT² PCR plakaları (Çizelge 2.3) Qiagen firmasının önerdiği protokol uygulanarak hazırlanmıştır. Öncelikle tüm reaktifler 10-15 saniye santrifüjlenmiştir. Daha sonra yüklenmek üzere rezervuar içinde her bir plaka için RT²X qPCR SYBR green master karışımından 1350 µl, 102 µl cDNA sentez reaksiyonu ve 1248 µl su dikkatlice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım çokkanallı pipetör yardımıyla plakanın her bir kuyucuğuna 25 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Her kuyucuk için pipet ucu değiştirilmiştir. Daha sonrakuyuların üzeri özel kapaklarıyla kapatılmış ve kuyucuklarda herhangi bir kabarcık kalmaması için plaka 250 g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Plaka RT-PCR cihazına yerleştirilerek MxPro programında termal profil Çizelge 2.2.’de gösterildiği şekilde ayarlanmış ve reaksiyon başlatılmıştır.

İnsan MAPK sinyal yolağı RT² PCR plakası ile analiz edilebilen 84 gen ve kontroller aşağıda gösterildiği gibidir:

MKKK: *ARAF, BRAF, DLK1, MAP3K1 (MEKK1), MAP3K2 (MEKK2), MAP3K3 (MEKK3), MAP3K4 (MEKK4), MAP4K1 (HPK1), MOS, MST1, PAK1, RAF1.*

MKK: *MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2), MAP2K3 (MEK3), MAP2K4 (Mkk4, JNKK1), MAP2K5 (MEK5), MAP2K6 (MKK6), MAP2K7 (JNKK2).*

MAPK: *MAPK1 (ERK2, MAPK1), MAPK3 (ERK1), MAPK6 (ERK3), MAPK7 (ERK7), MAPK8 (JNK1), MAPK9 (JNK2), MAPK10 (JNK3), MAPK11 (p38bMAPK), MAPK12 (p38gMAPK), MAPK13, MAPK14 (p38 MAPK).*

Aktive Olmuş Transkripsiyon Faktörleri: *ATF2 (Creb-2), CREB1, CREBBP (CBP), EGFR, ELK1, ETS1, ETS2, JUN, MAPKAPK2, MAPKAPK3, MAX, MEF2C, MKNK1, MYC, NFATC4 (NFAT3), PRDX6 (AOP2), SMAD4 (MADH4/DPC4), TP53 (p53).*

İfadesi Uyarılan Genler: *COL1A1 (Collagen I), EGR1, FOS, HSPA5 (Grp78), HSPB1 (Hsp27), JUN, MYC, TP53.*

Raf Regülasyon Proteinleri: *HRAS, KRAS, KSR1, MAP2K1, MAP2K2, NRAS.*

MEKK1 Etkileşim Proteinleri: *CDC42, CHUK (IKK-a), GRB2, HRAS, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAP2K7, MAP4K1, MST1, NRAS, RAC1, SFN (14-3-3, Stratifin).*

Katlanma/ Bağlanma: *LAMTOR3 (MP1), MAP3K1, MAPK8IP2 (JIP-1).*

Erk1/2 Yolağıyla Regüle Edilen Hücre Döngüsü Proteinleri: *CCNA1 (CyclinA1), CCNA2 (CyclinA), CCNB1 (CyclinB1), CCNB2 (CyclinB2), CCND1 (CyclinD1), CCND2 (CyclinD2), CCND3 (CyclinD3), CCNE1 (CyclinE1), CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CDKN1B (p27kip1), CDKN1C (p57kip2), CDKN2A (Ind4a, p16ink4), CDKN2B (Ind4b, p15ink2b), CDKN2C (Ind4c, p18cdk4 inhibitor) CDKN2D (Ind4d, p19ink4d), E2F1, RB1.*

Kontroller: *B2M (Beta-2-mikroglobulin), HPRT1 (Hipoksantin fosforiboziltransferaz 1), RPL13A (Ribozomal protein L13a), GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz), ACTB (Aktin, beta), HGDC (İnsan Genomik DNA Kontaminasyon Kontrolü), 3 kuyucuk RTC (Reverz Transkripsiyon Kontrolü), 3 kuyucuk PPC (Pozitif PCR Kontrolü).*

Çizelge 2.3. İnsan MAPK sinyal yolağı RT² PCR plakasının yerleşim planı

ARAF A01	ATF2 A02	BRAF A03	CCNA1 A04	CCNA2 A05	CCNB1 A06	CCNB2 A07	CCND1 A08	CCND2 A09	CCND3 A10	CCNE1 A11	CDC42 A12
CDK2 B01	CDK4 B02	CDK6 B03	CDKN1A B04	CDKN1B B05	CDKN1C B06	CDKN2A B07	CDKN2B B08	CDKN2C B09	CDKN2D B10	CHUK2 B11	COL1A1 B12
CREB1 C01	CREBB P C02	DLK1 C03	E2F1 C04	EGFR C05	EGR1 C06	ELK1 C07	ETS1 C08	ETS2 C09	FOS C10	GRB2 C11	HRAS C12
HSPA5 D01	HSPB1 D02	JUN D03	KRAS D04	KSR1 D05	MAP2K1 D06	LAMTOR3 D07	MAP2K2 D08	MAP2K3 D09	MAP2K4 D10	MAP2K5 D11	MAP2K6 D12
MAP2 K7 E01	MAP3K 1 E02	MAP3K2 E03	MAP3K3 E04	MAP3K4 E05	MAP4K1 E06	MAPK1 E07	MAPK10 E08	MAPK11 E09	MAPK12 E10	MAPK13 E11	MAPK14 E12
MAPK 3 F01	MAPK6 F02	MAPK7 F03	MAPK8 F04	MAPK8IP 2 F05	MAPK9 F06	MAPKAP K2 F07	MAPKAPK 3 F08	MAX F09	MEF2C F10	MKNK1 F11	MOS F12
MST1 G01	MYC G02	NFATC4 G03	NRAS G04	PAK1 G05	PRDX6 G06	RAC1 G07	RAF1 G08	RB1 G09	SFN G10	SMAD4 G11	TP53 G12
B2M H01	HPRT1 H02	RPL13A H03	GAPDH H04	ACTB H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

2.3.4.7. RT²-PCR plaka sonuçlarının analizi

Deneyden elde edilen sonuçlar ilk olarak RT-PCR cihazının bağlı olduğu “MxPro” programında “Results” kısmında analiz edilmiştir. Bu yapılan düzenlemeler aşağıda sırasıyla belirtildiği gibidir:

1. Analiz sayfasından ilk olarak “Analysis Selection/Setup” seçilerek “Analysis Term Settings”den “Adaptive Baseline” kaldırılmıştır.
2. “Results” sayfası açılarak “ROX” seçeneği kaldırılmış ve yalnızca “SYBR” seçili kalmıştır.
3. “Toolbar: Options: Analysis Term Settings” açılmış ve “start cycle 2”, “through” kısmı da reaksiyonun başladığı döngü sayısından 2 önceki döngü sayısı olarak değiştirilmiştir.
4. “Results: Graph properties: Y axis: Scale: log” olarak seçilmiştir.
5. “Threshold” çizgisi, amplifikasyon plotlarının 3:1’i hizasına getirilerek doz ve kontrollerin threshold değerleri eşitlenmiştir.
6. “Results” sayfasındaki “Text report” seçeneğine gelinerek Well, Well type, threshold (dRn), Ct (dRn), Tm Product 1 (-R’(T)) seçilmiştir.
7. “Toolbar: File: Export Text Report: Export Text Report to Excell” seçilerek sonuçlar excell dosyasına aktarılmıştır.

Yukarıdaki işlemler sonucu elde edilen sonuçlar “www.sabiosciences.com” adresinden “Web-based PCR array data analysis”

programı kullanılarak çevrimiçi analiz ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Analiz sayfası açılarak kullanılan plakanın kodu girilmiş ve excell verileri sisteme yüklenmiştir. Kontrol ve dozlar sistemde işaretlendikten sonra analizleri gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. İstatiksel analiz

Yapılan MTT, NR ve AO/EB deneylerinin sonuçları SPSS programı kullanılarak One-Way ANOVA ile istatiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık seviyesi 0,001 de değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Karvakrolün Normal (F2408) ve H-ras Transform Sıçan Embriyonik (5RP7) Fibroblast Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

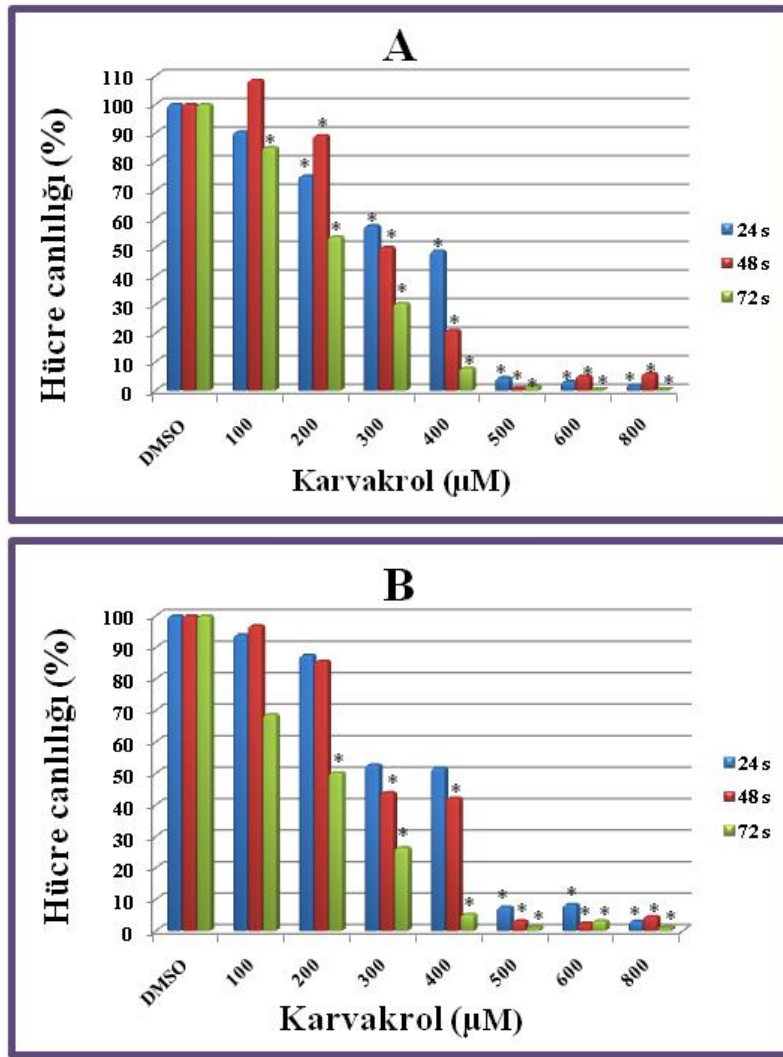
3.1.1. Karvakrolün F2408 ve 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Karvakrolün F2408 ve 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT ve NR yöntemleriyle belirlenmiştir. Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi hücreler karvakrolün belirli dozlarına ve DMSO'ya 24, 48 ve 72 saat sürelerle maruz bırakılmıştır (Şekil 3.1). MTT deney sonuçlarına göre F2408 hücrelerinin 100 μ M karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonunda canlılığı azalmaya başlamış ve 500 μ M karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonunda ise canlılığı bazal seviyeye ulaşmıştır (Şekil 3.1A). 200 μ M karvakrol ile 48 saat sonunda hücre canlılığı azalmaya başlamış ve 500 μ M karvakrol ile 48 inkübasyon sonunda ise canlılık bazal seviyeye ulaşmıştır. 300 μ M 24 ve 48 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. 100 μ M karvakrol ile 72 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı azalmaya başlamış ve 400 μ M karvakrol ile 72 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı önemli oranda azalmıştır. 200 μ M 72 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.

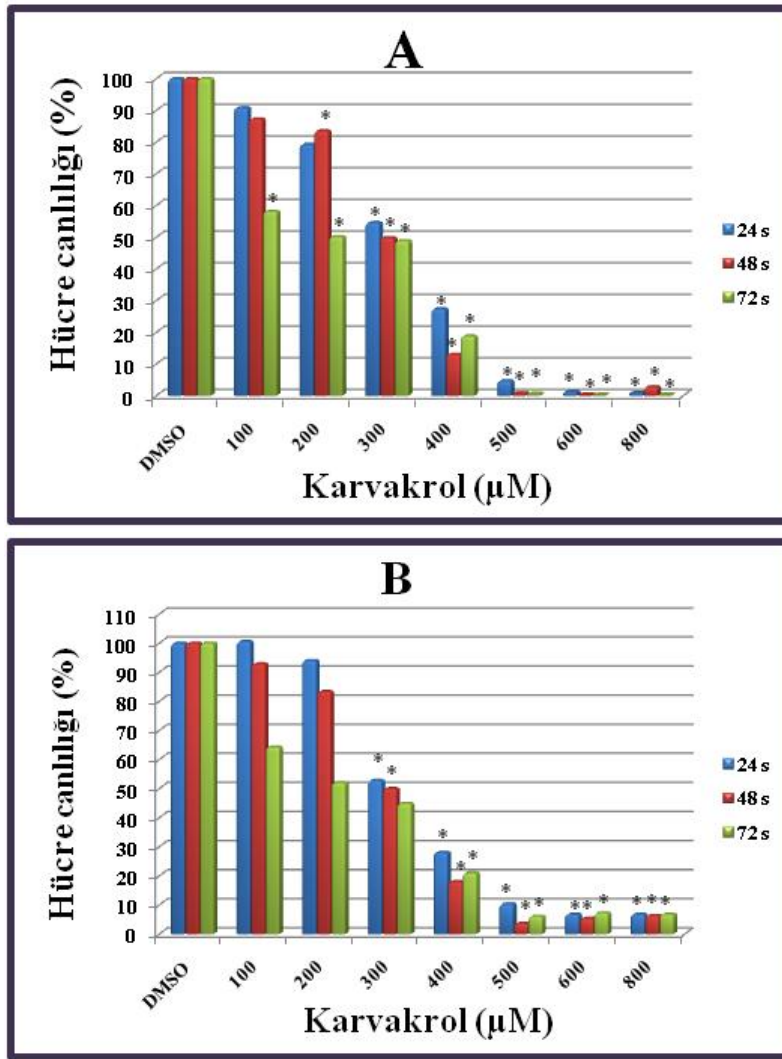
NR deney sonuçlarına göre 100 μ M karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda F2408 hücrelerin canlılığı azalmaya başlamıştır (Şekil 3.1B). 500 μ M karvakrol ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda ve 400 μ M karvakrol ile 72 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı önemli derecede azalmıştır. 300 μ M 24 ve 48 saat için, 200 μ M ise 72 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.

Karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan 5RP7 hücrelerin MTT deneyine göre canlılık oranları Şekil 3.2A'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre 5RP7 hücrelerinin 100 μ M karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda canlılığı azalmaya başlamış olup, 500 μ M karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda hücrelerin canlılığı büyük oranda azalmıştır. 300 μ M 24 ve 48 saat için, 72 saat için ise 200 μ M yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.

Karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılan 5RP7 hücrelerin NR alım deneyine göre canlılık oranları Şekil 3.2B’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 5RP7 hücrelerinin 200 μM karvakrol ile 24 saat inkübasyon sonunda ve 100 μM karvakrol ile 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda canlılığı azalmaya başlamıştır. 500 μM karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücreler büyük oranda canlılığını kaybetmiştir. 300 μM 24 ve 48 saat için, 200 μM ise 72 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.



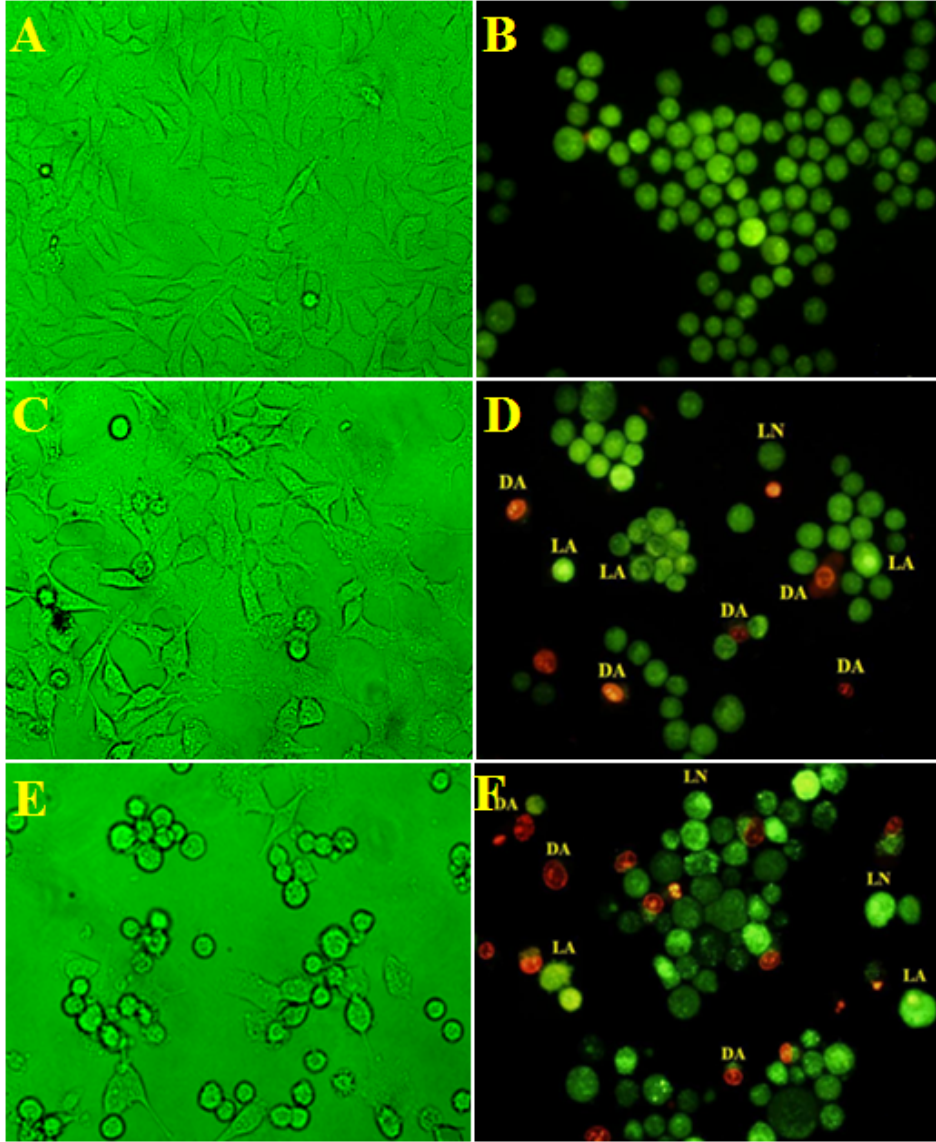
Şekil 3.1. Karvakrolün F2408 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT (A) ve NR alım testi (B) ile değerlendirilmesi. DMSO: Çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$



Şekil 3.2. Karvakrolün 5RP7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT(A) ve NR alınımlı testi (B) ile değerlendirilmesi. DMSO: Çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$

3.1.2. F2408 ve 5RP7 hücrelerinde apoptotik morfoloji

Materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi F2408 ve 5RP7 hücreleri IC_{50} dozu olan 300 µM ve bir alt dozu olan 200 µM karvakrol ile 48 saat maruz bırakılmışlardır. Karvakrol ile inkübasyon sonrasında hücreler plakadan kaldırılmadan önce ters-faz mikroskopta ve AO/EB çift boyamadan sonra ise floresan mikroskopta incelenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4).



