



**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN KANSER OLUŞUMU VE
PROGRESYONUNDA GÖREV ALAN BAZI GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ash YILDIRIM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN
Aralık - 2020
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN KANSER OLUŞUMU VE
PROGRESYONUNDA GÖREV ALAN BAZI GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aslı YILDIRIM

TOKAT
Aralık - 2020

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019/83 nolu proje ve 118Z422 no'lu 1001 projesi kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Ash YILDIRIM tarafından hazırlanan “Kiral Polifenolik Bileşiklerin Kansere Oluşumu Ve Progresyonunda Görev Alan Bazı Genlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27 KASIM 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

.....

Üye

Prof. Dr. Esra KOÇ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin KORKMAZ

Bartın Üniversitesi

.....

ONAY

.....

Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
27/11/2020

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Aslı YILDIRIM

28 Aralık 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN KANSER OLUŞUMU VE PROGRESYONUNDA GÖREV ALAN BAZI GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslı YILDIRIM

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM
ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ Seçil ERDEN TAYHAN

Günümüzde hücre bölünme ve büyümesinden sorumlu biyokimyasal mekanizmalar, hücre büyümesini uyaran moleküller, büyüme mekanizmasını kontrol eden proteinler, gerektiği zamanda büyümenin sınırlandırılmasından sorumlu olan genler ve mekanizmalar ile kanser oluşumu ve gelişimi, moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmaktadır. Apoptoz, vücuttaki ana tümör baskılama mekanizmasıdır. Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler görev almaktadır. Hücrelerin apoptoza eğilimli olup olmaması bu moleküllerin ve proteinlerin sentezinden sorumlu olan genlerin ekspresyonuna bağlıdır. Kanser tedavisinde klasik kemoterapötiklerin kullanılmasının yanı sıra, tedavi etkinliğinin artırılması için yeni ilaç hedefleri araştırılmakta ve yeni moleküller tanımlanmaya çalışılmaktadır. Kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesinde ve kanser tedavisi için aday molekül olarak kullanılmasında hücre hatlarında *in vitro* olarak yapılan araştırmalar büyük öneme sahiptir. Maddelerin biyokimyasal ve moleküler etki mekanizmasının anlaşılması hedefe yönelik geliştirilecek yeni ilaç araştırmaları açısından oldukça önemlidir. Açıklanan bu hususlar çerçevesinde, bu tez kapsamında, polifenolik bileşiklerin kanser oluşumu ve progresyonunda görev alan bazı genlerin ekspresyon düzeylerine etkilerinin araştırılmasıyla, hedefe yönelik tedavi geliştirilmesi yönünde yapılan çalışmalara katkı sunulduğu düşünülmektedir.

2020, 104 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Polifenolik Bileşikler, Kanser, Apoptoz, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

MASTER THESIS RESEARCHING OF THE EFFECTS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS ON EXPRESSION LEVELS OF SOME GENES PARTICIPATE IN CANCER FORMATION AND PROGRESSION

ASLI YILDIRIM

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR:ASST. PROF. DR. Seçil ERDEN TAYHAN

Today, biochemical mechanisms responsible for cell division and growth, molecules that stimulate cell growth, proteins that control the growth mechanism, genes and mechanisms responsible for limiting growth when necessary, and cancer formation and development are tried to be explained at the molecular level. Apoptosis is the main tumor suppression mechanism in the body. Proteins such as Bcl-2 family, p53, kaspases, cytochrome-c are used in the regulation of apoptosis. Whether cells are prone to apoptosis depends on the expression of genes responsible for the synthesis of these molecules and proteins. In addition to using classical chemotherapeutics in cancer treatment, new drug targets are being investigated to improve treatment effectiveness and new molecules are being tried to be identified. In vitro research in cell lines is of great importance in determining the effect of the agents used on cancer cells and using them as candidate molecules for cancer treatment. Understanding the biochemical and molecular mechanism of action of substances is very important for researching new drugs to be developed for the goal. Within the framework of these issues, it is believed that within the scope of this thesis, the effects of certain genes involved in the formation and development of cancer of polyphenolic compounds on expression levels are investigated and contributed to the studies carried out in the development of targeted treatment.

2020, 104 PAGE

KEYWORDS: Polyphenolic Compounds, Cancer, Apoptosis, Gene Expression

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her konuda desteğini, hoşgörüsünü ve yardımını esirgemeyen, hep yanımda olan ve bana güvenini her zaman hissettiren, tez danışmanım, çok kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli çalışmaları ile tezime çok büyük katkı sağlayan, bu çalışmanın ve bu çok değerli ekibin bir parçası olmama vesile olan, bana güvenip benimle yola çıkan ve desteğini her zaman hissettiren çok değerli hocam, eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Esra KOÇ'a, sonsuz teşekkür borçlu olduğumu belirtmek isterim.

Çok kıymetli bilgi birikimleri sayesinde yoluma hep ışık tutan, işimi her zaman hakkıyla yapabilmem konusunda beni cesaretlendiren, çoğu kez içimdeki gücü ortaya çıkarmamı sağlayan sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e, her şey için çok teşekkür ederim.