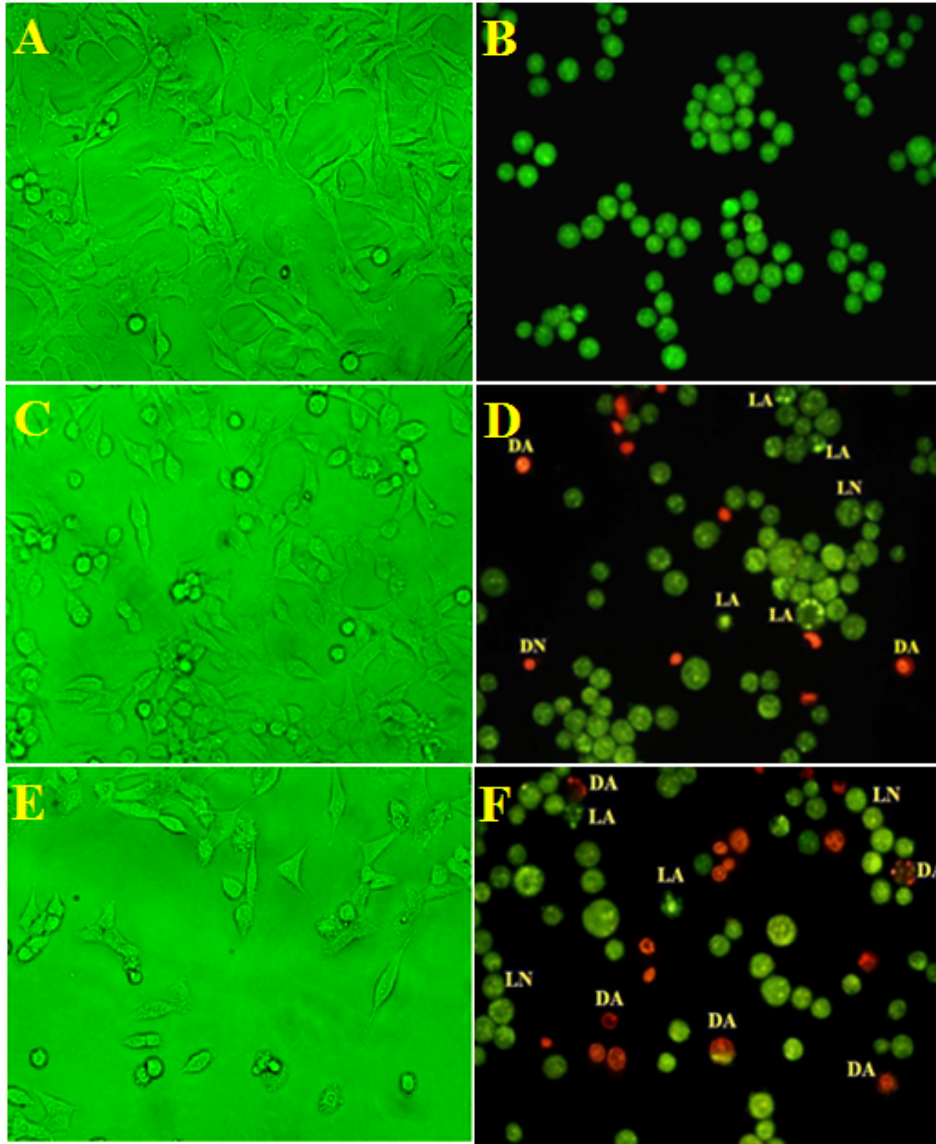
Şekil 3.3. Karvakrolün F2408 hücrelerinin morfolojisine etkisi. %0,1 DMSO ile muamele edilen hücrelerin ters-faz (A) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (B) görüntüsü. 200 µM karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (C) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (D) görüntüsü. 300 µM karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (E) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (F) görüntüsü. LA: Erken apoptotik hücre, DA: Geç apoptotik hücre, DN: Ölü hücre, LN: Normal hücre, Büyütme oranı: 400X

Ters faz mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol grubundaki F2408 ve 5RP7 hücrelerinin birbirlerine benzer şekilde fibroblast tipi morfolojiye sahip oldukları, plaka yüzeyine birbiriyle bağlantılı ve homojen bir şekilde yerleştikleri gözlenmiştir. F2408 hücrelerine göre 5RP7 hücrelerinde yuvarlak morfolojiye

sahip çoğalmakta olan hücre miktarının daha fazla olduğu da belirlenmiştir (3.3A ve 3.4B). Karvakrolün ise doza bağlı olarak hücrelerde sayıca azalmaya, adezyon kaybına ve yuvarlak morfolojiye neden olduğu gözlenmiştir (3.3C, E ve 3.4C, E). F2408 ve 5RP7'lere ait AO/EB yöntemiyle elde edilen floresan mikroskop fotoğrafları incelendiğinde, kontrol hücrelerinin büyük oranda normal çekirdekli ve canlı olduğu, karvakrol ile muamele edilen hücrelerin, zar tomurcuklanması, çekirdek yoğunlaşması, çekirdek fragmentasyonu gibi apoptotik morfoloji özellikleri taşıdığı gözlenmiştir. Ayrıca karvakrolün hücrelerin morfolojilerinde oluşturduğu bu etkinin doza bağlı olarak arttığı da belirlenmiştir (3.3B, D, F ve 3.4B, D, F). İncelenen hücreler morfolojilerine göre sınıflandırılmıştır. Kondanse veya fragmente olmuş kromatine sahip, zar tomurcukları olan parlak yeşil renkteki hücreler erken apoptotik hücrelerdir (LA). Geç apoptotik hücreler (DA) yoğunlaşmış veya fragmente olmuş kromatine sahip parlak kırmızı hücrelerdir. Normal çekirdekli nekrotik veya ölü hücreler parlak kırmızı renkte görülmektedir (DN). Normal canlı hücreler ise kromatini eşit bir şekilde dağılmış olan parlak yeşil renkteki hücrelerdir (LN).

Apoptotik hücre yüzdesini belirlemek için, her bir örneğe ait 1000-1500 civarında hücre sayılmış ve apoptotik hücre yüzdesi aşağıdaki formülasyona (Duke 2004) göre hesaplanmıştır.

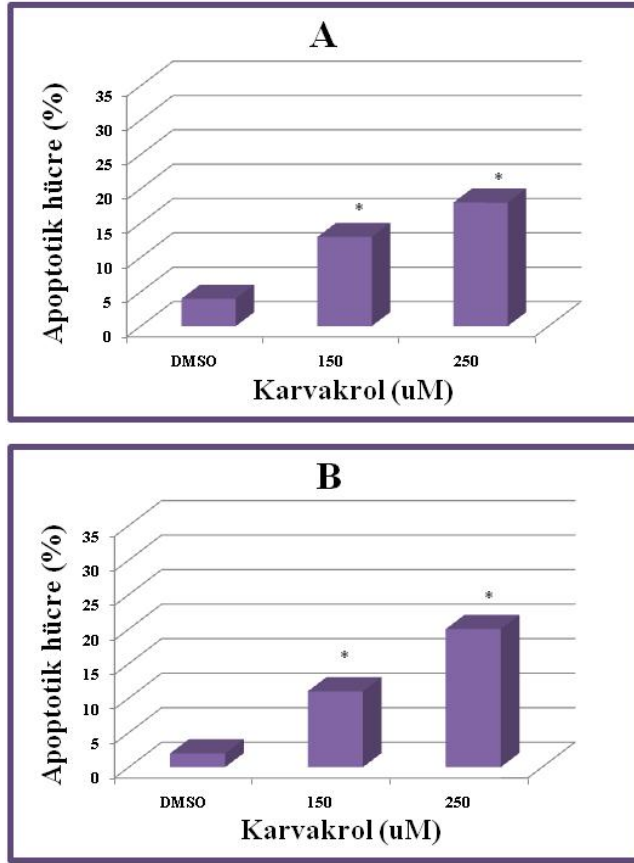
$$\text{Apoptotik Hücrelerin Yüzdesi: } LA+DA/LN+LA+DN+DA \times 100$$



Şekil 3.4. Karvakrolün 5RP7 hücrelerinin morfolojisine etkisi. %0,1 DMSO ile muamele edilen hücrelerin ters-faz (A) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop görüntüsü (B). 200 μ M karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (C) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop görüntüsü (D). 300 μ M karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters faz (E) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (F) görüntüsü. LA: Erken apoptotik hücre, DA: Geç apoptotik hücre, DN: Ölü hücre, LN: Normal hücre, Büyütme oranı: 400X

Her bir örnek için üç ayrı deney ile yukarıdaki formüle göre hesaplanan apoptotik hücre yüzdesinin ortalaması alınarak ortalama apoptotik hücre yüzdesi belirlenmiştir (Şekil 3.5). F2408 hücrelerinde karvakrolün 200 μ M dozundaki apoptotik hücre oranı %13 iken IC₅₀ dozu olan 300 μ M’da %18’dir (Şekil 3.5A).

5RP7 hücrelerinde ise apoptotik hücre oranı 200 μM 'da %11, IC_{50} dozu olan 300 μM 'da %20 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.5B).



Şekil 3.5. Karvakrolün F2408 (A) ve 5RP7 (B) hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre yüzdesi.

DMSO: çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$

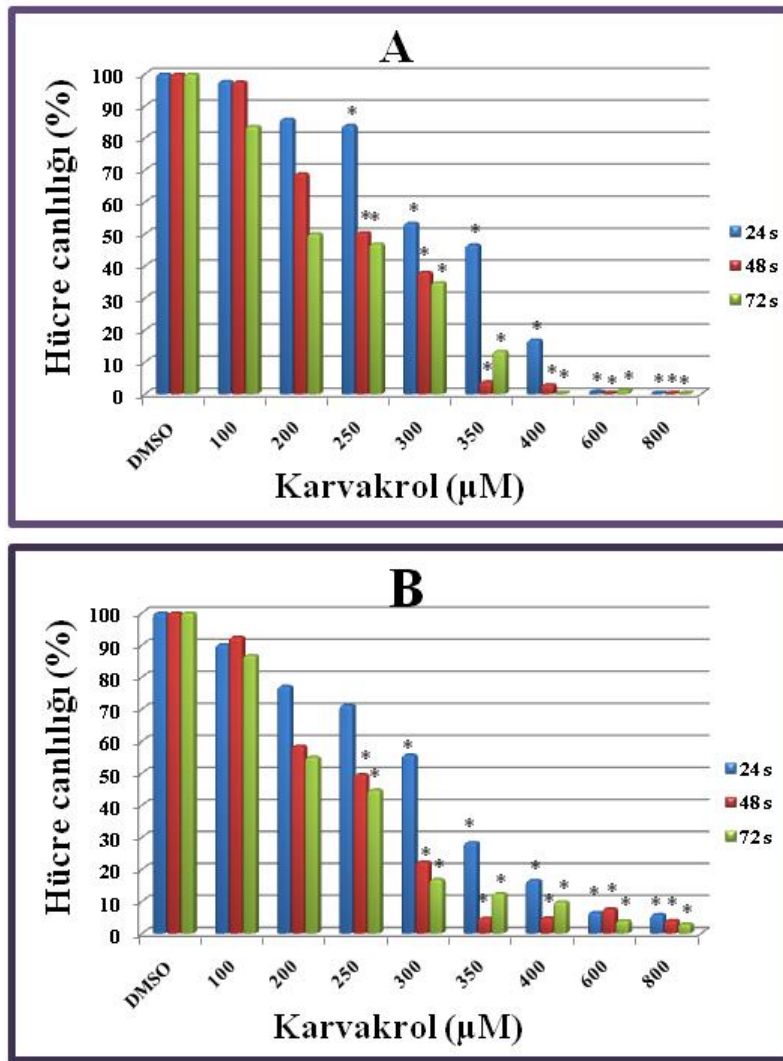
3.2. Karvakrolün İnsan Osteosarkoma Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

3.2.1. Karvakrol, sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Karvakrolün U-2 OS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT ve NR yöntemleriyle araştırılmıştır. Hücreler karvakrolün belirli dozlarıyla 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. MTT deney sonuçlarına göre canlılık oranları Şekil 3.6A'da gösterildiği gibidir. U-2 OS hücrelerinde 100 μM karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra canlılık azalmaya başlamış ve 600 μM

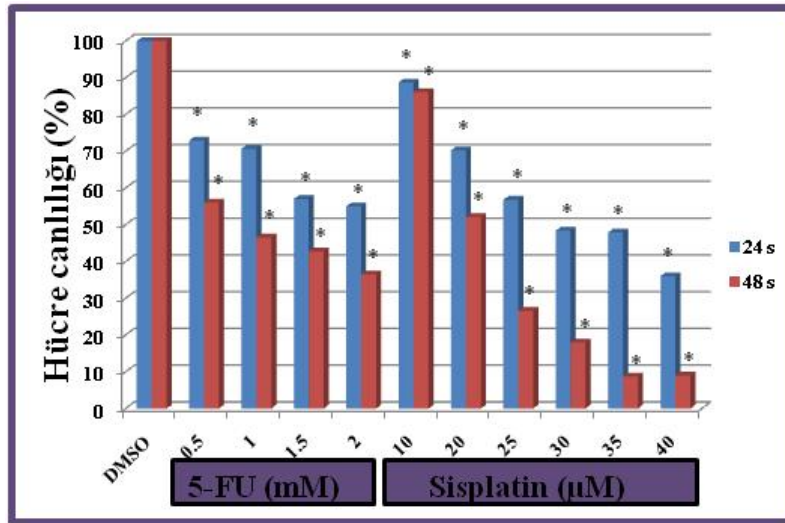
karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra canlılık oranı bazal seviyeye inmiştir. 300 μM 24 saat için, 250 μM 48 saat için ve 200 μM 72 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.

NR deney sonuçlarına göre U-2 OS hücrelerinde belirlenen canlılık oranları Şekil 3.6B’de gösterilmiştir. 100 μM karvakrol ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyondan sonra hücrelerin canlılık oranı azalmaya başlamış ve 600 μM ’da önemli derecede azalmıştır. 300 μM 24 saat için, 250 μM 48 saat için ve 200 μM 72 saat yaklaşık IC_{50} değerleri olarak bulunmuştur.



Şekil 3.6. Karvakrolün U-2 OS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi (A) ve NR alım testi (B) ile değerlendirilmesi. DMSO: çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$

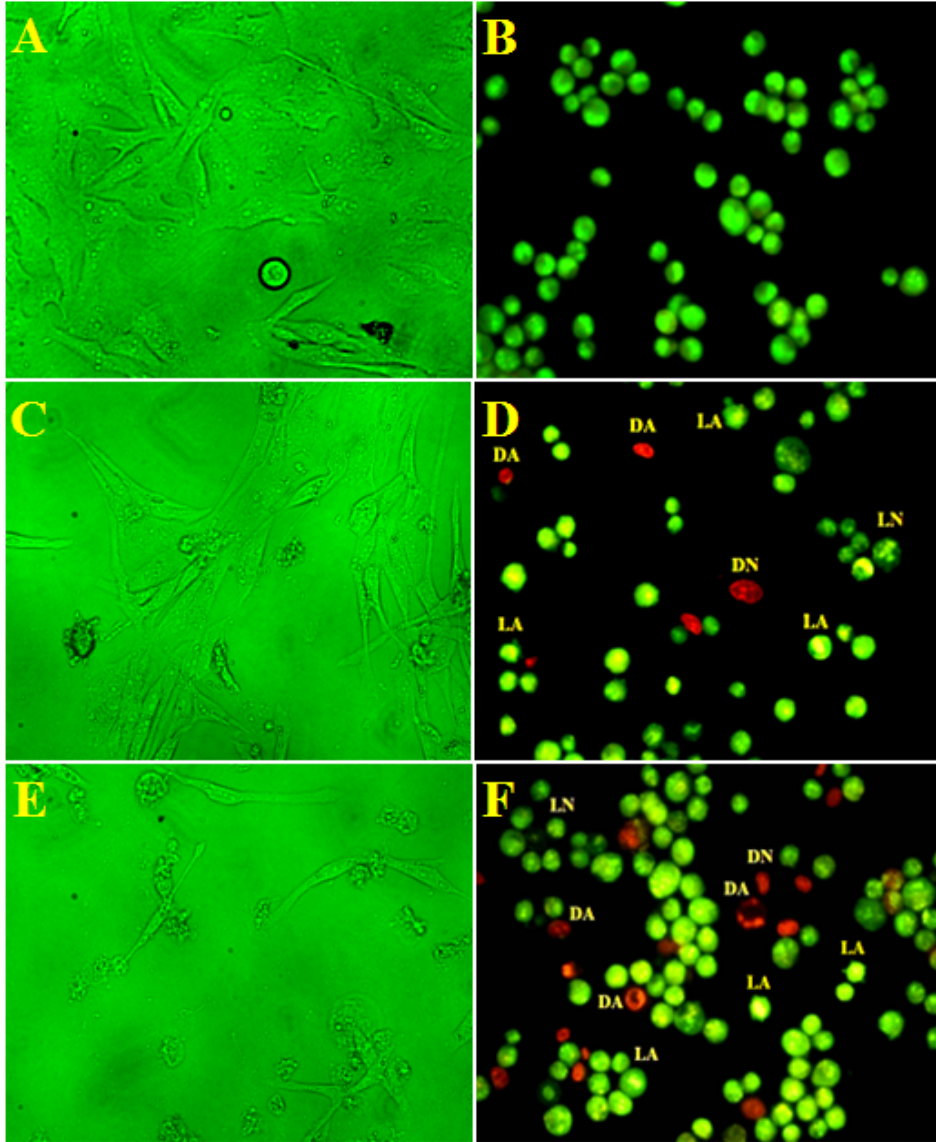
Pozitif kontrol amacı ile sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTT deneyi ile belirlenmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi U-2 OS hücreleri sisplatin ve 5-FU'in belirli dozlarıyla 24 ve 48 saat süreliğine inkübasyona bırakıldıktan sonra canlılık oranları MTT yöntemiyle belirlenmiştir. Şekil 3.7A'da gösterildiği gibi 10 μ M sisplatinle 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra hücrelerin canlılık oranı azalmaya başlamıştır. 30 μ M 24 saat için, 20 μ M 48 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. MTT deney sonuçlarına göre 5-FU ile inkübasyona bırakılan hücrelerin canlılık oranları Şekil 3.7B'de gösterildiği gibidir. 0,5 mM 5-FU ile 24 ve 48 saat maruz bırakılan hücrelerin canlılığında azalma başlamıştır. 2 mM 24 saat için, 1 mM 48 saat için yaklaşık IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin MTT deneyi ile değerlendirilmesi. DMSO: Çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$

3.2.2. U-2 OS hücrelerinde apoptotik morfoloji

Karvakrol, sisplatin ve 5-FU ile muamele edilen U-2 OS hücreleri plakadan kaldırılmadan önce ters-faz mikroskopta ve AO/EB çift boyamadan sonra ise floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu morfolojik etki Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

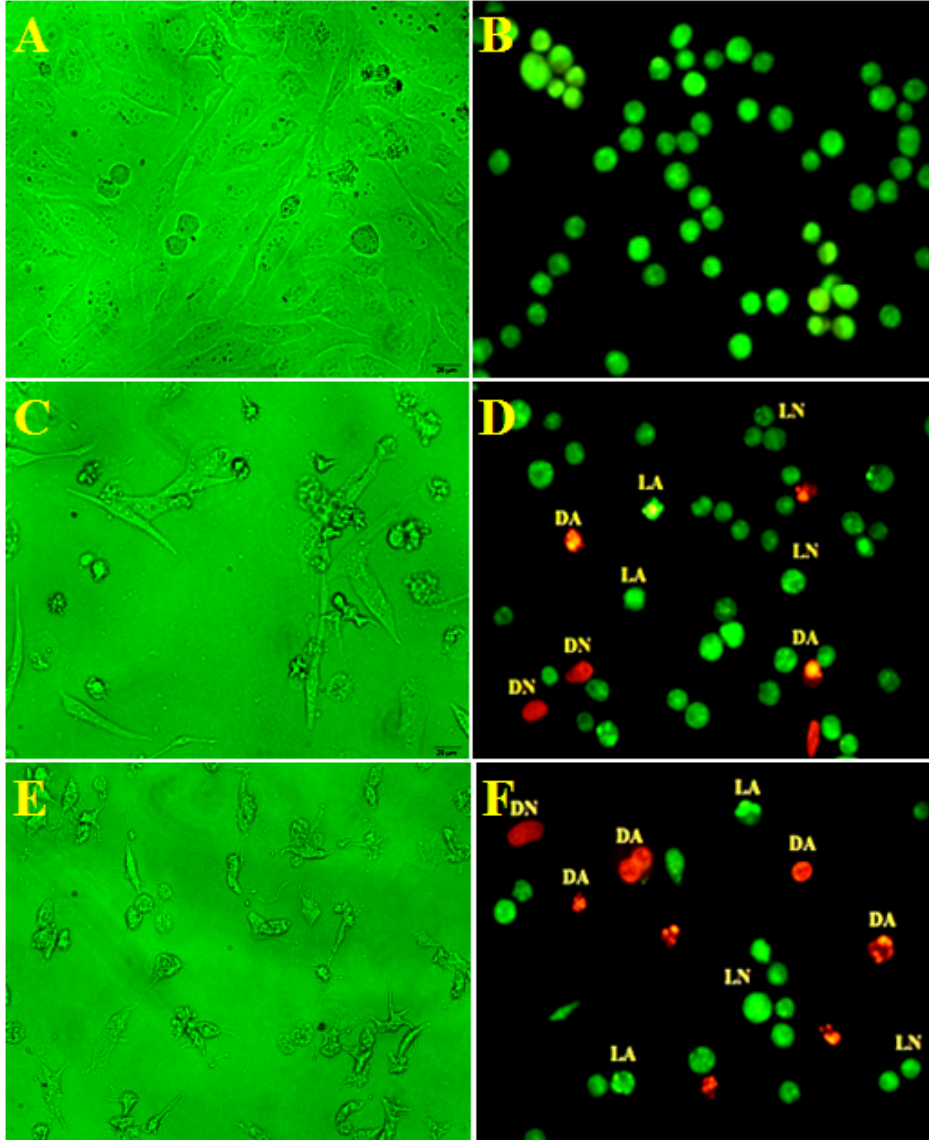


Şekil 3.8. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi. %0,1 DMSO ile muamele edilen hücrelerin ters-faz (A) ve AO/EB boyama ile floresan (B) mikroskop görüntüsü. 150 μ M karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (C) ve AO/EB boyama ile floresan (D) mikroskop görüntüsü. 250 μ M karvakrole maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (E) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (F) görüntüsü. LA: Erken apoptotik hücre, DA: Geç apoptotik hücre, DN: Ölü hücre, LN: Normal hücre, Büyütme oranı: 400X

Ters faz mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerinin epitelyal morfolojije sahip olduğu, plaka yüzeyine birbiriyle bağlantılı ve homojen bir şekilde yerleştikleri, ancak karvakrolün doza bağlı

olarak hücrelerde sayıca azalmaya, adezyon kaybına ve yuvarlak morfolojiye neden olduğu belirlenmiştir (3.8A, C, E). AO/EB boyama yöntemiyle elde edilen floresan mikroskop görüntülerinde ise kontrol hücrelerinin büyük oranda normal çekirdekli ve yeşil renkte olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8B). Karvakrolün IC_{50} ($250\mu M$) ve altındaki bir dozu ($150\mu M$) ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde ise doza bağlı olarak zar tomurcuklanması, parlak kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu gibi apoptotik morfoloji oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 3.8D, F).