Tüm laboratuvar çalışmalarım boyunca hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen, ihtiyacım olduğu her zaman işime kendi işi gibi koşan Şeyma MENEVŞE'ye bu süreçte benimle bütün sıkıntılarımı paylaşan desteğini sürekli hissettiğim Derya AZGİN'a ve bu huzurlu çalışma ortamı için her ikisine çok teşekkür ediyorum.

Yaşamım boyunca maddi, manevi desteklerini benden esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve kızlarına inanmaktan hiç vazgeçmeyen, akademik kariyer yapmamı belki benden daha çok isteyen, sevgili annem Şerife YILDIRIM'a ve sevgili babam Arslan YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aslı YILDIRIM

28 Aralık 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1 Kanser ve Hücre Döngüsü.....	5
2.1.2 Kanser ve Apoptoz.....	7
2.2 Polifenolik Bileşikler	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler	13
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler	13
3.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	14
3.2 Yöntem.....	15
3.2.1 Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi, Stoklanması ve Büyüme Karakteristiklerinin Belirlenmesi	15
3.2.2 Polifenolik Bileşiklerin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi.....	21
3.2.3 Antiproliferatif Aktivitesi Yüksek Olan Polifenolik Bileşiklerin Etkili Olduğu Konsantrasyonlarda Hücre Ölümü (Apoptoz) ile İlgili Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	24
4. BULGULAR	30
4.1 Büyüme Eğrisi Grafiklerinin Değerlendirilmesi	30
4.2 Polifenolik Bileşiklerin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	34
4.3 Polifenolik Bileşiklerin Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi	47
4.4 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR, RT-qPCR) Sonuçlarının Değerlendirilmesi	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	74
6. KAYNAKLAR.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge

gr	gram
mg	miligram
μ M	mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Açıklama

Kısaltmalar

Apaf-1	Apoptatik proteaz aktive edici faktör-1
APO-1	Fas ölüm reseptörü
Bad	apoptoz uyarıcı bcl-2 aile üyesi protein
Bak	apoptoz uyarıcı bcl-2 aile üyesi protein
Bax	apoptoz uyarıcı bcl-2 aile üyesi protein
Bcl-2	pro-veya anti-apoptotik etkili gen ailesi (α 25 gen)
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermalbüyüme faktörü
EtOH	Etonol
FBS	Fötal sıgır serum
GAPDH	Glisaraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı

IC ₅₀	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ICAD	İnaktif kaspaz aktive DNaz
KSFM	Serumsuz keratinosit ortamı
MCF-7	İnsan meme karsinomu hücre hattı
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
P53	İnsanlarda tp53 geni tarafından konlanan tümör baskılayıcı protein
PBS	Fosfat tamponu
RNA	Ribonükleik asit
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde geliştirilen bir hücre besi ortamı
RT-PCR	Ters transkriptaz- Polimeraz zincir reaksiyonu
RWPE-1	İnsan sağlıklı prostat hücre hattı
UV	Ultraviole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil

Sayfa

Şekil 1. Kontrolsüz bölünmesi sonucu tümör oluşumu (National Cancer Institute'den uyarlanmıştır)	4
Şekil 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Anonim, 2017)	6
Şekil 3. İntrinsik ve eksrinsik apoptoz yolağı (Li,2012'den uyarlanmıştır)	9
Şekil 4. Polifenolik bileşiklerin yapısı	11
Şekil 5. Hücrelerin çözdürülmesi ve kültüre alınması	16
Şekil 6. Kanser hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: HT29, b: MCF7, c: PC3, 10X büyütme).....	17
Şekil 7. Sağlıklı hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: RWPE-1, b: CCD-18Co, c: MCF12A, 10X büyütme).....	18
Şekil 8. Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması/stoklanması.....	19
Şekil 9. Hücrelerin büyüme karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planı.....	21
Şekil 10. Polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planı.....	22
Şekil 11. Programlı hücre ölümü (apoptoz) ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.....	25
Şekil 12. MCF7 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	30
Şekil 13. HT29 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	31
Şekil 14. PC3 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	31
Şekil 15. RWPE-1 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	32
Şekil 16. MCF-12A hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	33
Şekil 17. CCD-18Co hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri	33
Şekil 18. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 4. saatteki etkileri	35
Şekil 19. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 M10, M11), PC3 üzerinde 4. saatteki etkileri	36
Şekil 20. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF7 üzerinde 4. saatteki etkileri	37

Şekil 21. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 24. saatteki etkileri	38
Şekil 22. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3 ve M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 24. saatteki etkileri	39
Şekil 23. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF7 üzerinde 24. saatteki etkileri	40
Şekil 24. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 48. saatteki etkileri	41
Şekil 25. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 48. saatteki etkileri	42
Şekil 26. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-7 üzerinde 48. saatteki etkileri	43
Şekil 27. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 72. saatteki etkileri	44
Şekil 28. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 72. saatteki etkileri	45
Şekil 29. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-7 üzerinde 72. saatteki etkileri	46
Şekil 30. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 4. saatteki etkileri	48
Şekil 31. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 4. saatteki etkileri	49
Şekil 32. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 4. saatteki etkileri	50
Şekil 33. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 24. saatteki etkileri	51
Şekil 34. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 24. saatteki etkileri	52
Şekil 35. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 24. saatteki etkileri	54
Şekil 36. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 48. saatteki etkileri	55

Şekil 37. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 48. saatteki etkileri	57
Şekil 38. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 48. saatteki etkileri	58
Şekil 39. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 72. saatteki etkileri	60
Şekil 40. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 72. saatteki etkileri	62
Şekil 41. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 72. saatteki etkileri	63
Şekil 42. M2(3-(1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propil)benzen-1,2-diol) ve M7(4-(1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)propil)-2-metoksifenol)bileşiklerinin kimyasal yapıları	65
Şekil 43. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücre hattındaki apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	66
Şekil 44. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	67
Şekil 45. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	68
Şekil 46. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi	68
Şekil 47. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	69
Şekil 48. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi	70
Şekil 49. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	70
Şekil 50. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi	71
Şekil 51. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri	72
Şekil 52. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi	73

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 1. Kullanılan cihaz ve aletler.....	13
Çizelge 2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	14
Çizelge 3. Polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin ve sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi analizinde kullanılan başlangıç hücre sayıları	22
Çizelge 4. Polifenolik bileşiklerin isimleri, deney sırasında kullanılan kod adları ve molekül ağırlıkları.....	23
Çizelge 5. PCR bileşenleri.....	27
Çizelge 6. qRT-PCR'da kullanılan primer dizileri	28
Çizelge 7: Real-Time PCR bileşenleri	28
Çizelge 8. Polifenolik bileşiklerin farklı kanser hücre hatlarında ve farklı zamanlardaki IC ₅₀ değerleri (* ile gösterilen değerlere ait hücre canlılıkları negatif kontroldeki hücrelerin canlılığından yüksek olduğu için herhangi bir inhibisyon değeri hesaplanamamıştır.)	34
Çizelge 9: Polifenolik bileşiklerin farklı sağlıklı hücre hatlarında ve farklı zamanlardaki IC ₅₀ değerleri (* ile gösterilen değerlere ait hücre canlılıkları negatif kontroldeki hücrelerin canlılığından yüksek olduğu için herhangi bir inhibisyon değeri hesaplanamamıştır.).....	47
Çizelge 10. MTT yöntemi sonucunda M2 ve M7 maddelerini belirlenen IC ₅₀ değerleri ve süresi	65

1. GİRİŞ

Uzun yıllardır kanser kaynaklı ölümleri önlemek veya azaltmak amacıyla özellikle tedavi amaçlı olarak kullanılabilecek etkin ve değerli kimyasal moleküllerin dizaynı ve sentezi konusunda yoğun çalışmalar yapılmıştır. Fakat kanserin çok çeşitli tiplerinin olması nedeniyle hala tedavi amaçlı kullanılabilir yeni kimyasal moleküllerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Kanserden meydana gelen ölümlerin artması ve üretilen moleküllerin büyük bir kısmının çeşitli sebeplerle kullanımının uygun olmaması nedeniyle, antikanser potansiyele sahip yeni moleküllere duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Pors ve ark., 2005).

Bu nedenle, günümüzde bilim insanları sadece yeni kimyasal bileşikler sentezlemekle yetinmemekte, aynı zamanda ekonomik değere sahip, hedefe yönelik ve insanlığa faydalı olabilecek bileşiklerin üretimi konusunda çaba sarf etmektedirler. Dolayısıyla, geçmişte olduğu gibi günümüzde de kanser kemoterapisi, bilim insanları için önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (Johnson ve ark., 1997). Bu sayede her geçen gün yeni kemoterapötik bileşikler sentezlenmekte ve biyolojik aktiviteleri araştırılmaktadır.

Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalarda kanser hücrelerini hedef alan yeni bileşikler olarak polifenolik bileşikler (resveratrol, kurkumin, apigenin, kuersetin vb.), çeşitli hastalık ve bozuklukların tedavisi için kapsamlı olarak çalışılmaya başlanmıştır. Polifenoller, insanların günlük olarak tükettikleri yiyeceklerin (sebze, meyve, çay, kahve, v.b.) pek çoğunda bulunan ve yapısal olarak çoklu fenol halkaları içeren doğal bileşiklerdir. Söz konusu bileşikler, yapısal olarak çeşitli formlarda bulunabilmekte ve her bir form farklı biyolojik aktivitelerde (anti-kanser, anti-enflamatuvar, anti-anjiyojenik, v.b.) etkinlik gösterebilmektedirler (Dayem ve ark., 2016).

Doğum ile başlayan yaşam süreci, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm evrelerinden oluşturmaktadır. Yaşamın sürdürülebilmesi açısından hücreler arasındaki sayısal denge oldukça önemlidir. İnsan vücudunda her saniye yüzlerce hücre çoğalıp sayıları artarken, kontrolsüz hücre bölünmesinin organizmaya doğuracağı yan etkilerin ortadan

kaldırılması, programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ile sağlanmaktadır (Bellamy vd. 1995). Bu dengenin sağlanamaması başta kanser olmak üzere çok sayıda hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Apoptoz, vücuttaki ana tümör baskılama mekanizmasıdır. Genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, belli başlı bazı genler tarafından düzenlenen, enerjiye ihtiyaç duyan ve organizmada homeostazı koruyan bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır (Renahan, Booth, ve Potten, 2001).