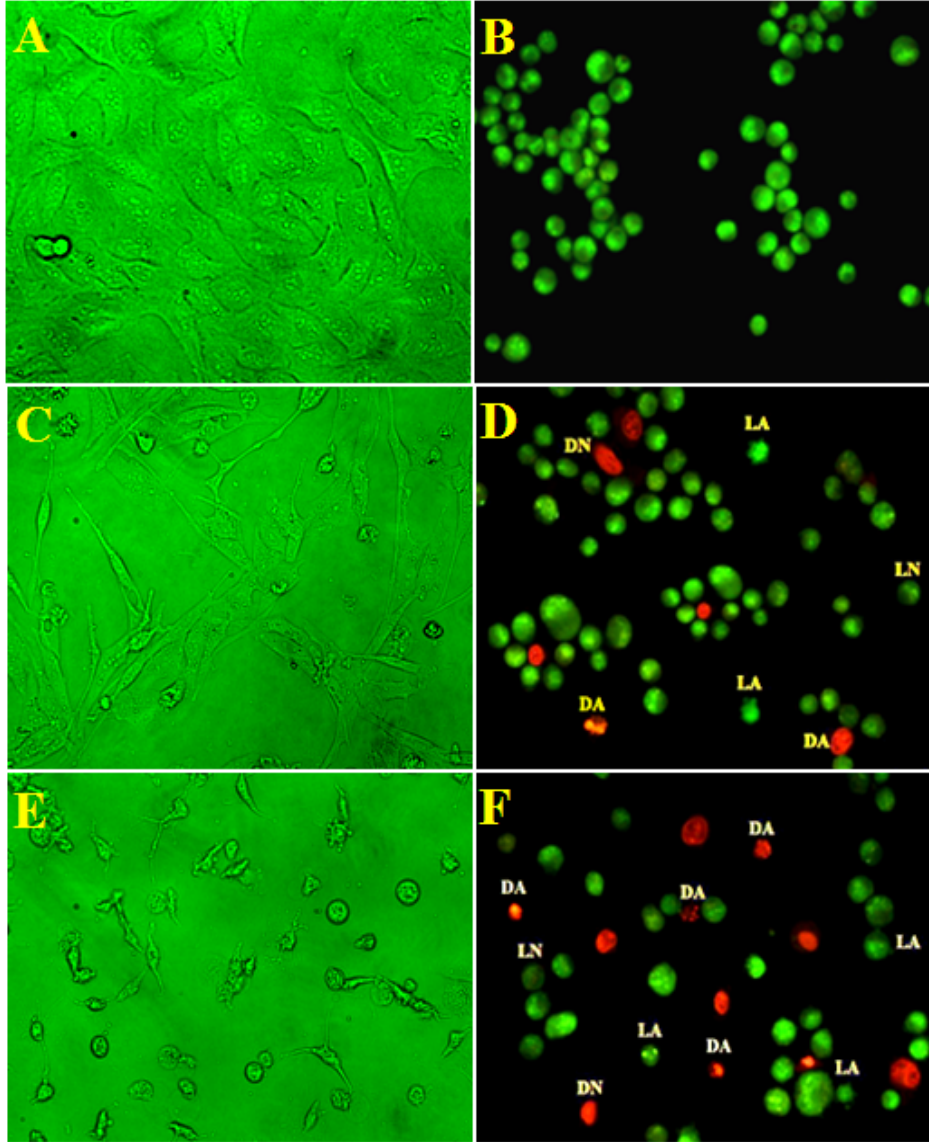
Ayrıca U-2 OS hücreleri pozitif kontrol olarak antikanser ajanlar olan sisplatin (30 ve $20\mu M$) ve 5-FU (1 ve 2 mM) ile inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süreleri sonunda çekilen ters faz mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol grubundaki hücrelerinin epitelyal morfolojiye sahip olduğu, plaka yüzeyine birbiriyle bağlantılı ve homojen bir şekilde yerleştikleri ancak sisplatin ve 5-FU'nin doza bağlı olarak hücrelerde sayıca azalmaya, adezyon kaybına ve yuvarlak morfolojiye neden olduğu gözlenmiştir (3.9A, C, E ve 3.10A, C, E).



Şekil 3.9. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi. %0,1 DMSO ile muamele edilen hücrelerin ters-faz (A) ve AO/EB boyama ile floresan (B) mikroskop görüntüsü. 20 μ M sisplatine maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (C) ve AO/EB boyama ile floresan (D) mikroskop görüntüsü. 30 μ M sisplatine maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (E) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (F) görüntüsü. LA: Erken apoptotik hücre, DA: Geç apoptotik hücre, DN: Ölü hücre, LN: Normal hücre, Büyütme oranı: 400X

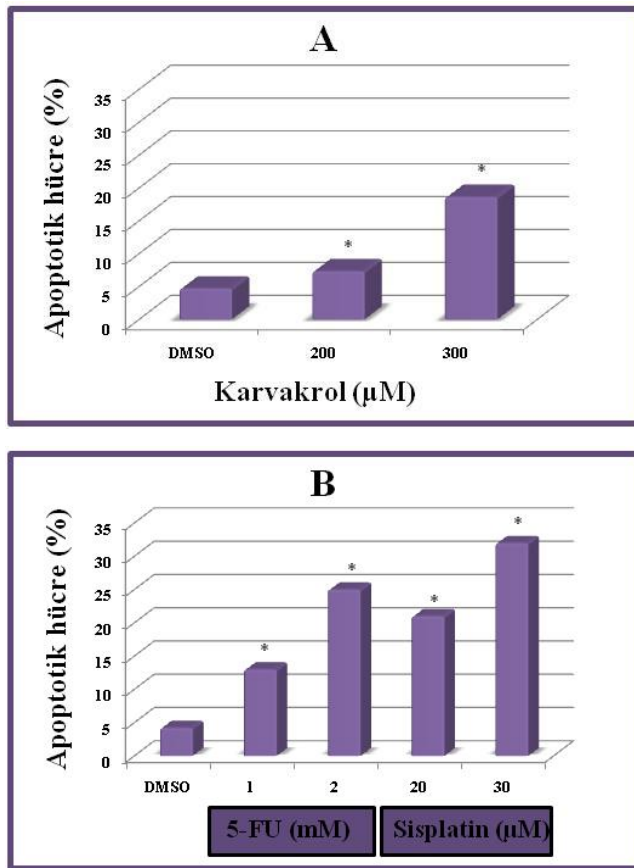
AO/EB boyama yöntemiyle elde edilen floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde kontrol hücrelerinin büyük oranda normal çekirdekli ve yeşil renkte olduğu, karvakrole benzer şekilde sisplatin ve 5-FU maddelerinin de hücrelerde zar tomurcukları, yoğunlaşmış parlak kromatin ve fragmente kromatin

gibi apoptotik morfoloji oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 3.9B, D, F ve 3.10B, D, F). Ayrıca doza bağlı olarak sisplatin ve 5-FU'in U-2 OS hücrelerinde apoptotik morfolojiyi arttırdığı da gözlenmiştir.



Şekil 3.10. 5-FU'in U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi. Şekil 3.10. 5-FU'in U-2 OS hücrelerinin morfolojisine etkisi. %0,3 DMSO ile muamele edilen hücrelerin ters-faz (A) ve AO/EB boyama ile floresan (B) mikroskop görüntüsü. 1 mM 5-FU'e maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (C) ve AO/EB boyama ile floresan (D) mikroskop görüntüsü. 2 mM 5-FU'e maruz bırakılan hücrelerin ters-faz (E) ve AO/EB boyama ile floresan mikroskop (F) görüntüsü. LA: Erken apoptotik hücre, DA: Geç apoptotik hücre, DN: Ölü hücre, LN: Normal hücre, Büyütme oranı: 400X

İncelenen hücreler 3.1.2’de açıklandığı gibi morfolojilerine göre sınıflandırılmış ve apoptotik hücre yüzdesi hesaplanmıştır. U-2 OS hücrelerinde karvakrolün 150 μM dozundaki apoptotik indeks %7, IC_{50} dozu olan 250 μM ’da %18 (Şekil 3.11A), sisplatinin ve 5-FU’in IC_{50} altındaki dozlarında (sırasıyla 20 μM , 1 mM) apoptotik indeks %21 ve %32, IC_{50} dozlarında (sırasıyla 30 μM ve 2 mM) %32 ve %18 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.11B).



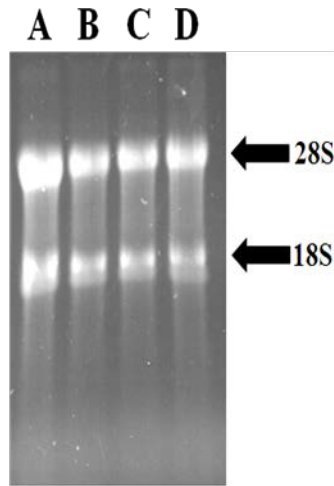
Şekil 3.11. Karvakrolün (A) ve sisplatin ile 5-FU’in (B) U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre yüzdesi. DMSO: çözücü kontrol, %0,1. (*) $p < 0,001$

3.2.3. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAP kinaz (MAPK) sinyal yolağı üzerine etkisinin RT²-PCR ile analizi

3.2.3.1. RNA izolasyonu ve kalitesi

Karvakrol, sisplatin ve DMSO ile 24 saat inkübasyona bırakılan U-2 OS hücrelerinden RNA izolasyon kitinin alındığı firmanın önerdiği protokole göre RNA izole edilmiştir. RNA izole edildikten sonra RNA miktarı, saflığı ve kalitesini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Öncelikle RNA miktarı ve saflığı Nanodrop aletinde spektrofotometre ile ölçülmüş ve stok RNA'nın miktarı belirlenmiştir. 260/280 nm absorbansı 1.8-2.1 arasında olan ve 260/230 absorbansı 1,7'den büyük olan saf RNA örnekleriyle deneylere devam edilmiştir.

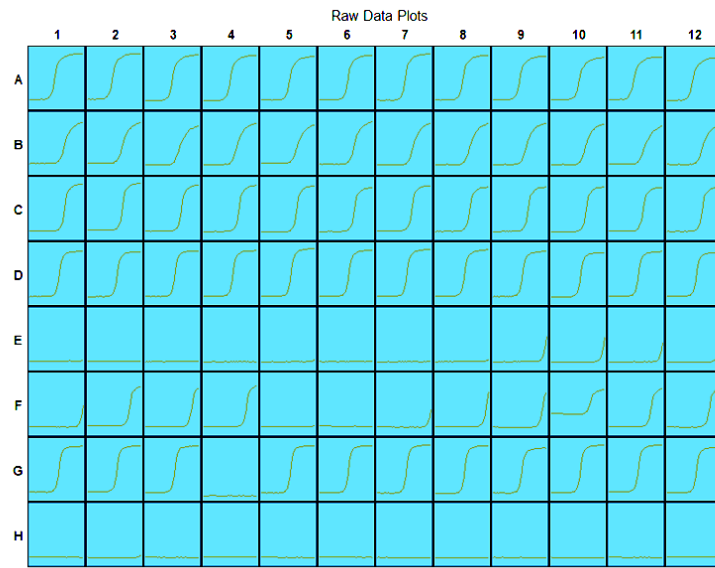
RNA agaroz jel elektroforeziyle RNA kalitesi incelenmiştir. Elde edilen RNA bantları UV transimilatör cihazında görüntülenerek fotoğraflanmıştır (Şekil 3.12). Görüntüler incelenerek 28S rRNA'nın 18S rRNA'ya göre yaklaşık 2 kat büyüklükte olan RNA örnekleriyle RT²-PCR plaka analizlerine devam edilmiştir.



Şekil 3.12. Formaldehit agaroz jel elektroforeziyle elde edilen RNA bantlarının UV transimilatör cihazındaki görüntüsü. A: Karvakrolün çözücüsü, B: Sisplatinin çözücüsü, C: Karvakrol ve D: Sisplatin ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinden elde edilen RNA'nın bandı

3.2.3.2. RT² RNA QC (Kalite kontrol) PCR sonuçları

Karvakrolün MAPK yolağındaki genlerin ifadesi üzerindeki etkisini belirlemek için uygulanan RT-PCR deneyine geçmeden önce RNA örnekleri RT² RNA QC PCR plakalarıyla incelenmiştir (Şekil 3.13). 1, 2, 11. ve 12. sütunlardaki sonuçlar U-2 OS hücresinin RNA'larına aittir. A ve B satırları (HK1 ve HK2) düşük ve yüksek ifadeli housekeeping genlerin kontrolünü sağlamaktadır. Bu satırlarda beklenildiği gibi reaksiyon gerçekleşmiştir.



Şekil 3.13. RT² RNA QC PCR plakasında gerçekleşen reaksiyonların görüntüsü. 1., 2., 11. ve 12. sütunlar U-2 OS hücrelerinden elde edilen RNA'ları göstermektedir. A ve B: HK1 ve HK2, C: RTC, D: PPC, E: GDC, F: NRC, G: PPC, H: NTC

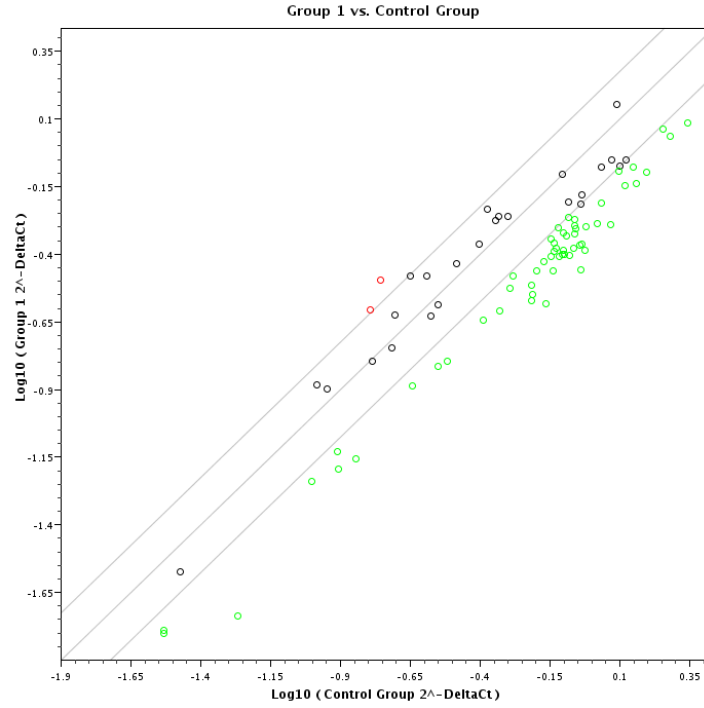
C satırı (RTC) reverz transkripsiyon kontrolü sağlamaktadır. Kitin sağladığı eksternal RNA kontrolünden kalıpları tespit ederek kitin reaksiyon etkinliğini test etmektedir. Olması gereken gibi bu satırda da reaksiyon gerçekleşmiştir. D satırı (PPC) ise PCR koşullarının uygunluğunu test ederek pozitif PCR kontrolü sağlamaktadır. Beklenildiği gibi D satırında da reaksiyon gözlenmiştir. E satırı (GDC) genomik DNA kontrolü sağlamaktadır. Transkripte olmamış genomik DNA kontaminasyonunu genomik DNA primerleriyle yüksek bir hassasiyetle belirleyebilmektedir. İstenildiği gibi bu satırda reaksiyon

gerçekleşmemiştir. F satırı (NRC) reverz transkripsiyon yokluğunun kontrolünü sağlamaktadır. RNA örneklerinden direkt olarak bir housekeeping gen çoğaltmaya çalışarak genomik DNA kontaminasyonunu test etmektedir. Beklenildiğinin aksine bu satırda reaksiyon gözlenmiştir. G satırı (PPC) deneysel kalıp olmaksızın PCR kontrolü sağlamaktadır. Yapay DNA sekanslarını belirleyebilmek için hazırlanmış primerlerle PCR reaksiyonu inhibitörlerini test etmektedir. Beklenildiğinin aksine burada da reaksiyon gerçekleşmiştir. H satırı (NTC) kalıp DNA yokluğunun kontrolünü sağlamaktadır. Plakanın hazırlanması esnasında oluşabilecek genel DNA kontaminasyonunu test etmektedir. Bu satırda herhangi bir reaksiyon gerçekleşmemiştir. DNA kontaminasyonu ve PCR inhibitörlerini test eden F ve G satırlarında reaksiyon gerçekleşmesi istenilen bir sonuç olmadığından dolayı, bu deneyin gerçekleştirildiği RNA örnekleri kullanılmamıştır. Yeniden RNA izole edilerek, elde edilen RNA'nın spektrofotometre ve agaroz jel elektorforezi ile saflığı ve kalitesinin uygun olduğu anlaşıldıktan hemen sonra RT²-PCR plaka çalışmalarına devam edilmiştir.

3.2.3.3. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesi üzerine etkisi

Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağı ile ilgili 84 genin ifadeleri üzerine etkisi RT²-PCR plaka yöntemiyle araştırılmıştır. DMSO ile muamele edilmiş kontrol hücrelerinden ve karvakrol ile muamele edilmiş hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden cDNA elde edilmiş ve cDNA'lar RT²-PCR plaklarına yüklenmiştir. RT²-PCR plaka deney sonuçları materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi data analiz programı ile analiz edilmiş ve kontrole göre 1,5 kat değişim gösteren gen ifadeleri baz alınarak oluşturulan yayma noktaları (scatterplot) grafiğiyle gösterilmiştir (Şekil 3.14). Buna göre ifadesi artan genler kırmızı, azalan genler yeşil ifadesinde ve değişiklik olmayan genler ise siyah ile gösterilmiştir. *CREB1* ve *MYC* genlerinin ifadesi artmış ve 56 tane genin ifadesi ise azalmıştır. Bu 56 tane gen ise şunlardır: *CCNA1*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *CDC42*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2B*, *CDKN2C*, *CDKN2D*, *CHUK*, *COL1A1*, *DLK1*, *E2F1*, *EGFR*, *EGR1*, *ELK1*, *ETS1*, *ETS2*, *FOS*, *GRB2*,

HRAS, KRAS, KSR1, LAMTOR3, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K3, MAP2K4, MAP2K5, MAP2K6, MAP3K3, MAP3K4, MAP4K1, MAPK1, MAPK10, MAPK11, MAPK12, MAPK13, MAPK14, MAPK8, MAPK8IP2, MAPK9, MAPKAPK3, MAX, MKNK1, MOS, NRAS, PAK1, RAF1, RB1, SFN, SMAD4, TP53. Diğer 28 adet genin ifadesinde ise önemli bir değişiklik olmamıştır.



Şekil 3.14. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerine etkisi. İfadesi kontrole göre 1,5 kat ve üzeri artan genler kırmızı, azalan genler ise yeşil renkli olarak yayma noktaları grafiği ile gösterilmiştir

RT² PCR plaka sonuçlarına göre ifadesinde 1,5 kat ve üzeri değişiklik olan genlerin pozisyon, sembol ve kat regülasyon seviyeleri Çizelge 3.1’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.1. Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri

Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Regülasyon Değişimi
C01	CREB1	1.8167
G02	MYC	1.5454
A04	CCNA1	-2.9526

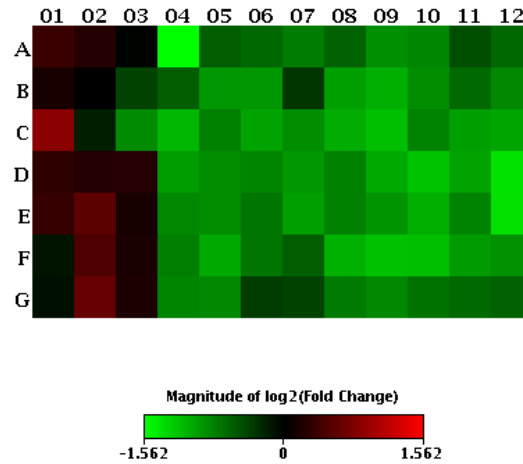
Çizelge 3.1. (devam) Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri

A06	CCNB1	-1.5497
A07	CCNB2	-1.688
A08	CCND1	-1.5213
A09	CCND2	-1.8387
A10	CCND3	-1.7802
A12	CDC42	-1.5497
B05	CDKN1B	-1.9123
B06	CDKN1C	-1.9079
B08	CDKN2B	-1.9798
B09	CDKN2C	-2.1121
B10	CDKN2D	-1.8344
B11	CHUK	-1.5677
B12	COL1A1	-1.7967
C03	DLK1	-1.8092
C04	E2F1	-2.1765
C05	EGFR	-1.7155
C06	EGR1	-1.9982
C07	ELK1	-1.826
C08	ETS1	-2.0975
C09	ETS2	-2.2689
C10	FOS	-1.7556
C11	GRB2	-1.9706
C12	HRAS	-2.0214
D04	KRAS	-1.957
D05	KSR1	-1.8302
D06	MAP2K1	-1.7679
D07	LAMTOR3	-1.8991
D08	MAP2K2	-1.7395
D09	MAP2K3	-2.0496
D10	MAP2K4	-2.29
D11	MAP2K5	-2.0028
D12	MAP2K6	-2.6244
E04	MAP3K3	-1.8008
E05	MAP3K4	-1.8302
E06	MAP4K1	-1.6533
E07	MAPK1	-1.9661
E08	MAPK10	-1.7315
E09	MAPK11	-1.8947
E10	MAPK12	-2.117
E11	MAPK13	-1.7556
E12	MAPK14	-2.6123
F04	MAPK8	-1.7076
F05	MAPK8IP2	-2.0496
F06	MAPK9	-1.6533
F08	MAPKAPK3	-2.1219
F09	MAX	-2.2794
F11	MKNK1	-1.939

Çizelge 3.1. (devam) Karvakrol ile muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri

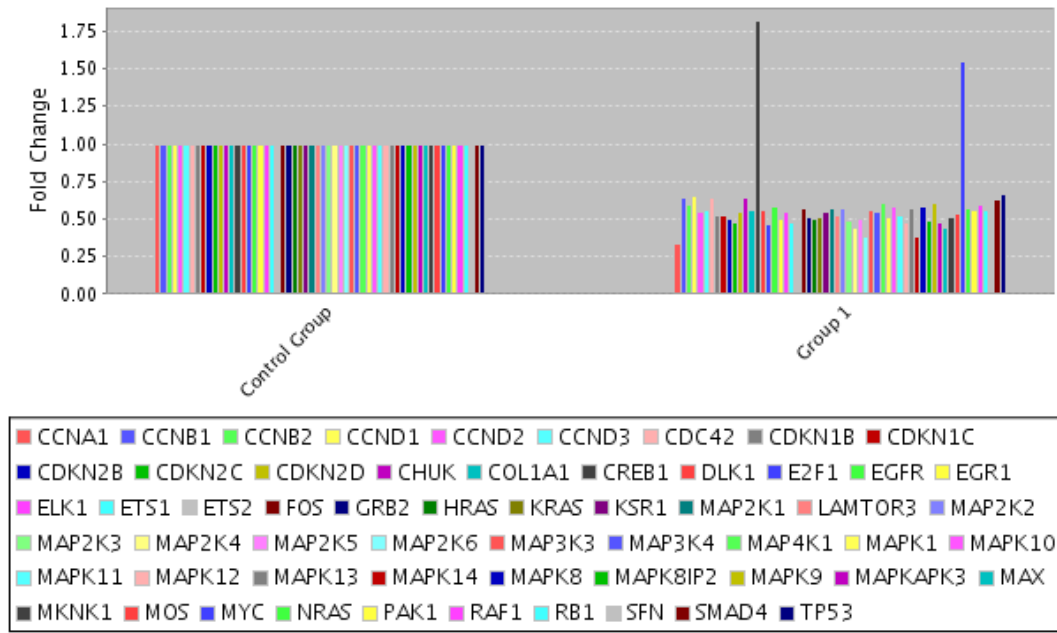
F12	MOS	-1.8643
G04	NRAS	-1.7679
G05	PAK1	-1.7925
G08	RAF1	-1.6725
G09	RB1	-1.8008
G10	SFN	-1.6193
G11	SMAD4	-1.575
G12	TP53	-1.5143

Gen ifadeleri üzerindeki değişim, genlerin plakadaki yerleşimlerine göre ısı haritası (heatmap) ile de gösterilmiştir (3.15). Plakadaki renk skalası katlanma değişikliği (foldchange) arttıkça kırmızı tonlarına, azaldıkça yeşil tonlarına dönüşmektedir. Bu renk değişimleri sayesinde gen ifadelerinde gerçekleşen değişimler anlaşılabilmektedir.



Şekil 3.15. Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerindeki etkisinin RT²-PCR plaka sonuçlarının ısı haritasıyla gösterilmesi

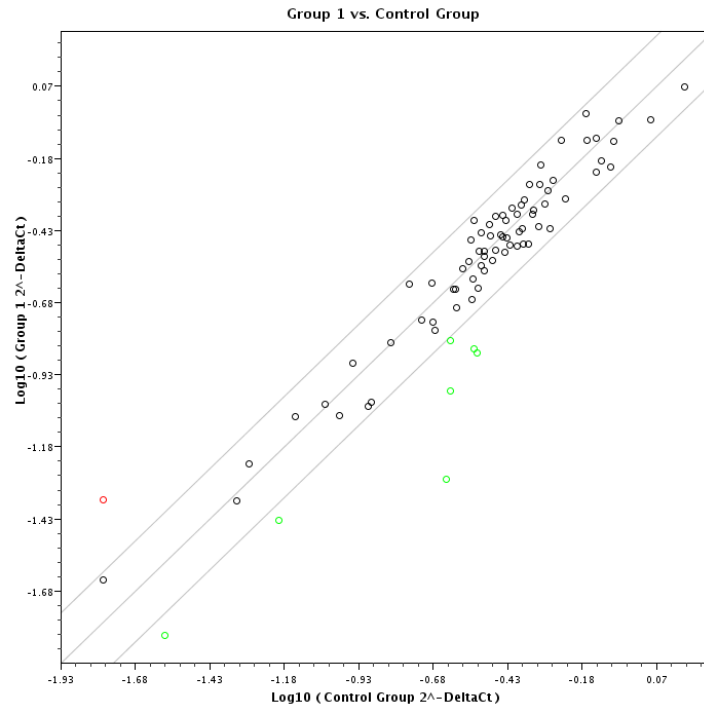
RT²-PCR plaka sonuçlarına göre ifadesinde 1,5 kat ve üzeri değişim olan genler çoklu sütun grafiği ile de gösterilmiştir (3.16). Bu grafikte kontrol grubu 1.00 olarak kabul edilmiştir. Genlerde karvakrolün neden olduğu katlanma değişikliği seviyesi, sütunların uzunluğundaki farka göre anlaşılabilmektedir.



Şekil 3.16. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde ifade seviyesi 1,5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi

3.2.3.4. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağı ile ilgili genlerin ifadesi üzerine etkisi

Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağı ile ilgili 84 gen üzerine etkisi RT²-PCR plaka yöntemiyle araştırılmıştır. DMSO ile muamele edilmiş kontrol hücrelerinden ve sisplatinle muamele edilmiş hücrelerden elde edilen RNA örneklerinden cDNA elde edilmiş ve cDNA'lar RT²-PCR plaklarına yüklenmiştir. RT²-PCR plaka deney sonuçları materyal ve yöntemde anlatıldığı gibi data analiz programı ile analiz edilmiş ve kontrol göre 1,5 kat değişim gösteren genler baz alınarak oluşturulan yayma noktaları (scatterplot) grafiğiyle gösterilmiştir (Şekil 3.17). Sisplatin MAPK sinyal yolağıyla ilgili olan genlerden yalnızca *CCNA1*'in ifadesini arttırmış (kırmızı renkte) ve 7 tanesinin ifadesini azaltmıştır (yeşil renkte). Bu 7 tane gen şunlardır: *CREBBP*, *HSPA5*, *MAP2K5*, *MAP2K6*, *MEF2C*, *MKNK1* ve *MOS*. Diğer 80 adet genin ifadesinde ise önemli bir değişiklik gerçekleşmemiştir.



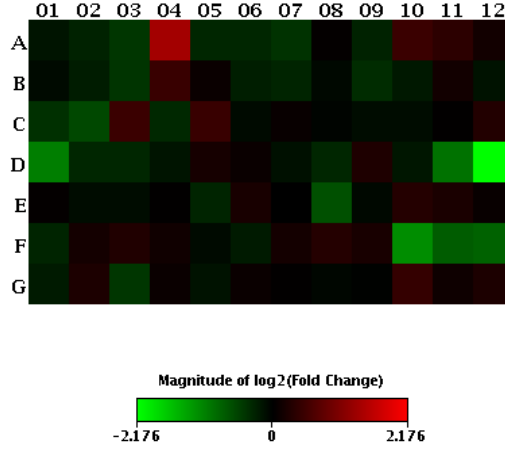
Şekil 3.17. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadeleri üzerine etkisi. İfadesi kontrole göre 1,5 kat ve üzeri artan genler kırmızı, azalan genler ise yeşil olarak yayma noktaları grafiği ile gösterilmiştir

RT²-PCR plaka sonuçlarına göre ifadesinde 1,5 kat ve üzeri değişiklik olan genlerin plakadaki pozisyonu, sembolü ve kat regülasyon seviyeleri Çizelge 3.2’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.2. Sisplatinle muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde MAPK yolağıyla ilgili genlerin plakadaki pozisyonları, sembolleri ve kat regülasyon seviyeleri

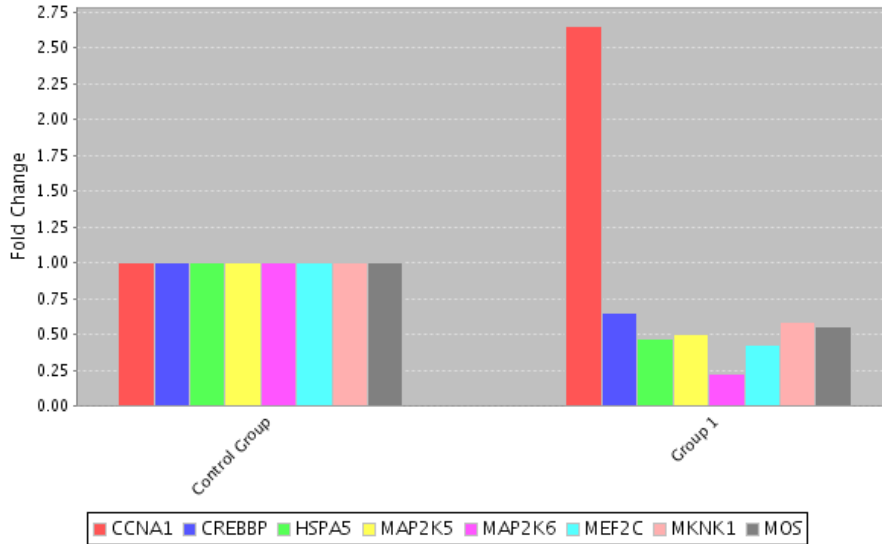
Pozisyon	Gen Sembolü	Kat Regülasyon Değişimi
A04	CCNA1	2.6525
C02	CREBBP	-1.5362
D01	HSPA5	-2.1033
D11	MAP2K5	-1.9716
D12	MAP2K6	-4.519
F10	MEF2C	-2.3123
F11	MKNK1	-1.7163
F12	MOS	-1.7851

Gen ifadeleri üzerindeki değişim, genlerin plakadaki yerleşimlerine göre ısı haritası ile de gösterilmiştir (3.18).



şekil 3.18. Sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerini fadeleri üzerindeki etkisinin RT²-PCR plaka sonuçlarının ısı haritasıyla gösterilmesi

RT²-PCR plaka sonuçlarına göre ifadesinde 1,5 kat ve üzeri değişim gösteren genler çoklu sütun grafiği ile de gösterilmiştir (3.19).



şekil 3.19. Sisplatinle muamele edilen U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili ifade seviyesi 1.5 kat ve üzeri değişen genlerin kontrolleri ile karşılaştırılmal olarak çoklu sütun grafiğinde gösterilmesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bir bitki bileşeni olan karvakrol meme, akciğer, karaciğer, larinks ve servikal gibi bazı insan kanser hücreleri ve normal insan hücreleri üzerindeki etkilerini incelemek amaçlı bazı temel çalışmaların konusu olmuştur (Stamatti 1999; Zeytinoglu ve ark. 2003; Koparal ve Zeytinoglu 2003; Arunasree 2010; Mehdi ve arkadaşları. 2011; Sivas ve Tomsuk 2011; Yin ve ark. 2011). Çalışmaların büyük bir kısmı moleküler seviyedeki etkiyi açıklamakta yetersiz olup, söz konusu antikanser etkinin mekanizmasının çalışılması önem kazanmaktadır.

4.1. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerine sitotoksik etkisi

Bu çalışmada karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücreler karvakrolün belirli dozlarına 24, 48 ve 72 saat maruz bırakılmış ve sitotoksik etkileri iki farklı prensibe dayanan MTT ve NR deneylerinin sonuçlarına göre incelenmiştir. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat için IC₅₀ değerlerini veren MTT ve NR deney sonuçları Çizelge 4.1'deki gibi birbirine paralel bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saat, sisplatin ve 5-FU'nun U-2 OS hücrelerindeki 24 ve 48 saat için yaklaşık IC₅₀ değerleri

Madde	Hücre	İnkübasyon süresi (saat)		
Karvakrol (µM)		24	48	72
	F2408	300	300	200
	5RP7	300	300	200
	U-2 OS	300	250	200
Siplatin (µM)	U-2 OS	30	20	-
5-FU (mM)		2	1	-

Normal fibroblastlar (F2408) ile H-ras transform fibroblastların (5RP7) tüm inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 saat) için IC₅₀ değerleri arasında fark bulunmamaktadır. Karvakrol ile muamele edilen tüm hücreler arasında yalnızca

bir kanser hücresi olan U-2 OS'ların 48 saat için IC_{50} değeri (250 μM), F2408 ve 5RP7 hücrelerindeki IC_{50} değerinden (300 μM) daha düşük olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre 48 saat karvakrol ile inkübe edilen hücreler arasında U-2 OS hücrelerinin en hassas olduğu görülmektedir. Bununla beraber U-2 OS hücreleri ile fibroblast hücrelerinin 24 ve 72 saat için IC_{50} değerleri arasında fark bulunmamıştır. Sonuç olarak karvakrol üç hücre tipi üzerinde de sitotoksik etki göstermiştir. Daha önce belirtildiği gibi karvakrolün bazı kanser hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalara göre karvakrolün IC_{50} değerleri sıçan düz kas kanser (liyomiyosarkoma) hücrelerinde 48 saat için 67 μM (Karkabounas ve ark. 2006), insan meme kanser hücrelerinde (MDA-MB 231) 48 saat için 100 μM (Arunasree 2010), insan karaciğer kanser hücrelerinde (HepG2) 48 saat için 500 μM (Sivas ve Tomsuk 2011), insan larinks karsinoma hücrelerinde (Hep-2) 48 saat için 320 μM (Stammati ve ark. 1999) ve insan akciğer kanser hücrelerinde (A549) 24 saat için 250 μM (Koparal ve Zeytinoglu 2003) olarak bulunmuştur. Bunlardan yalnızca iki çalışmada normal hücrelerle karşılaştırma yapılmıştır. Karvakrolün normal insan akciğer hücreleri olan HLF1'de ve karaciğer hücreleri olan L02'de önemli bir sitotoksik etkisi olmadığı ileri sürülmüştür (Koparal ve Zeytinoglu 2003; Yin ve ark. 2011). Karvakrolün bu hücre tiplerindeki IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinin HepG2 ve Hep2 hücrelerine göre karvakrole daha hassas olduğu görülmektedir. Karvakrol 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde olduğu gibi normal sıçan fibroblastlarında da sitotoksik etki göstermiştir. İnsan kanser hücreleri üzerinde etkili bir sitotoksosite göstermesi, bunun aksine normal insan hücrelerinde önemli bir sitotoksik etkisinin bulunmaması karvakrolün antikanser ajan olabilme potansiyelini göstermektedir. Ancak bu etkinin diğer farklı normal hücreler ile yapılan çalışmalarla incelenmesi önemlidir.

Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde F2408 ve 5RP7 hücrelerine göre daha etkili olması nedeniyle, bu hücrelerde gen ifade seviyesindeki araştırılmaları devam edilmiştir. Bu amaçla karvakrolün MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesine etkisi araştırılmıştır. U-2 OS hücrelerinde pozitif kontrol olarak birer antikanser ilaç olan sisplatin veya 5-FU'in kullanılması düşünülmüştür. Bunun için öncelikle sisplatin ve 5-FU'in bu hücrelerde IC_{50} değerleri belirlenmiş

(Çizelge 4.1) ve bu maddelerin inkübasyon süre artışına bağlı olarak etkili oldukları bulunmuştur. Ancak hücrelerin sisplatine daha hassas olduğu görülmektedir. Bundan dolayı, karvakrolün apoptoz ve MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesi üzerindeki etkisini belirlemede pozitif kontrol olarak sisplatinin kullanılması uygun bulunmuştur.

4. 2. Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerindeki apoptotik etkisi

Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi AO/EB çift boyama yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem için karvakrolün her hücre için IC_{50} ve altı dozları seçilmiştir. Karvakrol ile inkübasyon süresi sonunda ters faz mikroskopta hücrelerin morfolojileri incelenmiştir. Kontrol grubundaki F2408 ve 5RP7 hücrelerinin fibroblast tipi morfolojiye, U-2 OS hücrelerinin epitelyal morfolojiye sahip olduğu ve kontrol grubundaki tüm hücrelerin plaka yüzeyine birbiriyle bağlantılı ve homojen bir şekilde yerleştikleri gözlenmiştir. Ancak karvakrolün doza bağlı olarak hücrelerde sayıca azalmaya, adezyon kaybına ve yuvarlak morfolojiye neden olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak karvakrolün bu hücrelerin normal morfolojilerini kaybettirdiği, hücreler arası adezyonu azaltarak, canlı kalabilme ve çoğalma yeteneklerini düşürdüğü söylenebilir.

AO/EB boyama ile floresan mikroskopta incelenen hücrelerden yaklaşık 1000-1500 hücrenin normal, apoptotik veya ölü/nekrotik olup olmadığı belirlenerek çıkarılan apoptotik hücre yüzdesi Çizelge 4.2’de gösterildiği gibi özetlenmektedir. F2408 hücreleri için apoptotik hücre yüzdesi 200 μM ’da %13, 300 μM ’da %18 iken 5RP7 hücreleri için 200 μM ’da %11, 300 μM ’da %20 olarak bulunmuştur. U-2 OS hücrelerinde karvakrolün 150 μM dozu %7, 250 μM dozu ise %18 oranında apoptotik hücreye neden olmuştur.

Karvakrolün her iki hücre için IC_{50} değerinin alt dozu olan 200 μM dozu F2408 hücrelerinde 5RP7 hücrelerine göre %2 daha fazla apoptotik hücreye yol açarken, her iki hücre için IC_{50} değeri olan 300 μM dozu F2408 hücrelerinde 5RP7 hücrelerine göre %2 daha az apoptotik hücreye sebep olmuştur.

Çizelge 4.2. DMSO ve karvakrol ile 48 saat inkübe edilen F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde oluşan apoptotik hücre yüzdesi

Hücre	Maddeler				
	DMSO (%0,01)	Karvakrol (μ M)			
		150	200	250	300
F2408	%4	-	%13	-	%18
5RP7	%4	-	%11	-	%20
U-2 OS	%4	%7	-	%18	-

Karvakrolün IC_{50} altı dozu tüm hücre tipleri arasında %7'lik oranla en az U-2 OS hücrelerinde apoptotik hücreye neden olurken, IC_{50} dozu %20 oranla en çok 5RP7 hücrelerinde, F2408 ve U-2 OS hücrelerinde aynı olup %18 oranla apoptotik hücreye yol açmıştır. Sonuç olarak karvakrolün IC_{50} dozları kontrole göre F2408 ve U-2 OS hücrelerinde 3,5 kat, 5RP7 hücrelerinde 4 kat kadar apoptotik hücre yüzdesini arttırmıştır. Yapılan bir çalışmada karvakrolün 50-200 μ M arasındaki dozlarının insan karaciğer hücresi olan HepG2'lerde apoptozu uyardığı Hoechst 33258 boyama ve akım sitometri analizleriyle belirlenmiştir (Yin ve ark. 2011). Bir başka çalışmada 500 μ M karvakrol ile 48 saat muamele edilen HepG2'lerde %95 oranında apoptotik hücre meydana geldiği AO/EB boyama yöntemiyle belirlenmiştir (Sivas ve Tomsuk 2011). İnsan meme kanser hücreleri olan MDA-MB 231'lerde 100 μ M karvakrolün %31,8 oranında apoptotik hücreye neden olduğu akım sitometri analizleriyle belirlenmiştir. Ayrıca karvakrolün S fazı tutuklanması aracılığıyla apoptozu uyardığı, mitokondri zar potansiyelini azalttığı ve mitokondriden sitokrom c salınımını arttırdığı, Bcl2/Bax oranını azalttığı, kaspaz aktivitesini ve PARP'ın kırılmasını ve DNA fragmentasyonunu arttırdığı ileri sürülmüştür (Arunasree 2010). Karvakrolün 50 mg L⁻¹ dozunun insan serviks kanser hücreleri olan HeLa ve SiHa'larda DNA fragmentasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Mehdi ve ark. 2011). AO/EB boyama yöntemiyle, H-ras transform 5RP7 hücrelerinde karvakrolün 0,02-0,04 mg/ml dozlarının, N-ras transform CO25 hücrelerinde 0,05-0,1 mg/ml dozlarının apoptotik morfolojiye yol açtığı bildirilmiştir. Ayrıca DNA fregmantasyonunun sadece karvakrolün 2-4 μ g/ml dozlarıyla inkübe edilen 5RP7 hücrelerinde gözlemlendiği ileri sürülmüştür (Akalin ve İncesu 2011). Bu çalışmalardan

bazılarında karvakrolün apoptoza etkisi hücre boyama, akış sitometri, DNA fregmantasyon, kaspaz gibi çeşitli yöntemlerle araştırılmış ve apoptotik morfoloji yüzdesi hakkında bilgi verilmemiştir. Dolayısıyla çalışmamızda belirlediğimiz apoptotik hücre yüzdelерinin diğer çalışmalarla karşılaştırılması mümkün olmamaktadır. Ancak apoptotik hücre yüzdesi verilen çalışmalar kıyaslandığında F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerine göre, karvakrolün MDA-MB 231 hücrelerinde daha düşük dozda daha yüksek apoptotik hücre yüzdesine, HepG2’lerde ise daha yüksek dozda, oldukça yüksek apoptotik hücre yüzdesine neden olduğu görülmektedir.

Sisplatin ve 5-FU’in U-2 OS hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi de aynı yöntemle incelenmiştir. Bu yöntem için hücreler sisplatin ve 5-FU’in IC₅₀ ve alt dozuyla 24 saat muamele edilmiştir. Maddelerle inkübasyon sonrasında hücrelerin morfolojileri ilk olarak ters faz mikroskopta incelenmiştir. Kontrol grubundaki U-2 OS hücrelerinin epitelyal morfolojiye sahip olduğu, plaka yüzeyine birbiriyle bağlantılı ve homojen bir şekilde yerleştikleri gözlenmiştir. Ancak sisplatin ve 5-FU’in doza bağlı olarak hücrelerde sayıca azalmaya, adezyon kaybına ve yuvarlak morfolojiye neden olduğu gözlenmiştir. Sisplatin ve 5-FU’in doza bağlı olarak bu hücrelerin normal morfolojilerini değiştirdiği, hücreler arası adezyonu azaltarak, canlı kalabilme ve çoğalma yeteneklerini düşürdüğü söylenebilir. AO/EB boyama ile floresan mikroskop incelenen hücrelerden yaklaşık 1000-1500 hücre sayılarak elde edilen apoptotik hücre oranları Çizelge 4.3’deki gibidir.