Hücreler DNA’da replikasyon sırasında farklı etkenler sonucu meydana gelen hasarı algılama ve onarabilme yeteneğine sahiptirler. DNA’da ki hasar onarılmazsa hücre programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz ile yok edilmektedir. Genel olarak apoptozun regülasyonunda sistein proteazlar (kaspazlar: 3, 8 ve 9) ve tümör baskılayıcı p53 proteini ile Bcl-2 gen ailesi gibi moleküller görev almaktadır (Edlich 2018). Hücrelerin apoptoza eğilimleri Bcl-2 ailesinde bulunan genlerin durumuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik (Bad, Bid Bax, BclXs) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Pro-apoptotik proteinler, hücreleri apoptoza yönlendirirken anti-apoptotik proteinler apoptozu inhibe etmektedirler. Hücre döngüsünde görevli tümör baskılayıcı protein p53, DNA’da hasar oluştuğunda hücre döngüsünün G₁ fazında durmasını ve hatanın tamir edilebilmesini sağlamaktadır. Hasar tamir edilemeyecek durumda olduğunda p53, hücreyi apoptoza götürecek bir dizi sinyal yolağının aktivasyonunu sağlamakla görevlidir. P53’ün aktivasyonu, pro-apoptotik gen olan Bax’ın sentezini artırmakta ve anti-apoptotik Bcl-2’nin sentezini inhibe ederek hücredeki Bax/Bcl-2 oranını değiştirip apoptozun başlaması için gerekli moleküllerin salınımına neden olmaktadır (Harris ve Thompson, 2000).

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Esra Koç’un yürütücülüğünü yaptığı, Dr. Öğr. Üyesi Seçil Erden Tayhan ve Dr. Öğr. Üyesi Sema Bilgin’in araştırmacı olarak görev aldığı “Kiral Polifenoller: Sentezi, Karakterizasyonu, Kanser ve Kanser Kök Hücrelerine Karşı Etkilerinin Araştırılması” başlıklı 118Z422 no’lu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında anti kanser aktivite potansiyeline sahip polifenolik bileşiklerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, kanserin oluşum ve gelişim mekanizması ile ilgili yapılan son çalışmaların ışığında, söz konusu 1001 projesi kapsamında sentezi gerçekleştirilen

bileşiklerin, kolon kanseri (HT29), prostat kanseri (PC3) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında, hücre çoğalması ve apoptotik sinyal iletim yolları üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkisi MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi ile belirlenmiştir. Etkili olan polifenolik bileşiklerin, hücrelerde apoptotik yollarda görevli olan bazı genlerin (Bcl-2, Bax, p53 ve Kaspaz-3) ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiş ve istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

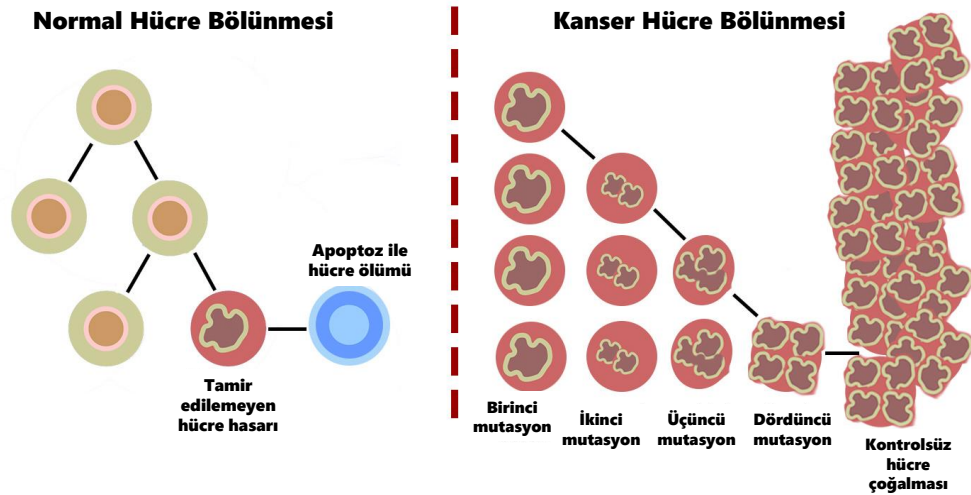


2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kanser

Hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan kanser, Hipokrat (460-370 M.Ö.) tarafından ‘cancer’ ve Galen (130-200 M.Ö.) tarafından ise şişlik anlamına gelen ‘onkos’ olarak adlandırılmıştır (Sigerist, 1932). Kanser, somatik genetik hastalıkların en sık görüleni ve en yaygın olanıdır (Futreal ve ark., 2001).

Kontrollü bir şekilde bölünme yeteneğine sahip olan hücrelerde herhangi bir neden sonucunda bölünme kontrolünün kaybedilmesi ve anormal bir şekilde hücre çoğalması ile oluşan hücre yığını tümör olarak adlandırılmaktadır. Tümör bölgesinde bulunan hücreler aşırı şekilde çoğalmaya başlayınca artan besin ihtiyacının karşılanması için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılım başlamaktadır. Tümör hücreleri hem şekil hem de fonksiyon bakımından anormal bir doku kitlesi oluşturmaktadır (Pogribny, 2010).