Çizelge 4.3. Sisplatin ve 5-FU’in U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu hücre yüzdesi, DMSO 1: Sisplatinin çözücü kontrolü, DMSO 2: 5-FU’in çözücü kontrolü

Maddeler	DMSO 1	Sisplatin (µM)		DMSO 2	5-FU (mM)	
Dozlar	%0.01	20	30	%0.03	1	2
Apoptotik hücre %	4	21	32	4	13	25

Maddelerin U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre oranı kıyaslandığında sisplatinin 5-FU’e göre düşük dozlarda daha yüksek oranda apoptoza yol açtığı görülmektedir. Aynı zamanda U-2 OS hücrelerinde 5-FU’e göre sisplatinin çok daha düşük dozları sitotoksik etki göstermiştir. Bu

sebeplerden dolayı RT²-PCR plaka analiz deneyleri için sisplatin pozitif kontrol olarak seçilmiştir. Ayrıca sisplatinin apoptotik etkilerini ortaya koyan çalışmaların bulunması da sisplatinin seçiminde etkili olmuştur. Sisplatinin 300 µM dozuyla 48 saat muamele edilen insan glioma hücreleri olan A172'lerinde, Hoechst 33258 boyama ile apoptotik çekirdek özelliklerine sahip hücreler gözlendiği ve apoptotik hücre oranı %40 olarak belirlendiği ileri sürülmüştür (Choi ve ark. 2004). Sisplatinin 16 µg/ml dozunun insan hepatoblastoma hücreleri olan HepG2 ve Hep3B'lerde apoptozu uyardığı akış sitometri ve DNA fregmantasyon yöntemiyle tespit edilmiştir (Qin ve Ng 2002). İnsan baş ve boyun skuamöz karsinoma hücreleri olan HN3 ve HN4'ün 40 µM sisplatinle 12 saat muamelesinin bu hücrelerde apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir. HN4 hücrelerinde apoptotik hücre oranının %62'den yüksek, HN3'lerde ise %60'a yakın olarak belirlendiği de öne sürülmüştür (Kim ve ark. 2006). Gatti ve arkadaşları (2002) 50 µM sisplatinle 1 saat muamele edilen U-2 OS hücrelerinde 24 saat sonra %26, 48 saat sonra %45 ve 72 saat sonra %48 oranında apoptotik hücre oluştuğunu anneksin V bağlanma yöntemi ile belirlemişlerdir.

Bu çalışmalar karşılaştırıldığında 300 µM sisplatin dozuyla daha uzun süre muamele edilen A172'lerde oluşan apoptotik morfoloji yüzdesinin, sisplatinin çok daha düşük dozunun (30 µM) U-2 OS hücrelerinde oluşturduğu apoptotik hücre yüzdesine yakın olduğu görülmektedir. U-2 OS hücrelerinde kullanılan doza (30 µM) yakın bir dozla (40 µM) daha kısa süre muamele edilen HN3 ve HN4 hücrelerinde ise U-2 OS'lara göre daha yüksek apoptotik hücre yüzdesi belirlenmiştir. Bu çalışmada kullandığımız sisplatin dozundan daha yüksek bir dozla ancak daha kısa süre muamele edilmiş U-2 OS hücrelerinde daha düşük apoptotik yüzde belirlenmiştir. Ancak sisplatin dozunun ve sisplatinle muamele yönteminin farklı olmasından dolayı bu çalışmayı yaptığımız çalışmayla karşılaştırmak mümkün olmamaktadır. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında ise sisplatinin U-2 OS hücrelerinde, A172 hücrelerine göre daha yüksek oranda apoptozu neden olduğu, HN3 ve HN4 hücrelerine göre daha az apoptozu yol açtığı söylenebilir.

4.3. RT²-PCR MAPK plaka analizi

Karvakrol, onun kontrolü olarak DMSO ve pozitif kontrol olarak sisplatinin U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hazır RT²-PCR plakaları kullanılmıştır. Bu plakalar ile 84 ayrı genin ifadesi ve çeşitli kontrollerin analizi yapılmıştır. Bunun için öncelikle elde edilen RNA'nın kalite analizi spektrofotometre, agaroz jel elektroforezi ve RT² RNA QC PCR plaka kullanılmak suretiyle yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ile önce çeşitli sorunlar yaşanmış ve istenilen gibi koyu zemin üzerinde parlak bantlar elde edilememiştir. Jele yüklenen RNA miktarları arttırıldığında da sonuç değişmemiştir. Bu kez sorunun ethidium bromidin jelden yeterince uzaklaştırılmaması olduğu düşünülerek jelin yıkama tamponuyla birkaç kere yıkanması gerektiğine karar verilmiştir. Biraz daha net jel görüntüleri elde edilmesine rağmen istenilen görüntüye ulaşılamamıştır. Bunun üzerine, jeli ethidium bromid tamponu içinde bekletmek yerine RNA yükleme tamponu içine ethidium bromid eklenmiş ve protokol biraz değiştirilerek uygulanmıştır. İstenilen jel görüntüsü bu son denemeye elde edilmiştir. Bundan sonra izole edilen tüm RNA'larda bu yöntem uygulanmıştır. Spektrofotometre, agaroz jel elektroforezi ve RT² RNA QC PCR plaka analizleri sonucunda herhangi bir kontaminasyon, degradasyon içermeyen kaliteli olarak belirlenen RNA'lar RT²-PCR plaka analizinde kullanılmıştır.

4.3.1. Karvakrolün U-2 OS hücresi MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesine etkisi

Karvakrolün biyolojik pek çok aktivitesi gibi antitümör ve antiproliferatif özellikleri olduğu da bazı çalışmalarla gösterilmiştir (He ve arkadaşları 1997; Zeytinoglu ve ark. 1998; Stamatti 1999; Zeytinoglu ve ark. 2003; Koparal ve Zeytinoglu 2003; Karkabounas ve ark. 2006; Arunasree 2010; Mehdi ve ark. 2011; Sivas ve Tomsuk 2011; Yin ve ark. 2011; Akalın ve İncesu 2011). Ancak karvakrolün etkilerini moleküler seviyede gösteren çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmamızda karvakrolün U-2 OS hücrelerinde MAPK sinyal yolağıyla ilgili 84 genin ifadesi üzerine etkisini araştırdık. MAPK yolağının,

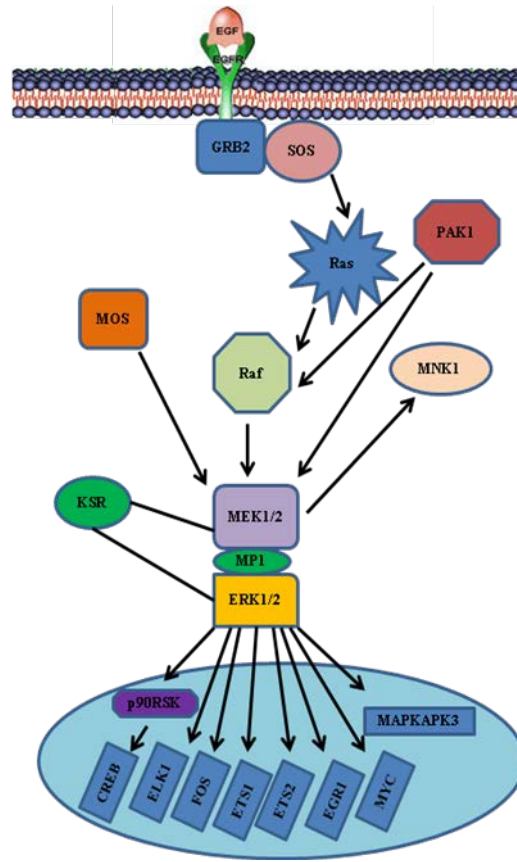
büyüme, çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi ana hücresel süreçleri kontrol ettiği bilinmektedir (Dhillon ve ark. 2007). Dolayısıyla karvakrolün U-2 OS hücrelerinin büyüme, çoğalma ve apoptoz süreçlerine etkisi olabileceği düşünülmüş ve bunu belirlemek için bu çalışmada MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesi araştırılmıştır. Kontrole göre karvakrol ile ifadesi 1,5 kat ve üzeri değişen genler baz alınarak gen ifadesi analizi gerçekleştirilmiştir. MAPK sinyal yolağıyla ilgili genler, görevli oldukları MAPK yolağı tipleri ve ayrıca hücre döngüsü yolağı içinde: **1)ERK1/2 ve ERK5, 2) JNK, 3) p38 ve 4) Hücre döngüsü** olarak incelenmiştir. Bu genlerin ifadelerinin değişmesinin ne gibi bir etkiye yol açabileceği genlerin özellikleri de belirtilerek yorumlanmıştır.

4.3.1.1. ERK1/2 ve ERK5 yolağı

Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde ERK1/2 MAPK sinyal yolağıyla ilgili 21 adet genin (*CREB1*, *EGFR*, *GRB2*, *HRAS (H-ras)*, *KRAS (K-ras)*, *NRAS (N-ras)*, *RAF1*, *MAPKAPK3 (MAPKAPK-3)*, *MOS*, *MAP2K1 (MEK1)*, *MAP2K2 (MEK2)*, *MAPK1 (ERK2)*, *MKNK1 (MNK1)*, *KSR1*, *LAMTOR3*, *ELK1*, *FOS*, *ETS1*, *ETS2*, *EGR1* ve *PAK1*) ifadesinin azalmasına diğer yandan 2 adet genin (*CREB1* ve *MYC*) ifadesinin artmasına yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca bu genlerden 5 tanesinin (*E2F1*, *ETS1*, *ETS2*, *HRAS* ve *MAPKAPK3*) ifadesini 2 kat ve üzeri olmak üzere önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. ERK1/2 yolağı ile ilgili ifadelerinde değişiklik saptanan bu genlerin kodladığı proteinler yolaktaki işlevlerine göre Şekil 4.1’de şematize edilmiştir.

EGFR geni tarafından kodlanan zar geçişli glikoprotein, epidermal büyüme faktör (EGF) aile üyeleri için bir tirozin kinaz reseptördür. EGFR’lere EGF’nin bağlanması ile reseptörün uyarılması hücre çoğalmasına neden olan yolağın aktivasyonunu başlatır (Gen ID: 2885, NCBI). Aktifleşen EGFR, adaptör bir protein olan Grb2 ile birleşir (Gen ID: 2885). Grb2 de SOS adı verilen bir proteine bağlanır ve onun zara yerleşmesini sağlar. Zara yerleşen SOS Ras’ı aktive eder. ERK1/2 yolağının pek çok sinyal aktivasyonu, büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanması sonucu tetiklenen Ras proteinlerinin aktivasyonu ile başlar.

Aktif Ras, efektör molekülü olarak sitoplazmik Raf'ı aktiveleştirir. MEK1/2'ler (MAP2K1,2) ise Raf proteinleri (A-Raf, B-Raf, Raf-1) tarafından fosforile edilirler. Daha sonra MEK1/2 tarafından aktive edilen ERK1/2 çekirdeğe transloke olabilir ve burada c-fos, Elk-1, c-myc ve Ets-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive edebilirler. Aktif ERK1/2, MNK1 ve MAPKAPK3 gibi sitoplazmik ve nüklear kinazları da fosforlayabilirler (Hagemann ve Blank 2001; Güneş 2004; Cooper ve Hausman 2006; Junttila ve ark. 2008).



Şekil 4.1. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde ERK1/2 yolağıyla ilgili olan ifadesi değişen genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması

CREB1 (*CREB*) geni cAMP duyarlı elemente bağlanan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Bu protein pek çok protein kinaz tarafından fosforile edilir (Gen ID: 1385, NCBI). Hücre çoğalması, farklılaşma ve hücre süreçlerinin adaptör yanıtı gibi ekstraselüler uyaranlara hücre yanıtı düzenleyen farklı sinyal yollarının hedefidir (Kano ve ark. 2007). CREB, direkt olarak ERK1/2

yolağıyla aktive edilmemesine rağmen ERK1/2'nin aktive ettiği p90RSK tarafından aktive edildikleri bilinmektedir (Cañoñ ve ark. 2004; Vaishnav ve ark. 2003).

MAPKAPK-3 geni tarafından kodlanan protein, ERK, JNK ve p38 tarafından fosforlanarak aktive edilebilen subsratlar arasında yer almaktadır. Mitojen ve stres uyarımlı ajanlar veya pro-inflamatuar sitokinler tarafından yüksek derecede aktive edilirler (Gen ID: 7867; Cuenda ve Rousseau 2007).

MOS (c-mos) kinazlar aynı zamanda ERK1/2 yolağının MAP3K'ı olarak da bilinir (Roux ve Bleniks 2004). MEK1'i fosforile ederek aktivasyonlarına neden olurlar ve mitoz geçişini kolaylaştırır (Solhonne ve ark.1999; Inoue ve ark. 2007; Tang ve ark. 2008; Vitale ve ark. 2010).

MNK1 geninin kodladığı protein, MAPK yolağından çıkan sinyalleri ilgili subsratları fosforlamak için birleştirir. Büyüme faktör peptidleri, forbol esterleri ve UV radyasyonu ile muamele MNK1'in post translasyonel modifikasyonunu ve enzimatik aktivasyonunu artırır (Worch ve ark. 2004). MNK1'in büyüme faktörleri, hücrel stres ve inflamasyon sitokinleri tarafından, sinyal içeriğine bağlı olarak ERK ve/veya p38 MAPK aracılığıyla güçlü bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (Ueda ve ark. 2004).

Raf/MEK/ERK şelalesinde MEK ve ERK'nın aktivasyonunu ve özgünlüğünü düzenleyen scaffold proteinleri arasında KSR1 ve LAMTOR3 (MP1) bulunur. KSR1 ve MP1, ERK yolağı bileşenlerine bağlanarak onları bir araya getirir ve yolağın aktivasyonunu kolaylaştırırlar (Hagemann ve Blank 2001; Roberts ve Der 2007; Huang ve ark. 2011; Goettel ve ark. 2011).

ELK1, ETS transkripsiyon faktör ailesi ve ternari (üçlü) kompleks (TCF) alt ailesinin bir üyesidir (Gen ID: 2002). ELK1, özellikle ERK olmak üzere JNK ve p38 MAPK yolakları tarafından hedeflenir (Buchwalter ve ark. 2004; Junttila ve ark. 2008; Zhang ve ark. 2011).

FOS (c-fos) proteinleri, hücre çoğalması, farklılaşması ve transformasyonunda önemli regülatör rollere sahiptir. Mitojenik büyüme faktörlerine yanıtta *c-fos* geninin uyarılmasının, RAF/MEK/ERK aracılığıyla olduğu bilinmektedir (Lorenzini ve ark. 2002). Yüksek dereceli osteosarkoma

dahil bazı tümör tiplerinde *c-fos* ifadesinin arttığı ve bu artışın tümör oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Keklikoğlu 2004; Broadhead ve ark. 2011).

ETS1 ve *ETS2* genlerinin kodladığı proteinler ETS transkripsiyon faktör ailesinin üyeleridir (Gen ID: 2113 ve 2114). Bu genler ya transkripsiyon aktivatör olarak ya da pek çok genin baskılayıcısı olarak işlev görürler ve kök hücre gelişimine, hücre yaşlanması ve ölümüne ve tümöregeneze dahil olurlar. Ras-ERK1/2 yolağı tarafından yoluyla aktive edilirler (Dittmer 2003; Buggy ve ark. 2006; Haines ve ark. 2011). *ETS1*'in pek çok tümör hücresinde ilaç direnci ve metastaz gibi farklı olaylarda da önemli rolü bilinmektedir (Kato ve ark. 2012). *ETS2*'nin *CDC2* geninin regülatörü olduğu ve bundan dolayı hücre döngüsünün kontrolünde rol oynadığı bildirilmiştir (Kasten ve Giordano 2001).

EGR1 geni ERK yolağıyla kontrol edilen EGR ailesine ait olan bir transkripsiyon alt regülatörü kodlar (Gen ID: 1958). Bu proteinlerin hedeflerindeki gen ürünleri mitogenez ve farklılaşma için gereklidir (De Sousa ve ark. 2005; Kidambi ve ark. 2010).

PAK1 geni, serin/treonin aile üyesi olan PAK1 protein kinazı kodlar. Bu kinazlar, hücre çoğalması, sağkalım ve hareket olduğu kadar hücre transformasyonu ve tümör gelişiminde de önemli rol oynarlar. PAK1 proteini ERK-MAPK yolağını kolaylaştırma yoluyla transformasyonu teşvik eder. Transform fibroblastlarda PAK1'in Raf ve MEK'i fosforladığı ve Ras/Raf/MAPK yolağının aktivasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Huynh ve ark. 2010).

Bu çalışmada, yukarıda bahsedilen genlerin baskılanması ile hücrelerdeki ERK1/2 yolağının baskılanmış olduğu görülmektedir. Karvakrolün hücre çoğalmasına ve hücre canlılığına katkıda bulunduğu bilinen (Junttila ve ark. 2008) ERK1/2 sinyal yolağını baskılaması yoluyla hücre çoğalmasını baskıladığını ileri sürebiliriz. Buna ek olarak kötü huylu olmayan ve düşük dereceli osteosarkomaya göre yüksek dereceli osteosarkomalarda ifadesi arttığı bilinen *FOS* geninin ifadesi karvakrolün etkisiyle azalmıştır. Bu sebeple bu genin ifadesinin azalmasının karvakrolün osteosarkomada geriletici bir etki göstermesi açısından önemli bir bulgu olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan tüm bu bulguların aksine, hücre canlılığı ve çoğalmasında rolü olduğu bilinen *CREB1* gen ifadesinin artması farklı bir yolağın etkisini düşündürmektedir. Hücre döngüsü ve çoğalmasının

baskılanmasında rolü olan diğer birçok genin ifadesinin azalması düşünüldüğünde, *CREB1* geninin ERK1/p90RSK yolundan bağımsız olarak işlev gördüğü söylenebilir.

Kanser terapisinde MEK-ERK yolağının baskılanması önemli bir terapötik strateji olup, MEK1/2'nin kimyasal olarak baskılanması ile kolon tümör büyümesinin baskılanması konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Junttila ve ark. 2008). Ayrıca Ras/Raf/MEK/ERK yolağı da onkogeneizde önemlidir ve bu yolağın aşırı aktivasyonu insan kanserlerinde sıklıkla görülmektedir (Roux ve Blenis 2004; Ozaki ve ark. 2006). Bu nedenle genel olarak ERK yolağının baskılanması kanser tedavisinde oldukça ilgi çeken bir konudur ve karvakrolün bu etkisi bu konuda ümit verici bir bulgudur.

İfadesi azalan MAPK'lardan olan *MAP2K5* (*MEK5*) geninin kodladığı protein, ERK5 yolağının bir bileşenidir. MAP3K3 (*MEKK3*) tarafından aktive edilebildiği gibi tipik olmayan protein kinaz C izoformlarıyla da (*aPKC*) aktive edilir. MEK5, ERK5 (*MAPK7*) ile etkileşime girer ve onu aktive eder. Büyüme faktör uyarımlı hücre çoğalması ve kas hücre farklılaşmasını kapsayan sinyal şelalesi bu kinaz tarafından denetlenir (Gen ID: 5607). ERK5 yolağıyla ilgili olan genlerden olan *MAP2K5* geninin ifadesi yaklaşık 2 kat azalmış fakat *MAPK7* (*ERK5*) geninin ifadesinde bir değişiklik olmamıştır. Dolayısıyla ERK5 yolağıyla ilgili bir değişiklik gerçekleşmemiş olduğu söylenebilir.

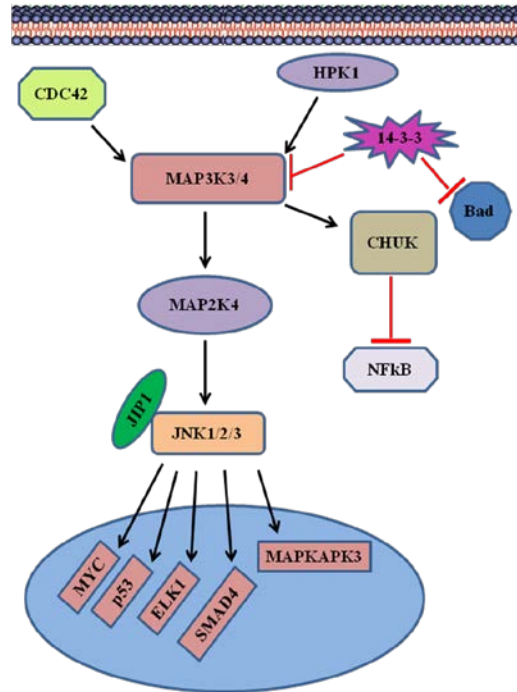
4.3.1.2. JNK yolağı

Karvakrol U-2 OS hücrelerinde JNK yolağı ile ilgili olan 13 adet genin (*MAP3K3*, *MAP3K4*, *MAP2K4*, *JNK1* (*MAPK8*), *JNK2* (*MAPK9*), *JNK3* (*MAPK10*), *p53*, *SMAD4*, *SFN* (*14-3-3*), *CHUK* (*IKKα*), *MAP4K1* (*HPK1*), *MAPK8IP2* (*JIP1*) ve *CDC42*) ifadesinin azalmasına neden olmuştur. Bu genlerden 2 tanesinin (*MAP2K4* ve *MAPK8IP2*) ifadesinin 2 kat ve üzeri olmak üzere önemli derecede azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bir önceki bölümde belirtildiği gibi ERK1/2 yolağı ile de ilgili olan *ELK-1*, *MAPKAPK-3* ve *MYC* (*c-myc*) genlerinin ifadeleri de etkilenmiştir. JNK yolağı ile ilgili

ifadelerinde değişiklik saptanan bu genlerin kodladığı proteinler yolaktaki işlevlerine göre Şekil 4.2’de şematize edilmiştir.

Çeşitli uyaranlara cevap olarak MAP3K1-4 yolağının aktivasyonu MAP2K4’ü aktive eder ve onlar da JNK’ların (JNK1, JNK2 ve JNK3) aktivasyonuna neden olur. Aktif JNK’larda c-myc, p53, Elk-1 ve SMAD4 gibi diğerk transkripsiyon faktörlerini aktive edebilirler (Brozovic ve Osmak 2007; Junttila ve ark. 2008; Plotnikov ve ark. 2011).

SMAD4 geni TGFβ sinyaliyle aktifleşen ve hücre çoğalmasını engelleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Aynı zamanda SMAD proteinleri post-translasyonel modifikasyonları kontrol etmede rol alırlar (Gene ID: 4089). TGFβ sinyal yolağı hem normal hem de tümör hücrelerinde büyüme baskılama sistemi olarak çalışır ve eksikliği, büyüme baskılanmasına direnç oluşumuyla ve kontrolsüz çoğalmayla sonuçlanır. *SMAD4* inaktivasyonunun kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir (Cooper ve Hausman 2006; He ve ark. 2011; Handra-Luca ve ark. 2011). Pankreas ve kolon kanserlerinin %50’sinde *SMAD4* gen inaktivasyonu bulunmuştur (Wang ve ark. 2011).



Şekil 4.2. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde JNK yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması

SFN (14-3-3) geni scaffold işlevi olan bir protein kodlar. Bad gibi pro-apoptotik proteinleri tutarak anti-apoptotik işlev gösterir. 14-3-3'ün Bad'a gösterdiği etkinin benzerini MAP3K1'e gösterdiği, bu nedenle MAP3K1-3'lerin negatif regülatörü olabileceği ileri sürülmektedir (Fanger ve ark. 1998; Xing ve ark. 2000; Sun ve ark. 2011).

CHUK (IKK α) geni farklı kanser hücrelerinde invazyon ve metastaz gibi farklı koşullarda çoklu rol oynar. Prostat kanser hücrelerinde IKK α 'nın baskılanmasının göç, invazyon ve hücre bağlantı yeteneklerini azalttığı (Mahato ve Cheng 2011) ve IKK α 'nın MAP3K1 tarafından fosforilasyonla uyarıldığı ileri sürülmüştür (Lee ve ark. 1998).

MAP4K1 (HPK1) geni tarafından kodlanan protein JNK yolağının işlevsel bir aktivatörüdür. HPK1 MAP3K1'i aktive ederek JNK yolağında işlev görür (Hu ve ark. 1996; Wang ve ark. 1997; Zhou ve ark. 2004)

MAPK8IP2 (JIP1) geni MAP2K7 ve JNK1 ile etkileşen ve onların aktivasyonunu kontrol eden bir scaffold protein kodlar (Gen ID: 23542; Whitmarsh ve ark. 2001).

Rho ailesinin bir üyesi olan *CDC42* geninin kodladığı protein hücre morfolojisi, göçü, endositozu ve hücre döngüsü ilerleyişi gibi farklı hücresel sinyal yollarını kontrol eder. *CDC42* geninin aşırı aktivasyonu tümöregenez dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nöraldejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patogenezlere ile sonuçlanır. IL1 ve TNF α 'ya yanıtta *CDC42* aktivasyonu, MAP3K4'ü regüle ederek JNK yolağının aktivasyonuna yol açar (Gen ID: 998, Hagemann ve Blank 2001; Sinha ve Yang 2008).

İfadeleri azalmış olarak bulunan 14-3-3 ve *CHUK* genlerinin kodladığı proteinlerin aktivasyonunun MAP3K1 ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Fanger ve ark. 1998; Lee ve ark. 1998; Xing ve ark. 2000; Sun ve ark. 2011). Ancak burada 14-3-3 ve *CHUK* genlerinin ifadelerinin azalmasına karşın MAP3K1 geninin ifadesinde bir değişiklik gözlenememesi, MAP3K1 yolağının aktive olmadığını ve pro-apoptotik etkinin meydana geldiği şeklinde yorumlanabilir. Bu durum, başka bir bakış açısı olarak 14-3-3 ve *CHUK* proteinlerinin U-2 OS hücrelerinde ifadesi azalmış olan MAP3K3/4 genlerinin proteinleri ile etkileşimle çalıştığı şeklinde de açıklanabilir. Kanser hücrelerinin

invazyon ve metastazıyla ilgili olan *CHUK* gen ifadesinin karvakrol muamelesi sonucu azalması, insan osteosarkoma hücresi olan U-2 OS hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneğinin azalmasıyla da ilişkilendirilebilir. JNK yolağının yukarı regülatör proteinlerini kodlayan *CDC42*, *14-3-3*, *HPK1* ve *MAP3K4* genlerinin düşük seviyedeki ifadelerinin, aşağı regülatörlerinden olan JNK1/2/3, JIP1 ve diğer nüklear proteinlerini kodlayan genlerin aktivasyonuna ya da genlerin bir şekilde baskılanmasına neden olabileceği ileri sürülebilir. Normal olarak *SMAD4* gen ifadesindeki azalmanın hücre çoğalmasına neden olması beklenirken, burada U-2 OS hücrelerinde çoğalmanın baskılanması TGF β bağımsız olabilir. Diğer yandan yolakla ilişkili diğer birçok genin baskılanması *SMAD4*'ün etkisini baskılamış olabilir.

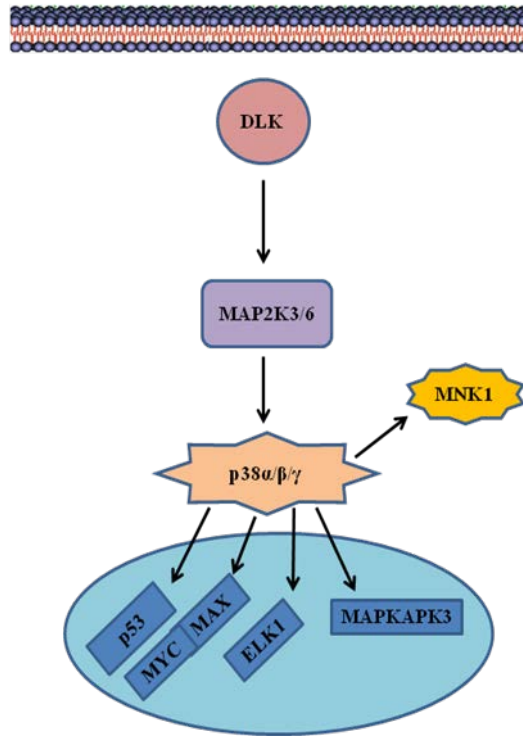
Bütün bu sonuçlar ışığında karvakrol ile muamele sonucunda U-2 OS hücrelerinde JNK yolağının baskılandığı görülmektedir. Çeşitli çalışmalarla JNK yolağının ya hücre ölümünde ya da çoğalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (El-Haibi ve ark. 2011). Kolon kanserinde aşırı JNK ifadesi belirlenmiş ve JNK'nın baskılanması yoluyla rapamisin uyarımlı hücre çoğalmasının azaldığı rapor edilmiştir (Wang ve ark. 2000; Benoit ve ark. 2011). JNK baskılanmasının, G2/M hücre döngüsünün baskılanmasına bağlı olarak T hücreleri, KB-3 epidermoid kanser hücreleri, HepG2 karaciğer kanser hücreleri, Chang kanser hücreleri, HT29 adenokarsinoma, Jurkat ve melanoma gibi farklı hücre tiplerinin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (El-Haibi ve ark. 2011). JNK'nın tümöregeneze ve prostat kanser gelişimine aracılık yaptığı ileri sürülmüştür (Yang ve ark. 2003). Yapılan tüm bu çalışmalarda JNK'nın bazı normal ve kanserli hücrelerin çoğalmasında işlevi olduğu ileri sürülmüştür. U-2 OS hücrelerinin çoğalmasında JNK'nın rolü olabileceği ve karvakrolün bu hücrelerde JNK yolağını baskılayabileceği düşünülmektedir.

4.3.1.3. p38 yolağı

Karvakrol U-2 OS hücrelerinde p38 yolağı ile ilgili olan 8 adet genin (*DLK*, *MAP2K3*, *MAP2K6*, *p38 α* (*MAPK14*), *p38 β* (*MAPK11*), *p38 γ* (*MAPK12*), *MAX* ve *COL1A1*) ifadesinin azalmasına neden olmuştur. Ayrıca karvakrolün bu

genlerden 4 tanesinin (**MAP2K3**, **MAP2K5**, **MAPK12** ve **MAX**) ifadesini 2 kat ve üzeri azalttığı belirlenmiştir. Bunların yanı sıra daha önce ERK1/2 ve JNK bölümlerinde de bahsedilen ve ifadesi azalmış olan **Elk-1**, **MNK1**, **p53** ve **MAPKAPK-3** genlerinin ve ifadesi artmış olan **CREB1** geninin de p38 yolağında rolleri bulunmaktadır. p38 yolağı ile ilgili ifadelerinde değişiklik saptanan bu genlerin kodladığı proteinler yolaktaki işlevlerine göre Şekil 4.3’de şematize edilmiştir.

DLK geni kodladığı MAP3K, MAP2K3 ve 6’yı aktive eder ve onlar da p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11) ve p38 γ (MAPK12) proteinlerinin fosforilasyonlarına neden olurlar. Aktif p38 MAPK’ların da p53, MAX ve Elk-1 transkripsiyon faktörlerini aktive edebildikleri bilinmektedir. MNK1 ve MAPKAPK-3 gibi diğer bazı kinazlar da p38’in aktive ettiği subsratlar arasındadır (Zhao ve ark. 1999; Keren ve ark. 2006; Cuenda ve Rousseau 2007; Brozovic ve Osmak 2007; Junttila ve ark. 2008).



Şekil 4.3. Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde p38 yolağıyla ilgili olan ifadesi baskılanan genlerin kodladığı proteinlerin model aktivasyon şeması

MAX geni homodimer ya da Myc-Mad proteinleri ile heterodimer oluşturan bir transkripsiyon faktör kodlar (Lüscher 2001). Myc-Max-Mad heterodimeri ise farklı hedef genlerin E-kutu DNA elementine bağlanarak transkripsiyonunu düzenler ve hücre döngüsü, çoğalma ve farklılaşmayı içine alan değişik hücre davranışlarını etkiler (Zada ve ark. 2006).

COL1A1 geni kemik, kornea, deri ve tendonda bol miktarda bulunan ve fibril oluşturan tip 1 kolajen pro-alfa zinciri kodlar (Gen ID:1277). *COL1A1* gen ifadesinin TGF- β 2 tarafından aktive edildiği ve bu aktivasyonun kimyasal aracılı p38 MAPK baskılanmasıyla engellendiği gösterilmiştir (Kimoto ve ark. 2004).

CREB1, *Elk-1*, *MNK1* ve *MAPKAPK3* genlerinin kodladığı proteinlerin de p38, ERK1/2 ve/veya JNK yolaklarında aktive olabildikleri bilinmektedir. Özellikle MNK1'in sinyal içeriğine bağlı olarak p38 MAPK aracılığıyla güçlü bir şekilde aktive edildiği gösterilmiştir (Ueda ve ark. 2004; Worch ve ark. 2004; Keren ve ark. 2008).

p38 yolağının aktivasyonu bazı durumlarda apoptoz için gerekli olduğu halde bazı durumlarda hücrelerin çoğalması için gerekli olabilmektedir. p38 MAPK'ların baskılanmasının kanser hücrelerinde çoğalmayı engellediğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Junttila ve ark. 2008). Örneğin; insan solunum yolu düz kas hücreleri (ASM), pankreatik β hücreleri (MIN6 β), küçük hücreli olmayan insan akciğer kanser tümörlerinde, mürin mikrogial hücre (BV-2) ve baş ve boyun skuamöz kanser hücreleri (HNSCC) gibi farklı hücre tiplerinde p38 yolağı aktivasyonunun gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Burns ve ark. 2000; Greenberg ve ark. 2002; Fernandes ve ark. 2004; Junttila ve ark. 2007; Svensson ve ark. 2011). HNSCC ve transform skuamöz epitelyum hücrelerinde invazyon ve çoğalmayı teşvik ettiği ve bu nedenle p38 MAPK'ların izoforma özgü baskılanmasının kanser terapisi için bir uygulama olabileceği bildirilmiştir (Johansson ve ark. 2000; Junttila ve ark. 2007).

Tüm bu bilgiler bazı normal ve kanser hücrelerinin canlılığı ve çoğalması için p38 yolağının aktivasyonu gerekli olduğunu göstermektedir. U-2 OS hücrelerinin de canlılığı ve çoğalması için p38 aktivasyonu gerekli olabilir. Dolayısıyla karvakrol ile muamele edilen U-2 OS hücrelerinde ERK1/2 ve JNK yolağının baskılanması gibi p38 yolağının baskılanması da hücre canlılığının ve

çoğalmasının baskılanması şeklinde yorumlanabilir. *COL1A1* geninin kodladığı proteininin kemikte bol miktarda bulunmasından dolayı, bu genin bir osteosarkoma hücresi olan U-2 OS hücrelerinde ifade edilmesi beklenebilecek bir durumdur. *COL1A1* genin ifadesi p38 yolağına bağlı olduğundan, karvakrolün etkisiyle p38 yolağının baskılanması *COL1A1* geninin ifadesinin azalmasına yol açmıştır diyebiliriz.

Karvakrolün U-2 OS hücrelerinde apoptoza yol açtığı AO/EB boyama yöntemiyle belirlenmiştir. Ancak RT-PCR² plaka sonuçlarına göre *p53* geninin ifadesi azalmıştır. *p53*, JNK ve p38 yolağının hedef transkripsiyon faktörlerinden biridir ve DNA hasarlı hücrelerin çoğalmasını baskılayarak, apoptotik süreci uyarmak için *Bax* gibi genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Junttila ve ark. 2008). Yapılan bir çalışmada, H322 hücrelerinde genistein-uyarımlı apoptozda *p53* geninin ifadesinde bir değişiklik olmadığı bulunmuş ve *p53* bağımsız bir yolak ile apoptozun olduğu öne sürülmüştür (Sarkar ve Li 2004). *p53* gen ifadesinde bir artışın olmaması nedeniyle karvakrolün U-2 OS hücrelerinde *p53* bağımsız yolak aracılığıyla apoptoza neden olduğu söylenebilir. Ancak daha net bir sonuç için AO/EB yöntemine ek başka apoptoz belirleme yöntemleri uygulanabilir.

MYC (*c-myc*) geninin kodladığı çok işlevli nükleer fosfoprotein, hücrelerin hücre döngüsüne girmesinde ve çıkmasında, pek çok hücre tipinde terminal farklılaşmasını engellemesinde rolü olduğu bilinmektedir. Osteosarkoma dahil çeşitli tümöregeneze dahil edilmişlerdir. *MYC* proteini ERK1/2 ve JNK yolağının aktive ettiği transkripsiyon faktörleri arasında bulunmaktadır (Gen ID: 4609; Lüscher 2001; Hurlin ve Huang 2006; Junttila ve ark. 2008; Broadhead ve ark. 2011). Burada, karvakrol U-2 OS hücrelerinde *MYC* geninin ifadesini artmıştır. ERK1/2 ve JNK yolağı baskılandığından dolayı *MYC* geninin ifadesinin artmasının, ERK1/2 ve JNK yolağıyla ilgili olmadığı anlaşılmaktadır. *MYC*'in transkripsiyon alt regülatör fonksiyonunu görebilmesi için MAX ile heterodimer oluşturması gereklidir. *MAX* geninin ifadesinin azalmasının *MYC*'in MAX ile heterodimer oluşturmaya engel oluşturduğu ve dolayısıyla *MAX* geninin ifadesinin azalmasının, *MYC* geninin transkripsiyonel fonksiyonunu engellediği

söylenbilir. Osteosarkoma patogenezinin dahil edilen *MYC* geninin ifadesinin artmasının U-2 OS hücreleriyle ilgili olduğu da düşünülebilir.

Üç MAPK yolağı (ERK1/2, JNK ve p38) tarafından da aktive edilebilen *MAPKAPK-3* ve *ELK-1* genlerinin ve ERK ve/veya p38 MAPK yolaklarıyla aktive edilebilen *MNK1* geninin ifadesinin azalmasının ERK1/2, JNK ve p38 yolaklarının baskılanmasından kaynaklandığı söylenbilir. Hücre çoğalmasıyla ilişkili olan bu genlerin ifadesinin azalmasının da hücre çoğalmasının baskılanmasıyla ilişkili olduğu şeklinde bir değerlendirme yapmak mümkündür.

Karvakrolün MAPK yolağına etkisini inceleyen ikinci bir çalışmada karvakrolün HepG2 hücrelerinde ERK1/2 yolağının aktivasyonunu azalttığı, bizim elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak JNK yolağında bir değişikliğe yol açmadığı ve p38 yolağını ise aktive ettiği ve bundan dolayı karvakrolün hücre çoğalmasını baskıladığı ve apoptozu uyardığı ileri sürülmüştür (Yin ve ark. 2011). Bu çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak p38 yolağının apoptozu uyarmasının, hücre hatlarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülebilir. Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi bazı hücre tiplerinde p38 MAPK yolağı apoptozu uyarabildiği gibi, bazılarında hücre çoğalmasını teşvik etmektedir (Junttila ve ark. 2008). Bunun yanında her iki çalışmada da ERK1/2 MAPK yolağının baskılandığı ve bu nedenle karvakrolün bu hücrelerde hücre canlılığı ve çoğalmasını baskıladığı sonucuna ulaşılması birbirini destekleyici bir bulgudur.

4.3.1.4. Hücre döngüsü yolağı

Karvakrol ile muamele edilen U-2 OS'larda, hücre döngüsünde görev alan siklinleri kodlayan *CCNA1* (*siklin A1*), *CCNB1* (*siklin B1*), *CCNB2* (*siklin B2*), *CCND1* (*siklin D1*), *CCND2* (*siklin D2*) ve *CCND3* (*siklin D3*) genlerinin, CDKI'leri kodlayan *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2B*, *CDKN2C* ve *CDKN2D* genlerinin ve *RB1* ile *E2F1* genlerinin ifadesi azalmıştır. Ayrıca bu genlerden 2 tanesinin (*CCNA1* ve *CDKN2C*) ifadesinin 2 kat ve üzeri olmak üzere önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Hücre döngüsü yolağı ile ilgili ifadelerinde değişiklik saptanan bu genlerin kodladığı proteinler yolaktaki işlevlerine göre Şekil 4.4'de şematize edilmiştir.

Siklin D1 proteini CDK4 veya CDK6'nın regülatör alt ünitesi olarak işlev görür. Rb proteini ile etkileşimi olduğu ve bu genin ifadesinin Rb tarafından pozitif olarak kontrol edildiği gösterilmiştir (Gen ID: 595). D tipi siklinler, büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak ifade edilen başlama siklinleri olarak bilinirler (Engin ve Özyardımcı 2011).

Siklin D2 ve siklin D3 proteinleri G1/S geçişi için gerekli olan CDK4 veya CDK6'nın regülatör alt ünitesi olarak işlev görürler. Bu proteinlerin Rb'nin fosforilasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir (Gen ID: 894; Gen ID: 896).

Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden (CDKI) Ink ailesinde bulunan p15 (CDKN2B), p18 (CDKN2C) ve p19 (CDKN2D) proteinleri G1 fazındaki CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak siklin-CDK kompleks oluşumunu baskılar. Bu CDKI'lar G1 ilerleyişini kontrol eden hücre büyüme regülatörü olarak işlev görürler (Gen ID: 1030; Gen ID: 1031; Gen ID: 1032; Cabadak 2008).

CDKI'lerinin Cip/Kip ailesinde ise p27 (CDKN1B) ve p57 (CDKN1C) bulunmaktadır. p27 proteini siklin E-CDK2 veya siklin D-CDK4 komplekslerinin aktivasyonunu engelleyerek G1'in devamlılığını kontrol eder. p57 ise çeşitli G1 siklin/CDK komplekslerinin güçlü baskılayıcısı ve hücre çoğalmasının negatif regülatörüdür (Gen ID: 1027; Gen ID: 1028; Cabadak 2008).

Daha önce belirtildiği gibi karvakrol U-2 OS hücrelerinde ERK1/2, JNK ve p38 MAPK yollarını baskılamıştır. Bu sebeple hücre çoğalmasını engellemiş olabilir. Hücre çoğalmasının baskılanması sonucunda, hücre döngüsü ilerleyişi için gerekli olan siklinlerin ifadesinin azalması beklenen bir durumdur. Siklinlerin yanında, bazı CDKI (siklin bağımlı kinaz inhibitör) genlerinin de ifadesi azalmıştır. CDKI'ler de, siklin, CDK ve siklin-CDK komplekslerine bağlanarak hücre döngüsünü düzenlerler. Siklinlerin ifadesinin azalması, siklin-CDK kompleks oluşumunun azalmasına ve bundan dolayı siklinleri, CDK'ları ve siklin-CDK komplekslerini baskılayan siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin de ifadesinin azalmasına yol açmış olabileceği ileri sürülebilir.

RB1'in aktif hipofosforile formu E2F1 transkripsiyon faktörünü baskılar (Gen ID: 5925). E2F1'in üyesi olduğu E2F ailesi hücre döngüsünün ve tümör baskılayıcı proteinlerin kontrolünde rol oynar (Gen ID: 1869). Karvakrol muamelesi ile U-2 OS hücrelerinde *E2F1* ve *RB1* genlerinin ifadesinin azalması

hücre çoğalmasının baskılanmasıyla ilişkilendirilebilir. Burada E2F1'in azalması hücre döngüsü ilerleyişini durdurmak için ona bağlanan Rb'nin azalmasına yol açmış olabilir.

4.3.2. Sisplatinin U-2 OS hücresi MAPK sinyal yolağıyla ilgili genlerin ifadesine etkisi

Karvakrolün etkisini karşılaştırmak amacıyla, pozitif kontrol olarak seçilen sisplatinin U-2 OS hücrelerinde aynı genlerin ifadesi üzerine etkisi araştırılmış ve **CCNA1 (Siklin A1)**, **CREBBP**, **HSPA5**, **MAP2K5**, **MAP2K6**, **MKNK1** ve **MOS** genlerinin ifadelerinin etkilendiği bulunmuştur. Bu genlerden **HSPA5** ve **MEF2C** genlerinin yaklaşık 2 kat, **MAP2K6** geninin ifadesinin ise yaklaşık 5 kat olmak üzere önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. **CCNA1**'in ifadesinin karvakrol ile muamele sonucunda azaldığı gözlenirken, sisplatin ile muamele sonucunda arttığı bulunmuştur. Ayrıca **MAP2K5**, **MAP2K6**, **MOS** ve **MKNK1** genlerinin hem sisplatin hem de karvakrol ile muamele sonucunda ifadelerinin benzer şekilde azaldığı belirlenmiştir.

Burada daha önceki bölümlerde ifadesinde değişiklik olmayan üç gen için kısa açıklama yapılacaktır. Bunlardan **CREBBP** geni yaygın olarak ifade edilir ve kodladığı protein c-fos, c-jun ve c-myc gibi pek çok transkripsiyon faktörlerinin ko-aktivatörü olarak işlev görür. CREBBP proteini intrinsik histon asetil transferaz aktivitesine sahip olup protein etkileşimlerini stabile etmek için scaffold gibi etki eder (Gen ID: 1387; Kumar ve ark. 2011).