Şekil 1. Kontrolsüz bölünmesi sonucu tümör oluşumu (National Cancer Institute'den uyarlanmıştır)

Benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olmak üzere iki tümör yapısı görülmektedir. Benign (iyi huylu) tümörler genişleyerek büyümekte, çevre dokuyu istila etmeden yani

metastaz yapmadan yaşamına devam etmektedir. Malign tümör ise yayılma (metastaz) ve anjiyogenesis (damarlanma) özelliğine sahiptir. Aynı zamanda apoptozdan kaçınarak hücre çoğalmasını baskılayıcı sinyallere duyarlılık göstermezler. Metastaz, hastanın hayatta kalma süresini azaltan en önemli prognostik parametrelerden biridir ve maligniteyi gösteren önemli bir kriterdir. Metastaz ve lokal invazyon, malign tümörlerini benign tümörlerinden ayıran en önemli özelliklerdir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

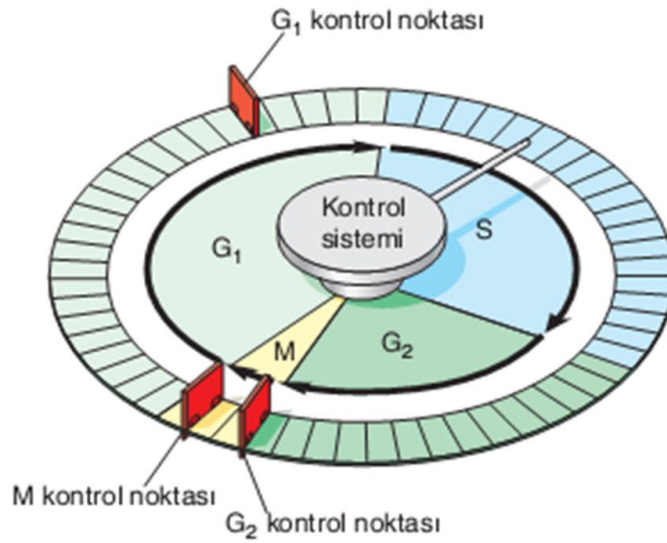
Kanser biyolojisinde sorulması gereken en önemli soru, kansere neden olan hücresel değişiklere neyin sebep olduğudur. Bu sorunun cevabının verilmesi, kullanılacak olan tedavi yönteminin geliştirilmesinde belirleyici faktördür. Kanser oluşumu ve progresyonu üzerine yapılan çalışmalarda; kanserin, çeşitli faktörlerin etkisiyle hücre içerisinde biriken genetik hasar sonucu oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüştüğü mekanizmayı belirleyebilmek kanseri anlamak açısından önemlidir.

Kanser, DNA dizisinde meydana gelen anormallikler sonucu oluşmaktadır. Canlı hücreler yaşam boyunca çeşitli mutajenlere maruz kalmaktadırlar ve bunun sonucunda DNA’da değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşabilmektedir. Oluşan bu hatalar genelde DNA tamir mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılabilir. Ancak, bazen oluşan bu mutasyonlar tamir edilememekte ve içinde bulunduğu hücrenin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve bu hücreden türeyen bir tümör yığınının oluşmasına neden olmaktadır. Mutajenler multifaktöriyel olup, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı, radyasyon, bakteriler, virüsler ve zararlı kimyasallar gibi birçok farklı etken kanser oluşumuna neden olabilmektedir (Williams, 2001).

Tek bir gende meydana gelen mutasyondan çok, birçok gende meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan hasar, kanser oluşumuna neden olmaktadır. Hasarlı genler, kontrolsüz hücre çoğalmasını kolaylaştıran ve tümör oluşumuna yol açan çok sayıda genetik mutasyonu biriktirmektedir. Hücrenin genetik metaryalinde biriken mutasyonlar, hücre büyümesini ve doku homeostazını düzenleyen hücre siklusu, apoptosis ve hücre farklılaşması gibi önemli biyolojik yolları etkilemektedir (Loeb ve Anderson, 2003) .

2.1.1 Kanser ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü olarak adlandırılan olay, hücrelerin çoğalması ve büyümesi için programlanmış bir mekanizmadır. Bu olay, DNA replikasyonu, RNA ve protein sentezinin gerçekleştiği S, RNA sentezinin devam ettiği G₂, mitoz ve hücre bölünmesinin gerçekleştiği M ve bölünme sonrası oluşan yeni hücrelerin tekrar S fazına geçebilmeleri için hazırlık yaptığı G₁ fazı da dahil dört evrede gerçekleşmektedir. Hücrelerin bölünmeye devam edeceği ya da bölünmenin sonlanacağına karar verdikleri evre mitozdan sonraki G₁ evresidir. G₁ evresindeki hücre ya tekrar S evresine geçmekte ve bölünmeye devam etmekte ya da dinlenme evresi olarak da bilinen G₀ evresinde beklemektedirler. Bu sürecin sağlıklı ilerleyebilmesi için hücre döngüsünde G₁, G₂ ve M evrelerinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında siklin olarak adlandırılan proteinler görev yapmaktadırlar. Her aşama farklı bir grup siklin proteini ile kontrol edilmektedir (Ho ve Dowdy, 2002).