HSPA5 (GRP78) geni ise bir şaperon protein kodlar. Hemen hemen tüm hücrelerin endoplazmik retikulumunda bulunur ve protein katlanmasına ve toplanmasına dahil olurlar. **GRP78**'in ifadesinin farklı stres koşulları ve ajanlar tarafından önemli derecede arttığı ve tümör çoğalmasında, tümör anjiogenezinde ve antitümör direncinde önemli rollerinin olduğu belirlenmiştir (Gen ID:3309; Xing ve ark. 2011).

MEF2C geni de memeli gelişimi boyunca, pek çok hücre tipinin gelişimi ve farklılaşmasında anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörü kodlar (Gen ID: 4208; Han ve Molkenstein 2000; De Val ve ark. 2004; Brozovic ve Osmak 2007; Junttila ve ark. 2008).

Sisplatin muamelesinin U-2 OS hücrelerinde *siklin A1* geninin ifadesini artırması oldukça ilginçtir ve beklenen bir durum değildir. Ancak *siklin A1* geni aktive olmuş fakat protein olarak üretilmemiş olabilir ya da üretilmişse bile birlikte aktivite gösterecek proteinler olmadığından hücre çoğalmasında etkisiz olabilir. Hücre çoğalmasındaki rollerinden dolayı *CREBBP*, *HSPA5*, *MAP2K5*, *MEF2C*, *MNK1* ve *MOS* genlerinin ifadelerindeki azalma hücre çoğalmasının baskılanmasıyla ilişkili olabilir. Ancak ERK5 yolağının diğer MAPK bileşenlerinin ifadesinde bir değişiklik olmamasından dolayı, *MAP2K5* geninin ifadesindeki azalmanın bu yolak ile bağlantısı olmayabilir. Diğer yandan *MAP2K6* geninin ifadesinin azalması p38 MAPK'ların baskılanmasıyla ilgili olabilir. Gatti ve arkadaşları (2002) sisplatinin U-2 OS hücrelerinde *p53* ifadesini uyarak apoptoza yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Ancak bizim çalışmamızda farklı olarak, sisplatin *p53*'ün ifadesinde bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. Dolayısıyla U-2 OS hücrelerinde sisplatin uyarımlı apoptozun *p53* bağımlı yolak aracılığıyla gerçekleşmediği söylenebilir.

Sonuç olarak sisplatinin, hücre çoğalmasıyla ilişkili olan ***CCNA1 (Siklin A1)*** geninin ifadesinin artmasına, ***CREBBP***, ***HSPA5***, ***MNK1***, ***MOS***, ***MEF2C***, ***MAP2K5*** ve ***MAP2K6*** genlerinin ifadesinin azalmasına yol açtığı, buna rağmen hücre canlılığı ve çoğalmasını denetleyen MAPK yolaklarında bir değişiklik oluşturmadığı görülmektedir. Ayrıca hücre döngüsünün ilerleyişinde rol oynayan siklin A1 dışında, siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitör genlerinden hiçbirinin ifadesinde bir değişiklik oluşturmamıştır.

4.4. Sonuç

Karvakrolün F2408, 5RP7 ve U-2 OS hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkiler gösterdiği MTT ve NR sitotoksosite testleriyle ve AO/EB çift boyama yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca insan MAPK ve apoptoz yolağı ile ilgili 88 farklı genin yer aldığı RT²-PCR plakaları ile karvakrolün ve sisplatinin U-2 OS hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre karvakrolün MAPK sinyal yolağıyla ilgili 56 genin ifadesini azalttığı ve 2 adet genin ifadesini ise arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca karvakrolün bu genlerden 13 tanesinin ifadesini

2 kat ve üzeri olmak üzere önemli derecede değiştirdiği belirlenmiştir. Yapılan analizler ışığında karvakrolün U-2 OS hücrelerindeki ERK1/2, JNK, p38 MAPK ve hücre döngüsü yolaklarını baskıladığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda karvakrolün U-2 OS osteosarkoma hücrelerinde güçlü bir canlılık ve çoğalma baskılayıcı ajan olarak aktiviteye sahip olduğu görölmektedir. Bu nedenle karvakrol en azından osteosarkoma olmak üzere çeşitli kanserlerde terapötik potansiyele sahip olabilir.

Ayrıca pozitif kontrol olarak sisplatinin hücre çoğalmasıyla ilgili bazı genleri baskılaması, buna rağmen MAPK yolaklarında bir değişikliğe yol açmaması, sisplatinin U-2 OS hücrelerinde karvakrole pozitif kontrol olabilecek etkiyi göstermediğini ve karvakrolün sisplatinden daha etkili bir hücre çoğalma baskılayıcısı olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, K. ve Matsuki, N. (2000), "Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT," *Neuroscience Research*, **38**, 325–329.
- Ahlander, J. ve Bosco, G. (2009), "The RB/E2F pathway and regulation of RNA processing," *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **384**, 280–283.
- Akalın, G. ve İncesu, Z. (2011), "The effects of carvacrol on apoptosis of H-Ras and N-Ras transformed cell lines," *Turk J. Pharm. Sci.*, **8 (2)**, 105–116.
- Akao, Y., Noguchi, S., Iio, A., Kojima, K., Takagi, T. ve Naoe, T. (2011), "Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells," *Cancer Letter*, **300**, 197–204.
- Akşit, H. ve Bildik, A. (2008), "Apoptozis," *YYÜ Vet Fak Derg.*, **19 (1)**, 55–63.
- Akyol, H. (2004), "Kemoterapinin temel ilkeleri," *XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı*, 159–163.
http://www.tyop.org.tr/pdf/hem_1.pdf
- Ali, B. H., Blunden, G., Tanira, M. O. ve Nemmar, A. (2008), "Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger," *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 409–420.
- Altunkaynak, B. Z. ve Özbek, E. (2008), "Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?," *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **6 (2)**, 93–104.
- Arfa, A. B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. ve Chalier, P. (2006), "Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure," *Letters in Applied Microbiology*, **43**, 149–154.
- Aristatile, B., Al-Numair, K. S., Al-Assaf, A. H., Veeramani, C. ve Pugalendi, K. V. (2010), "Protective effect of carvacrol on oxidative stress and cellular DNA damage induced by UVB irradiation in human peripheral lymphocytes," *J Biochem Molecular Toxicology*, **00**, 1–11.

- Arkan, S. ve Aydın, Y. (2008), *Karvakrol ve Timol'un izole sıçan kalp kası üzerine etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Arunasree, K. M. (2010), "Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231," *Phytomedicine*, **17**, 581–588.
- Aydın, S. ve Öztürk, Y. (1996), "Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity," *Phytotherapy Research*," **10**, 342–344.
- Aydın, S., Başaran, A. ve Başaran, N. (2005a), "Modulating effects of Thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes," *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1299–1305.
- Aydın, S., Başaran, A. ve Başaran, N. (2005b), "The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C," *Mutation Research*, **581**, 43–53.
- Aydın, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K. ve Aydın, S. (2007), "Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats," *Planta Medica*, **73 (13)**, 1365–1371.
- Babich, H. ve Borenfreund, E. (1991), "Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay," *Applied and Environmental Microbiology*, **57 (7)**, 2101–2103.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. ve Idaomar, M. (2008), "Biological effects of essential oils," *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- Balunas, M. J. ve Kinghorn, A. D. (2005), "Drug discovery from medicinal plants," *Life Sciences*, **78**, 431–441.
- Baskic, D., Popovic, S., Ristic, P. ve Arsenijevic, N. N. (2006), "Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide," *Cell Biology International*, **30**, 924–932.
- Başer, K. H. C. (2008), "Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils," *Current Pharmaceutical Design*, **14**, 3106–3120.

- Baytop, T. ve Kadioğlu, D. (2002), *İstanbul Bölgesi'nin Tıbbi Bitkileri*, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Benoit, M., Dormond-Meuwly, A., Demartines, N. ve Dormond, O. (2011), "Targeting the JNK signaling pathway potentiates the antiproliferative efficacy of rapamycin in LS174T colon cancer cells," *Journal of Surgical Research*, **167**, e193–e198.
- Bertram, J. S. (2001), "The molecular biology of cancer," *Molecular Aspects of Medicine*, **21**, 167–223.
- Bold, R. J., Termuhlen, P. M. ve McConkey, J. (1997), "Apoptosis, cancer and cancer therapy," *Surgical Oncology*, **6 (3)**, 133–142.
- Borralho, P. M., Silva, I. B. M., Aranha, M. M., Albuquerque, C., Leitão, C. N., Steer, C. J. ve Rodrigues, C. M. P. (2007), "Inhibition of Fas expression by RNAi modulates 5-fluorouracil-induced apoptosis in HCT116 cells expressing wild-type p53," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1772**, 40–47.
- Brago, P., Armesilla, A., Silva, A. ve Porras, A. (2007), "Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38a MAPK activation through ROS generation," *Apoptosis*, **12**, 1733–1742.
- Broadhead, M. L., Clark, J. C. M., Myers, D. E., Dass, C. R. ve Choong, P. F. M. (2011), "The molecular pathogenesis of osteosarcoma: A review," *Sarcoma*, **2011**, 1-12.
- Brozovic, A. ve Osmak, M. (2008), "Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance," *Cancer Letters*, **251**, 1–16.
- Buchwalter, G., Gross, C. ve Wasylyk, B. (2004), "Ets ternary complex transcription factors," *Gene*, **324**, 1–14.
- Buggy, Y., Maguire, T.M., McDermott, E., Hill, A.D.K., O'Higgins, N. ve Duffy, M.J. (2006), "Ets2 transcription factor in normal and neoplastic human breast tissue," *European Journal of Cancer*, **42**, 485–491.
- Bunkova, R., Marova, I., Pokorna, Z. ve Lojek, A. (2005), "Analysis of plant extracts antimutagenicity using the Ames test and the cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes," *Food Science and Technology International*, **11 (2)**, 107–112.

- Burns, C. J., Squires, P. E. ve Persaud, S. J. (2000), "Signaling through the p38 and p42/44 mitogen-activated families of protein kinases in pancreatic β -cell proliferation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **268**, 541–546.
- Cabadak, H. (2008), "Hücre Siklusu ve Kanser," *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **9** (3), 51–61.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslu, S., Demirustu, C., Aral, E. ve Baser, K. H. C. (2008), "Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver," *Phytomedicine*, **15**, 447–452.
- Cañóñ, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S. ve Aranda, A. (2004), "Rapid Effects of Retinoic Acid on CREB and ERK Phosphorylation in Neuronal Cells," *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 5583–5592,
- Cepeda, V., Fuertes¹, M. A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C. ve Pérez, J. M. (2007), "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **7**, 3–18.
- Chen, D. ve Dou, Q. P. (2008), "Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy," *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1196–1206.
- Chiba, K., Kawakami, K. ve Tohyama, K. (1998), "Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells," *Toxicology in Vitro*, **12**, 251–258.
- Cho, S., Choi, Y., Park, S. ve Park, T. (2012), "Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **23** (2), 192–201.
- Choi, B. K., Choi, C. H., Oh, H. L. ve Kim, Y. K. (2004), "Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cells," *Neuro Toxicology*, **25**, 915–924.
- Cooper, G. M. ve Hausman, R. E. (2006), *Hücre Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- Crowell, P. L. (1999), "Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes," *J. Nutr.*, **129**, 775S–778S.

- Cruchten, S. V. ve Broeck, V. D. (2002), "Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis," *Anat. Histol. Embryol.*, **31**, 214–223.
- Cuenda, A. ve Rousseau, S. (2007), "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773**, 1358–1375.
- Çoban, Ö. E. ve Patır, B. (2010), "Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı," *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **5** (2), 7–19.
- De Sousa, L. P., Brasil, B. S. A. F., Silva, B. M., Freitas, M. H. A., Nogueira, S. V., Ferreira, P. C. P., Kroon, E. G. ve Bonjardim, C. A. (2005), "Plasminogen/plasmin regulates c-fos and egr-1 expression via the MEK/ERK pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **329**, 237–245.
- De Val, S., Anderson, J. P., Heidt, A. B., Khiem, D., Xu, S. M. ve Black, B. L. (2004), "Mef2c is activated directly by Ets transcription factors through an evolutionarily conserved endothelial cell-specific enhancer," *Developmental Biology*, **275**, 424–434.
- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L. ve Echeverrigaray, S. (2007), "Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil," *Food Chemistry*, **100**, 603–608.
- Demir, G. (2007), "Akciğer kanserlerinde kemoterapi," *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*, **58**, 175–178.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. ve Kolch, W. (2007), "MAP kinase signalling pathways in cancer," *Oncogene*, **26**, 3279–3290.
- Diamandis, E. P. (1997), "Clinical applications of tumor supressor genes and oncogenes in cancer," *Clinica Chimica Acta.*, **257**, 157–180.
- Dilsiz, N. (2004), *Moleküler Biyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Dittmer, J. (2003), "The biology of the Ets1 proto-oncogene," *Molecular Cancer*, **2** (29).
- Doğan, A. L. ve Güç, D. (2004), "Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser," *Hacettepe Tıp Dergisi*, **35**, 34–42.

- Downward, J. (2003), "Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy," *Nature Reviews*, **3 (1)**, 11–22.
- Duke, R. C. (2004), "Methods of analysing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays," *Methods in Molecular Biology*, **282**, 43–66.
- Eisenberg, S. ve Henis, Y. I. (2007), "Interactions of Ras proteins with plasma membrane and their roles in signaling," *Cellular Signaling*, **20**, 31–39.
- El-Haibi, C. P., Singh, R., Sharma, P. K., Singh, S. ve Lillard, W. J. (2011), "CXCL13 mediates prostate cancer cell proliferation through JNK signalling and invasion through ERK activation," *Cell Proliferation*, **44**, 311–319.
- Elmore, S. (2007), "Apoptosis: A review of programmed cell death," *Toxicol Pathol.*, **35 (4)**, 495–516.
- Engin, K. ve Özyardımcı, N. (2001) "Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve uygulamalar," *Hücre Siklusu ve Apoptozis* (Ed: Ulukaya, E.), Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.
- Erdemoğlu, N. ve Şener, B. (2000), "Taksan sınıfı bileşiklerin antitümör etkileri," *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **29 (1)**, 77–90.
- Eskicioğlu, F., Baytur, Y., İnceboz, Ü. ve Postacı, C. (2005), "Sisplatin kemoterapisini izleyen persistan hipomagnezemi ve tetani," *Ege Tıp Dergisi*, **44 (1)**, 63–65.
- Fanger, G. R., Widmann, C., Porter, A. C., Sather, S., Johnson, G. L. ve Vaillancourt, R. R. (1998), "14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases," *The Journal of Biological Chemistry*, **273 (6)**, 3476–3483.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2011), "Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi," *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, **11 (1)**, 52–67.
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D. ve Philips, M. (2009), "Ras/MAPK signaling from endomembranes," *Molecular Oncology*, **3**, 297–307.
- Fernandes, D. J., Ravenhall, C. E., Harris, T., Tran, T., Vlahos, R. ve Stewart, A. G. (2004), "Contribution of the p38^{MAPK} signalling pathway to

- proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific,” *British Journal of Pharmacology*, **142**, 1182–1190.
- Fernandez, J. –A. (2006), “Anticancer properties of saffron, *Crocus sativus* Linn,” *Lead Molecules from Natural Products*, **2**, 313–330.
- Fisunoğlu, M. ve Besler, H. T. (2008), “Çay ve sağlık ilişkisi, ” Sağlık Bakanlığı, 727, Ankara.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J. A. (2006), “In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride,” *Toxicology Letters*, **160**, 171–177.
- Gately, D. P. ve Howell, S. B. (1993), “Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review,” *Br. J. Cancer*, **67**, 1171–1176.
- Gatti, L., Supino, R., Perego, P., Pavesi, R., Caserini, C., Carenini, N., Righetti, S. C., Zuco, V. ve Zunino, F. (2002), “Apoptosis and growth arrest induced by platinum compounds in U2-OS cells reflect a specific DNA damage recognition associated with a different p53-mediated response,” *Cell Death and Differentiation*, **9**, 1352 – 1359.
- Gene home, Genes and mapped phenotypes, National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Gewies, A. (2003), Introduction to Apoptosis.
<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N. ve Tzimou-Tsitouridou, R. (2003), “Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE),” *Talanta*, **61**, 103–112.
- Goettel, J. A., Liang, D., Hilliard, V. C., Edelblum, K. L., Broadus, M. R., Gould, K. L., Hanks, S. K. ve Polk, D. B. (2011), “KSR1 is a functional protein kinase capable of serine autophosphorylation and direct phosphorylation of MEK1,” *Experimental Cell Research*, **317**, 452–463.
- Goto, T., Takahashi, N., Hirai, S. ve Kawada, T. (2010), “Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism,” *PPAR Research*, **2010**, 1-9.

- Gradishar, W. J. ve Vokes, E. E. (1990), "5-Fluorouracil cardiotoxicity: A critical review," *Annals of Oncology*, **1**, 409–41.
- Greenberg, A. K., Basu, S., Hu, J., Yie, T., Tchou-Wong, K. M., Rom, W. N. ve Lee, T. C. (2002), "Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **26**, 558–564.
- Güneş, H. V. (2003), *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitabevi, Eskişehir.
- Gürbüz, V., Yılmaz, A., Gökçe, Ö. ve Konaç, E. (2011), "İnsan kolon kanser hücre hattında (HT29) sisplatinin apoptotik etkisi," *Marmara Medical Journal*, **24 (2)**, 100-105.
- Hagemann, C. ve Blank, J. L. (2001), "The ups and downs of MEK kinase interactions," *Cellular Signalling*, **13**, 863– 875.
- Haines, P., Samuel, G. H., Cohen, H., Trojanowska, M. ve Bujor, A. M. (2011), "Caveolin-1 is a negative regulator of MMP-1 gene expression in human dermal fibroblasts via inhibition of Erk1/2/Ets1 signaling pathway," *Journal of Dermatological Science*, **64**, 210–216.
- Han, J. ve Molkenstein, J. D. (2000), "Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology," *TCM.*, **10**, 19–22.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2000), "The hallmarks of cancer," *Cell, Pres.*, **100**, 57–70.
- Hande, K. R. (1998), "Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II.," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**, 173–184.
- Handra-Luca, A., Olschwang, S. ve J. F., Fléjou (2011), "SMAD4 protein expression and cell proliferation in colorectal adenocarcinomas," *Virchows Arch.*, **459**, 511–519.
- Hayashi, Y. (1992), "Overview of genotoxic carcinogens and non-genotoxic carcinogens," *Exp Toxicol Pathol.*, **44 (8)**, 465–71.
- He, L., Mo, H., Hadisusilo, S., Qureshi, A. A. ve Elson, C. E. (1997), "Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo," *The Journal of Nutrition*, **127**, 668–674.
- He, S., Zhao, Z., Wang, Y., Zhao, Y., Wang, L., Hou, F. ve Gao, G. (2011), "Reduced expression of SMAD4 in gliomas correlates with progression

- and survival of patients,” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**, 1–70.
- Hisham, Z. A. S., Omar, W. H. H. W., Ariffin, Z. Z., Saflan, M. F., Senafi, S. ve Wahab, R. M. A. (2009), “Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line,” *Cancer Cell International*, **9**, 6.
- Holm, C., Øra, I., Brunhoff, C., Anagnostaki, L., Landberg, G. ve Persson, J. L. (2006), “Cyclin A1 expression and associations with disease characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia,” *Leukemia Research*, **30**, 254–261.
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S. ve Inoue, H. (2011), “Carvacrol, a component of Thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression,” *Journal of Lipid Research*, **5**, 132–139.
- Hu., M. C. -T., Qui, W. R., Wang, X., Meyer, C. F. ve Tan, T. -H. (1996), “Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade,” *Genes & Development*, **10**, 2251–2264.
- Huang, L., Pan, C. Q., Li, B., Tucker-Kellogg, L., Tidor, B., Chen, Y. ve Low, B. C. (2011), “Simulating EGFR-ERK signaling control by scaffold proteins KSR and MP1 reveals differential ligand-sensitivity co-regulated by Cbl-CIN85 and endophilin,” *Plos One.*, **6 (8)**, 1-15
- Hurlin, P.J. ve Huang, J. (2006), “The MAX–interacting transcription factor network,” *Seminars in Cancer Biology.*, **16**, 265–274.
- Huynh, N., Liu, K. H., Baldwin, G. S. ve He, H. (2010), “P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways,” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1803**, 1106–1113.
- Ilgin, S. ve Ergun, B. (2010), *Toksikoloji, besin güvenliği ve çevre sağlığı*, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi, Eskişehir.
- Inoue, D., Ohe, M., Kanemori, Y., Nobui, T. ve Sagata, N. (2007), “A direct link of the Mos–MAPK pathway to Erp1/Emi2 in meiotic arrest of *Xenopus laevis* eggs,” *Nature*, **446**, 1100-1104.

- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M. ve Baser, K. H. C. (2005), "Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test," *Food Chemistry*, **93**, 551–556.
- Ishii, T., Teramoto, S. ve Matsuse, T. (2004), "GSTP1 affects chemoresistance against camptothecin in human lung adenocarcinoma cells," *Cancer Letters*, **216**, 89–102.
- İpek, E., Tüylü, B. A. ve Zeytinoğlu, H. (2003), "Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures," *Cytotechnology*, **43**, 145–148.
- Jirsova, K., Mandys, V., Gispen, W. K. ve Bär, P. R. (2006), "Cisplatin-induced apoptosis in cultures of human Schwann cells," *Neuroscience Letters*, **392**, 22–26.
- Johansson, N., Ala-aho, R., Uitto, V. –J., Grénman, R., Fusenig, N. E., López-Otín, C. ve Kähäri, V. –M. (2000), "Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen activated protein kinase," *Journal of Cell Science*, **113**, 227–235.
- Johnson, G. L. ve Lapadat, R. (2002), "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases," *Science*, **298**, 1911–1912.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. D. ve Lowe, S. W. (2002), "Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy," *Cell*, **108**, 153–164.
- Jr, J. L. ve Mccubrey, J. (2002), "The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia," *Leukemia*, **16**, 486–507.
- Junttila, M. R., Ala-aho, R., Jokilehto, T., Peltonen, J., Kallajoki, M., Grenman, R., Jaakkola, P., Westermarck, J. ve Kähäri, V. M. (2007), "p38a and p38d mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells," *Oncogene*, **26**, 5267–5279.

- Junttila, M. R., Li, S. -P. ve Westermarck, J. (2008), "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival," *The FASEB Journal*, **22**, 954–965.
- Kacem, R. ve Meraihi, Z. (2006), "Effects of essential oil extracted from *Nigella sativa* (L.) seeds and its main compenents on human neutrophil elastase activity," *Yakugaku Zasshi*, **126** (4), 301–305.
- Kandaş, Ö. (2004), "Apoptosis, programlı hücre ölümü," *Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, **5**,1.
- Kano, Y., Nohno, T., Shimada, K., Nakagiri, S., Hiragami, F., Kawamura, K., Motoda, H., Numata, K., Murai, H., Koike, Y., Inoue, S. ve Miyamoto, K. (2007), "Osmotic shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB," *Brain Research*, **1154**, 1–7.
- Karagözlü, N., Ergönül, B. ve Özcan, D. (2011), "Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157: H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane," *Food Control*, **22**, 1851–1855.
- Karkabounas. S., Kostoula, O. K., Daskalou, T., Veltsistas, P., Karamouzis, M., Zelovitis, I., Metsios, A., Lekkas, P., Evangelou, A. M., Kotsis, N. ve Skoufos, I. (2006), "Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol," *Exp Oncol.*, **28** (2), 121–125.
- Kasten, M. ve Giordano, A. (2001), "Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity," *Oncogene*, **20**, 1832–1838.
- Kato, T., Fujita, Y., Nakane, K., Kojima, T., Nozawa, Y., Deguchi, T. ve Ito, M. (2012), "ETS1 promotes chemoresistance and invasion of paclitaxel-resistant, hormone-refractory PC3 prostate cancer cells by up-regulating MDR1 and MMP9 expression," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **417** (3), 966–71.
- Katsman, A., Umezawa, K. ve Bonavida, B. (2007), "Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent," *Drug Resistance Updates*, **10**, 1–12.

- Keklikoğlu, N. (2004), “c-fos geni ve fos proteinleri,” *Cerrahpaşa Tıp Fakültesi*, **1**, 43–46.
- Keren, A., Keren-Politansky, A. ve Bengal, E. (2008), “A p38 MAPK–CREB pathway functions to pattern mesoderm in *Xenopus*,” *Developmental Biology*, **322**, 86–94.
- Keren, A., Tamir, Y. ve Bengal, E. (2006), “The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, **252**, 224–230.
- Kidambi, S., Yarmush, J., Berdichevsky, Y., Kamath, S., Fong, W. ve SchianodiCola, J. (2010), “Propofol induces MAPK/ERK cascade dependant expression of c-Fos and Egr-1 in rat hippocampal slices,” *BMC Research Notes*, **3 (201)**, 1–6.
- Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Jang, S. I. ve Bravo, D. (2010), “High-throughput gene expression analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral feeding of carvacrol, cinnamaldehyde, or *Capsicum oleoresin*,” *Poultry Science*, **89**, 68–81.
- Kim, S. B., Kim, J. S., Lee, j. H., Yoon, W. J., Lee, D. S., Ko, M. S., Kwon, B. S., Choi, D. H., Cho, H. R., Lee, B. J., Chung, D. K., Lee, H. W. ve Park, J. W. (2006), “NF- κ B activation is required for cisplatin-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma cells,” *FEBS Letters*, **580**, 311–318.
- Kimoto, K., Nakatsuka, K., Matsuo, N. ve Yoshioka, H. (2004), “p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19,” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **45**, 2431–2437.
- Klein, C. B. ve Costa, M. (1997), “DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens,” *Mutation Research*, **386**, 163–180.
- Kolch, W. (2000), “Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions,” *Biochem. J.*, **351**, 289–305.
- Komissarova, E. V., Saha, S. K. ve Rossman, T. G. (2005), “Dead or dying: The importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **202**, 99– 107.

- Koparal, A. T. ve Zeytinoglu, M. (2003), "Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549," *Cytotechnology*, **43**, 149–154.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M. ve Mete, E. (2008), "Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene," *Bioresource Technology*, **99**, 8788–8795.
- Köktürk, N., Kırıçoğlu, C. E. ve Öztürk, C. (2003), "Akciğer kanseri moleküler biyolojisi," *Solunum*, **3 (3)**, 127–138.
- Krishna, M. ve Narang, H. (2008), "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple," *Cell. Mol. Life Sci.*, **65 (22)**, 3525–44.
- Kruczynski, A. ve Hill, B. T. (2001), "Vinflunine, the latest Vinca alkaloid in clinical development: A review of its preclinical anticancer properties," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **40**, 159–173.
- Kumar, D., Deb, I., Chakraborty, J., Mukhopadhyay, S. ve Das, S. (2011), A polymorphism of the CREB binding protein (CREBBP) gene is a risk factor for addiction," *Brain Research.*, **1406**, 59–64.
- Kumar, V., Cotran, R. S. ve Robbins, S. L. (2003), *Temel Patoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F. ve Mauriello, G. (2011), "Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells," *Research in Microbiology*, **162**, 164–172.
- Lammers, T. (2010), "Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations," *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **62**, 203–230.
- Lampronti, I., Saab, A. M. ve Gambari, R. (2006), "Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division," *International Journal of Oncology*, **29**, 989-995.
- Landa, P., Kokoska, L., Pribylova, M., Vanek, T. ve Marsik, P. (2009), "In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis," *Arch Pharm Res.*, **32 (1)**, 75–78.

- Lee, F. S., Peters, R. T., Dang, L. C. ve Maniatis, T. (1998), "MEKK1 activates both I κ B kinase α and I κ B kinase β ," *The National Academy of Sciences*, **95**, 9319–9324.
- Lee, J., Jung, E., Yu, H., Kim, Y., Ha, J., Kim, Y. S. ve Park, D. (2008), "Mechanisms of carvacrol-induced expression of type I collagen gene," *Journal of Dermatological Science*, **52**, 160–169.
- Li, M. H., Ito, D., Sanada, M., Odani, T., Hatori, M., Iwase, M. ve Nagumo, M. (2004), "Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines," *Oral Oncology*, **40**, 63–70.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J. ve Chinou, I. (2009), "Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity," *Food Chemistry*, **112**, 77–83.
- Liu, H., Dibling, B., Spike, B., Dirlam, A. ve Macleod, K. (2004), "New roles for the RB tumor suppressor protein," *Current Opinion in Genetics & Development*, **14**, 55–64.
- Lorenzini, A., Tresini, M., Mawal-Dewan, M., Frisoni, L., Zhang, H., Allen, R. G., Sell, C. ve Cristofalo, V. J. (2002), "Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt (PKB) pathways in fibroblast senescence," *Experimental Gerontology*, **37**, 1149–1156.
- Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M. ve Kliment'eva, N. I. (2001), "Chemical features of medicinal plants," *Applied Biochemistry and Microbiology*, **37 (3)**, 229–237.
- Lüscher, B. (2001), "Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network," *Gene*, **277**, 1–14.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N. ve Russo, A. (2002), "Ras family genes: An interesting link between cell cycle and cancer," *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 125–130.
- Magyar, J., Szentandrassy, N., Bányász, T., Fülöp, L., Varró, A. ve Nánási, P. P. (2004), "Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes," *European Journal of Pharmacology*, **487**, 29–36.

- Mahato, R., Qin, B. ve Cheng, K. (2011), "Blocking IKK α expression inhibits prostate cancer invasiveness," *Pharm Res.*, **28**, 1357–1369.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P. ve Manosroi, A. (2006), "Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines," *Cancer Letters*, **235**, 114–120.
- McGarvey, D. J. ve Croteau, R. (1995), "Terpenoid metabolism," *The Plant Cell*, **7**, 1015–1026.
- Mehdi S. J., Ahmad A., Irshad M., Manzoor N. ve Rizvi M. M. A. (2011), "Cytotoxic effect of carvacrol on human cervical cancer cells," *Biology and Medicine*, **3** (2), 307–312.
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C. ve Sasaki, I. (2010), "5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs," *Cancers*, **2**, 1717–1730.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Luanratana, O., Jongsomboonkusol, S. ve Pongpan, N. (2004), "Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line," *Fitoterapia*, **75**, 375–377.
- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
- Mousavi, S. H., Tavakkol-Afshari, J., Brook, A. ve Jafari-Anarkooli, I. (2009), "Role of caspases and Bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells," *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1909–1913.
- Oliver, L. ve Vallette, F. M. (2005), "The role of caspases in cell death and differentiation," *Drug Resistance Updates*, **8**, 163–170.
- Oto, M. (2008), "Osteosarkom ve varyantlarına tanısal yaklaşım modaliteleri," *Pamukkale Tıp Dergisi*, **1**, 59–64.
- Ozaki, T. ve Nakagawara, A. (2011), "p53: The attractive tumor suppressor in the cancer research field," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011 (2011), 1-13.
- Öktem, S., Özhan, M. H. ve Özol, D. (2001), "Apoptozisin önemi," *Toraks Dergisi*, **2** (1), 91–95.

- Özbek, H., (2005), "Cinsel ve jinekolojik sorunların tedavisinde bitkilerin kullanımı," *Van Tıp Dergisi*, **12 (2)**, 170-174.
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D. ve Lev, S. (2009), "Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels," *Cell Calcium*, **45**, 300–309.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S. ve Seger, R. (2011), "The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1813**, 1619–1633.
- prevention: a global perspective, *Pharmacology&Therapeutics*, **99**, 1–13.
- Przybojewska, B., Jagiello, A. ve Jalmuzna, P. (2000), "H-RAS, K-RAS, and N-RAS gene activation in human bladder cancers," *Cancer Genet Cytogenet.*, **121**, 73–77.
- Puertas-Mejía, M., Hillebrand, S., Stashenko, E. ve Winterhalter, P. (2002), "In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil," *Flavour and Fragrance Journal*, **17**, 380–384.
- Qin, L. F. ve Ng, I. O. L. (2002), "Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells," *Cancer Letters*, **175**, 27–38.
- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R. ve Albert, S. (2007), "Ras oncogenes and their downstream targets," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1173**, 1177–1195.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Courtens, T. ve Debevere, J. (2005), "Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree," *Food Microbiology*, **22**, 189–197.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S. ve Rao, R. (2010), "Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54** (12), 5062–5069.
- Reddy, L., Odhav, B. Ve Bhoola, K.D. (2003), "Natural products for cancer prevention: A global perspective," *Pharmacol Ther.*, **99 (1)**, 1–13.

- Repetto, G., del Peso, A. ve Zurita, J. L. (2008), "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nat Protoc.*, **3** (7), 1125–1131.
- Roberts, P. ve Der, C. (2007), "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer," *Oncogene*, **26**, 3291–3310.
- Roux, P. P. ve Blenis, J. (2004), "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68** (2), 320–344.
- Safaei-Ghomi, J., Ebrahimabadi, A. H., Djafari-Bidgoli, Z. ve Batooli, H. (2009), "GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol" *Food Chemistry*, **115**, 1524–1528.
- Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K. ve Huuskonen, J. (2008), "Terpenoids: Natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential," *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2979–2999.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Ed: Nolan, C.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, United States of America.
- Sarkar, F. H. ve Li, Y. (2004), "Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents," *Mutation Research*, **555**, 53–64.
- Sárközi, S., Almássy, J., Lucács, B., Dobrosi, N., Nagy, G. ve Jóna. (2007), "Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor," *J Muscle Res Cell Motil.*, **28**, 167–174.
- Shukla, Y. ve Singh, M. (2007), "Cancer preventive properties of ginger: A brief review," *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 683–690.
- Silici, S., Sagdic, O. ve Ekici, L. (2010), "Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys," *Food Chemistry*, **121**, 238–243.

- Singh, S., Xiaolong, Y., Michele, P. ve Greene, R. M. (2007), "Molecular profiles of mitogen activated protein kinase signaling pathways in orofacial development," *Birth Defects Research (Part A)*, **79**, 35–44.
- Sinha, S. ve Yang, W. (2008), "Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42," *Cellular Signalling*, **20**, 1927–1934.
- Sivas, H. ve Tomsuk, Ö. (2011), "Antiproliferative and apoptotic effects of the essential oil of *Origanum onites* and carvacrol on Hep-G2 cells," *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **2**, 171–180.
- Solakoğlu Z. (2009), "Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni," *Klinik Gelişim*, **22 (3)**, 20–25.
- Stammati, A., Bonsi, P., Zucco, F., Moezelaar, R., Alakomi, H. L. ve Wright, A. (1999), "Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays," *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 813–823.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P. ve Gargova, S. (2007), "Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*)," *Food Chemistry*, **102**, 764–770.
- Stordal, B. ve Davey, M. (2007), "Understanding cisplatin resistance using cellular models," *IUBMB Life*, **59 (11)**, 696–699.
- Strander, H. (2007), "Interferons and osteosarcoma," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **18**, 373–380.
- Sun, B. K., Kim, J. -H., Nguyen, H. N., Oh, S., Kim, S. Y., Choi, H. J., Lee, Y. J. ve Song, J. J. (2011), "MEKK1/MEKK4 are responsible for TRAIL-induced JNK/p38 phosphorylation," *Oncol Rep.*, **25 (2)**, 537–544.
- Sung, H., Nah, J., Chun, S., Park, H., Yang, S. ve Min, W. (2000), "In vivo antioxidant effect of green tea," *European Journal of Clinical Nutrition*, **54**, 527–529.
- Svensson, C., Part, K., Künnis-Beres, K., Kaldmäe, M., Fernaeus, S. Z. ve Land, Tiit. (2011), "Pro-survival effects of JNK and p38 MAPK pathways in LPS-induced activation of BV-2 cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **406**, 488–492.
- Takimoto, C. H., Wright, J. ve Arbuck, S. G. (1998), "Clinical applications of the camptothecins," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1400**, 107–119.

- Tan, M. L., Choong, P. F. M. ve Dass, C. R. (2009), "Osteosarcoma conventional treatment and gene therapy," *Cancer Biology & Therapy*, **8** (2), 106–117.
- Tang, W., Wu, J. Q., Guo, Y., Hansen, D. V., Perry, J. A., Freel, C. D., Nutt, L., Jackson, P. K. ve Kornbluth, S. (2008), "Cdc2 and mos regulate Emi2 stability to promote the meiosis I–meiosis II transition," *Molecular Biology of the Cell*, **19**, 3536–3543.
- The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) (2003), <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/invidocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf>
- Tomatır, A. G. (2003), "Apoptoz: Programlı hücre ölümü," *T. Klin. J. Med. Sci.*, **23**, 499–508.
- Topal, T., Öter, Ş. ve Korkmaz, A. (2009), "Melatonin ve kanserle ilişkisi," *Genel Tıp Derg.*, **19** (3), 137–143.
- Toroğlu, S. ve Çenet, M. (2006), "Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar," *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **9** (2).
- Trabace, L., Zotti, M., Morgese M. G., Tucci P., Colaianna M., Schiavone S., Avato P. ve Cuomo P. (2011), "Estrous cycle affects the neurochemical and neurobehavioral profile of carvacrol-treated female rats," *Toxicology and Applied Pharmacology*, **255**, 169–175.
- Trougakos, I. P., Chondrogianni, N., Amarantos, I., Blake, J., Schwager, C., Wirkner, U., Ansorge, W. ve Gonos, E. S. (2010), "Genome-wide transcriptome profile of the human osteosarcoma Sa OS and U-2 OS cell lines," *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **196**, 109–118.
- Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S. ve Fukunaga, R. (2004), "Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development," *Molecular and Cellular Biology*, **24** (15), 6539–6549.
- Ultee, A. ve Smid, E. J. (2001), "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*," *International Journal of Food Microbiology*, **64**, 373–378.

- Ultee, A., Gorris, L. G. M. ve Smid, E.J. (1998), "Bactericidal activity of carvacrol towards the food-born pathogen *Bacillus cereus*," *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 211–218.
- Uyanoğlu, M., Canbek, M., Aral, E. ve Başer, K. H. C. (2008), "Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy," *Phytomedicine*, **15**, 226–229.
- Ündeğer, Ü., Başaran, A., Değen, G. H. ve Başaran, N. (2009), "Antioxidant activities of major thyme ingredients and lack of (oxidative) DNA damage in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells at low levels of carvacrol and thymol," *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2037–2043.
- Vaishnav, D., Jambal, P., Reusch, J. E. -B. ve Pugazhenti, S. (2003), "SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 855–860.
- Vermeulen, K., Bockstaele, D. R. V. ve Berneman, Z. N. (2003), "The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell Prolif.*, **36**, 131–149.
- Vitale, I., Senovilla, L., Jemaà, M., Michaud, M., Galluzzi, L., Kepp, O., Nanty, L., Criollo, A., Rello-Varona, S., Manic, G., Métivier, D., Vivet, S., Tajeddine, N., Joza, N., Valent, A., Castedo, M. ve Kroemer, G. (2010), "Multipolar mitosis of tetraploid cells: Inhibition by p53 and dependency on Mos," *The EMBO Journal*, **29**, 1272–1284.
- Wang, H., Birkenbach, M. ve Hart, J. (2000), "Expression of Jun family members in human colorectal adenocarcinoma," *Carcinogenesis*, **21**, 1313–1317.
- Wang, R. -M., Zhang, Q. -G., Li, J., Yang, L. -C., Yang, F. ve Brann, D. W. (2009), "The ERK5–MEF2C transcription factor pathway contributes to anti-apoptotic effect of cerebral ischemia preconditioning in the hippocampal CA1 region of rats," *Brain Research*, **1255**, 32–41.
- Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C.-T., Yao, Z. ve Tan, T. -H. (1997), "Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor b (TGF-b)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGFβ signal

- transduction,” *The Journal of Biological Chemistry*, **272** (36), 22771–22775.
- Wang, X., Sun, W., Zhang, C., Ji, G., Ge, Y., Xu, Y. ve Zhao, Y. (2011), “TGF- β 1 inhibits the growth and metastasis of tongue squamous carcinoma cells through Smad4,” *Gene*, **485**, 160–166.
- Wang, Z., Zhang, X., Wang, H., Qi, I. ve Lou, Y. (2007), “Neuroprotective effects of icaritin against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cultured rat neuronal cells via estrogen-dependent pathway,” *Neuroscience*, **145**, 911–922.
- Whitmarsh, A. J., Kuan, C. -Y. ve Kennedy, N. J. (2001), “Requirement of the JIP1 scaffold protein for stress-induced JNK activation,” *Genes Development*, **15**, 2421–2432.
- Wildiers, H. ve Paridaens, R. (2004), “Taxanes in elderly breast cancer patients,” *Cancer Treatment Reviews*, **30**, 333–342.
- Worch, J., Tickenbrock, L., Schwäble, J., Steffen, B., Cauvet, T., Mlody, B., Buerger, H., Koeffler, H. P., Berdel, W. E., Serve, H. ve Müller-Tidow, C. (2004), “The serine-threonine kinase MNK1 is post translationally stabilized by PML-RAR α and regulates differentiation of hematopoietic cells,” *Oncogene*, **23**, 9162–9172.
- Wu, D. ve Cederbaum, A. (2010), “Activation of ASK-1 and downstream MAP kinases in cytochrome P4502E1 potentiated tumor necrosis factor α liver injury,” *Free Radical Biology & Medicine*, **49**, 348–360.
- Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A. ve Muslin, A. J. (2000), “14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades,” *The EMBO Journal*, **19** (3), 349–358.
- Xing, X., Li, Y., Liu, H., Wang, L. ve Sun, L. (2011), “Glucose regulated protein 78 (GRP78) is overexpressed in colorectal carcinoma and regulates colorectal carcinoma cell growth and apoptosis,” *Acta Histochemica*, **113**, 777–782.
- Yang, Y.M., Bost, F., Charbono, W., Dean, N., McKay, R., Rhim, J. S., Depatie, C. Ve Mercola, D. (2003) “C-Jun NH(2)-terminal kinase mediates

- proliferation and tumor growth of human prostate carcinoma,” *Clin. Cancer Res.*, **9**, 391–401.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (2007), *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Yılmaz, E. ve Altunok, V. (2011), “Kanser ve p53 Geni,” *Avkae*, **1**, 19–23.
- Yin, Q., Yan, F., Zu, X. Y., Wu, Y., Wu, X., Liao, M., Deng, S., Yin, L. ve Zhuang, Y. (2011), “Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*,” **64 (1)**, 43–51.
- Zada, A. A., Pulikkan, J. A., Bararia, D., Geletu, M., Trivedi, A. K., Balkhi, M. Y., Hiddemann, W. D., Tenen, D. G., Behre, H. M. ve Behre, G. (2006), “Proteomic discovery of Max as a novel interacting partner of C/EBP α : a Myc/Max/Mad link,” *Leukemia*, **20**, 2137–2146.
- Zeytinoglu, H., Incesu, Z. ve Baser, K. H. C. (2003), “Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human N-RAS oncogene,” *Phytomedicine*, **10**, 292–299.
- Zeytinoglu, M., Aydin, S., Öztürk, Y. ve Baser, K. H. C. (1998), “Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats,” *Acta Pharm Turcica*, **40**, 93–8.
- Zhang, J. H., Zhang, Y. ve Herman, B. (2003), “Caspases, apoptosis and aging,” *Ageing Research Reviews*, **2**, 357–366.
- Zhang, X., Gamble, M. J., Stadler, S., Cherrington, B. D., Causey, C. P., Thompson, P. R., Roberson, M. S., Kraus, W. Lee. ve Coonrod, S. A. (2011), “Genome-wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk-1 to activate c-Fos expression in breast cancer cells,” *PLoS Genetics*, **7 (6)**, e1002112.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., Di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J. ve Han, J. (1999), “Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38,” *Molecular and Cellular Biology*, **19 (1)**, 21–30.

- Zhou, G., Jonathan, S. B. ve Tan, T. H. (2004), "Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1," *Jbc.*, **279 (47)**, 49551–49561.
- Zimmermann, K. C. ve Green, D. R. (2001), "How cells die: Apoptosis pathways," *Jallergy Clin Immunol.*, **108 (4)**, S99–103.
- Zwenger, S. ve Basu, C. (2008), "Plant terpenoids: applications and future potentials," *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3 (1)**, 001-007.