Şekil 2. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Anonim, 2017)

Siklinler, inaktif halde bulunan, siklin-bağımlı kinaz (CDKs)'lara bağlanarak onları aktif hale getirmektedir. Aktif CDK'lar hücre döngüsünün belli noktalarında kontrolü sağlamakla görevlidirler. Hücrelerin bölünme evresine hazırlık yaptığı S evresinde DNA replikasyonu sırasında oluşabilecek DNA hasarının engellenebildiği ve tamir edildiği birçok farklı mekanizmanın olduğu belirtilmiştir. DNA'da meydana gelen hasar sonucu oluşan stres sinyalleri tümör baskılayıcı genleri aktif hale getirmekte ve bu genler döngüyü G₂ evresinde durdurmaktadırlar. Bu sayede, DNA'da meydana gelen hasarın

tamir edilebilmesi için hücreye zaman verilmektedir. DNA'daki hasarın düzeltilemediği durumda tümör baskılayıcı gen olan p53, hücreyi apoptoza götürecektir yolağın aktifleşmesini sağlamaktadır (Pediconi ve ark., 2003).

Hücre döngüsü kontrolünde görev alan moleküllerin yapısında meydana gelen mutasyonlar, kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Yapılan birçok çalışmada bu mutasyonlar sonucunda oluşan anormalliğin hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesine ve aşırı çoğalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Bahsi geçen bu önemli kontrol noktası bileşenleri, tümör baskılayıcı gen ve onkogen olarak bilinmektedir. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını inhibe ederek tümör oluşumunu engellemekte, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölüm mekanizması olan apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Hücre döngüsündeki kontrol noktalarında görevli tümör baskılayıcı genler üzerinde yapılan çalışmalar kanser araştırmalarında moleküler temel oluşturmak için oldukça önemlidir (Butterworth ve ark., 1992).

2.1.2 Kanser ve Apoptoz

Normal dokulardaki gelişim ve doku içi dengenin sağlanmasında çok ciddi rol oynayan çeşitli biyokimyasal ve genetik yollarla programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz, kanser oluşumu ve gelişiminde kritik bir öneme sahiptir. Hücre ölümü ve sağkalımı arasındaki dengeyi sağlamak için oldukça önemli bir mekanizmadır (Lockshin ve Williams, 1965). Sağlıklı yetişkin insan dokularında, hücre çoğalması ve hücre ölümü birbiri ile dengelenmiştir. Bu dengenin bozulması ile hücreler kontrolsüz çoğalmakta ve tümör dokusu oluşmaktadır.

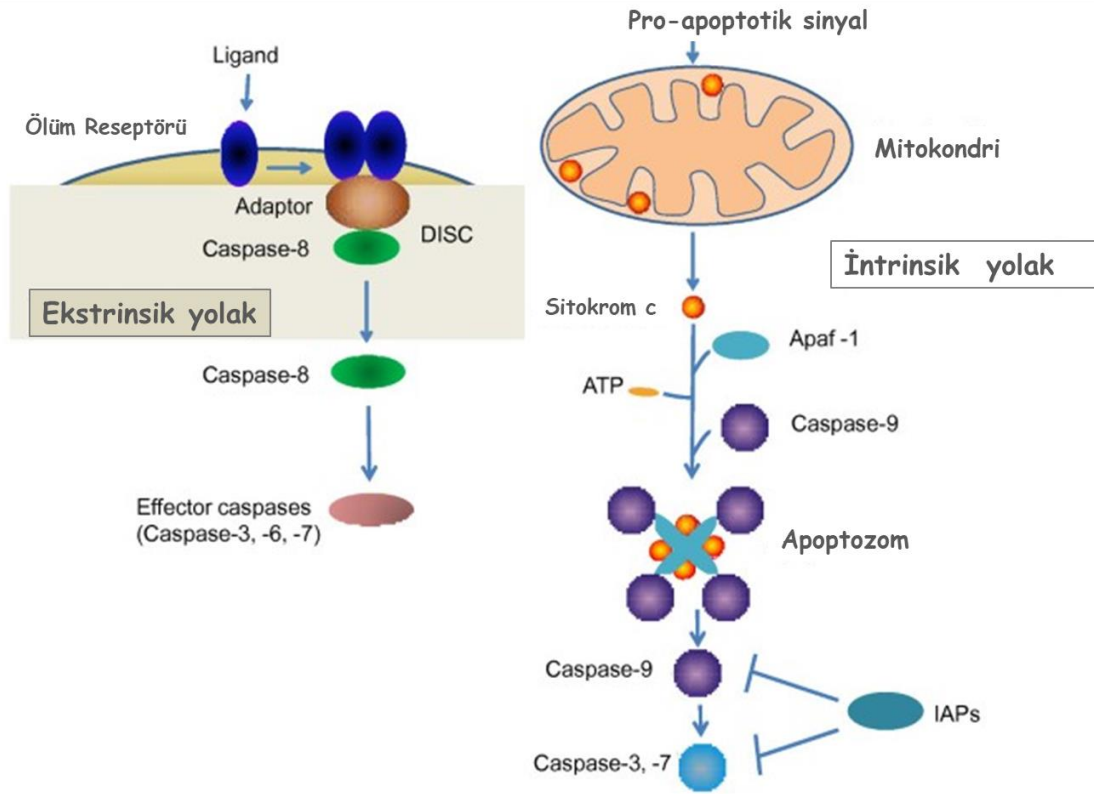
Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler görev almaktadır. Hücrelerin apoptoza eğilimli olup olmaması bu moleküllerin ve proteinlerin sentezinden sorumlu olan genlerin ekspresyonuna bağlıdır. Apoptozun düzenlenmesinden sorumlu olan Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (Bax, Bad, Bid vb.) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) olmak üzere iki zıt gruptan oluşmaktadır. Pro-apoptotik protein fazla olduğu zaman hücresel apoptoz indüklenmekte: tam tersi durumda anti-apoptotik proteinlerin fazla olması apoptozu inhibe etmektedir (Jerry M. Adams ve Cory, 2001).

KontROLSÜZ hücre çoğalmasının baskılanmasında ve apoptozda görevli p53, hücrelerde oluşan DNA hasarını kontrol eden, meydana gelen herhangi bir hata sonucunda hücre siklusunu G₁ fazında durdurarak hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. DNA da meydana gelen hasar tamir edilemezse, pro-apoptatik Bax sentezini artırarak anti-apoptatik Bcl-2'yi baskılamakta ve bu sayede hücredeki Bcl-2/Bax oranını değiştirerek apoptozu indüklemektedir (Vousden ve Lu, 2002). P53 geninin ekspresyon seviyesinin yüksek olması hücrenin apoptoz eğiliminde olduğunu göstermektedir. Kanseri teşhisi yapılan hastaların %50'sinde p53 geninde mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir düzenleyici bir protein ailesi olan kaspazlar, normal şartlarda hücre içinde inaktif olduğu bilinmektedir. Ancak apoptoz sinyali oluştuğunda proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirmektedirler. Kaspazlar, DNA replikasyonunda görev alan genleri inaktive ederek ve hücre iskeletinde bulunan proteinleri parçalayarak hücre zarının tomurcuklanmasına neden olmaktadır (Spierings ve ark., 2004).

Bir hücrede meydana gelen DNA hasarı, p53 proteinini aktive edebilmektedir. P53 proteini ve onu uyaran sinyal iletim yolağı, DNA'da hasara neden olabilecek çok çeşitli içsel ve dışsal tehlike uyarılarına karşı cevap vermek üzere tasarlanmış bir dizi gen ve bunların proteinlerinden oluşmaktadır. Bu uyarı sinyallerinin tümü, hücre içi homeostasisi dengede tutmak için çalışmaktadır. Bu, DNA'da meydana gelebilecek her türlü hasarın p53 geni ile ilişkili olduğu anlamına gelmektedir. (Levine, Hu, ve Feng, 2006). Hücrenin apoptoz sinyalini alarak ölüm yolağına girmesini sağlayan pek çok patolojik ve fizyolojik uyarı vardır. Ancak bütün hücreler aynı uyarıya yanıt olarak apoptozla gitmemektedirler. Hücrede apoptozun başlaması, hücrenin uyarıya vermiş olduğu tepkisi kadar apoptoz baskılayıcı moleküllerin varlığına da bağlıdır. Mevcut kanser tedavi yöntemi olarak kullanılan radyoterapi ve kemoterapi, kanserli hücrelerin DNA'sında hasar oluşturmayı hedeflemektedir. Bu hasar sonucu p53 geninin aktivasyonu uyarılarak hücrenin apoptotik yolağına girmesi sağlanmaktadır (Elmore, 2007).

Kanser hücrelerini yok etmeye yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için apoptoz mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmektedir. Hücre ölüm mekanizmasının işleyişinin doğru bir şekilde ortaya konulabilmesi, apoptotik genleri ve apoptotik yolları hedef alan ilaçların geliştirilebilmesinde oldukça önemlidir. Şekil 3'de

görüldüğü üzere, apoptoz, içsel (intrinsik) veya mitokondriyal yol ya da dışsal (ekstrinsik) yani ölüm reseptörlerinin görev aldığı iki farklı yolla gerçekleşmektedir (Wong, 2011).



Şekil 3. İntrinsik ve ekstrinsik apoptoz yolağı (Li,2012'den uyarlanmıştır)

Hücrelerde DNA hasarı algılandığı anda apoptotik programı devreye sokmak için proapoptotik Bax genini aktive edici görevi bulunan p53 geni indüklenmektedir. Bax geninin transkripsiyonunun artması, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 oranını değiştirerek mitokondriden sitokrom c ve Apoptoz İndükleyici Faktörlerin (AIF) salınımını uyarmaktadır (Corn ve El-Deiry, 2002). Sitokrom c, Apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve ATP ile bir araya gelerek sitozolde apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks Kaspaz-9'a bağlanarak onu aktif hale getirmekte, aktifleşen Kaspaz-9 ise Kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Kaspazların proteolitik aktivasyonu sonucunda aktifleşen CAD (kaspaz aktive edici DNaz) serbest hale gelerek DNA'nın parçalara ayrılmasını ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlamaktadır (Elmore, 2007).

Apoptoz sırasında, hücreler kromatin yoğunlaşması, membran sızması ve nükleer parçalanma gibi patolojik özelliklerle ölmeye başlamaktadır. Akabinde, apoptotik hücre, ölü hücreyi içselleştirmek için reseptörleri kullanan fagositler tarafından hızla yutulmakta ve parçalanmaktadır (Hengartner, 2001).

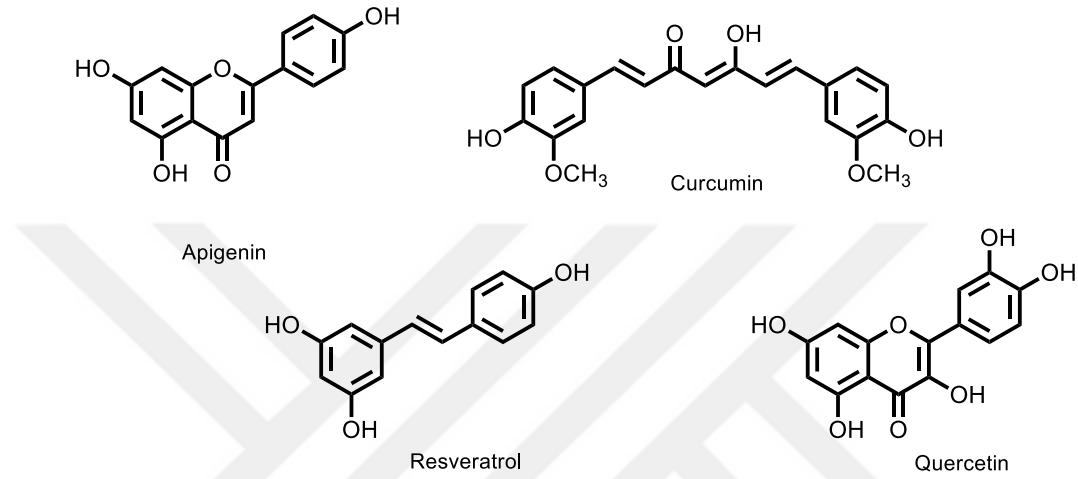
Ekstrinsik yol veya dışsal yol olarak adlandırılan apoptotik yol apoptozu indüklemek için hücre dışı sinyalleri kullanmaktadır. Ölüm sinyalleri (FasL, TRAIL) hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (FADD, TRADD) bağlanmaktadır. Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi olarak adlandırılan ölüm reseptörlerine sinyal bağlandığı zaman reseptör trimerik yapı oluşturmakta ve aktifleşmektedir. Ölüme neden olan sinyalleşme kompleksi (DISC), Pro-kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Daha sonra cellat kaspazlar olarak bilinen Kaspaz-3, -6 ve -7 aktifleşmektedir. Kaspazların aktivasyonu ile proteinlerin parçalanması ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Zaman, Wang ve Gandhi, 2014).

Kaspaz-8'in aktivasyonu aynı zamanda içsel yolu da aktive etmektedir. Kaspaz-8 aktive olduktan sonra Bcl-2 gen ailesi üyesi olan pro-apoptotik Bid genini indüklemektedir. Aktive olan Bid, Bax ve Bak'ın indüklenmesinde görev almaktadır. Bu sayede içsel apoptotik yol başlamaktadır (Pfeffer ve Singh, 2018).

2.2 Polifenolik Bileşikler

Fenoller ve polifenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksi grubu taşıyan aromatik bir halkaya sahip, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen moleküllerdir. Polifenolik bileşikler ve fenoller antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiallerjik, antitümörojenik, kardiyoprotektif, antimitojenik ve enzimatik aktivitelerin modülasyonu gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olmalarından dolayı da son iki yüzyıldır oldukça ilgi çeken bir konu haline gelmiştir. Fenolik fonksiyonel grubu taşıyan bileşikler günlük yaşamda pek çok uygulama alanına sahiptir. Örneğin, fenol türevi bileşikler biyolojik aerobik organizmalar ve ticari ürünleri içeren çok sayıda organik maddenin oksidatif yıkımını engelleyen antioksidanların önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Fenollerin

yaygın olarak bilinen antioksidan özelliklerinin yanı sıra serbest radikal giderme, enzim inhibe veya aktivite edebilme, metal şelatlama özelliklerinden dolayı lipid, protein ve nükleik asitlere verilen zararı önleyici özellik gösterme, lökosit immobilizasyonunu azaltma, apoptosisi başlatma, proliferasyonu, anjiyogenezi inhibe etme ve fitoöstrojenik aktivite gibi aktiviteleri de rapor edilmiştir (Galati ve ark., 2000; Yang ve ark., 2001).



Şekil 4. Polifenolik bileşiklerin yapısı

Fenoller özellikle meme kanseri hücreleri için geniş bir yelpazede etkili sonuçlar sergilemiştir. Bu nedenle, polifenolik bileşiklerin kanser tedavisinde ve tamamen ortadan kaldırılmasında umut verici olduğu önerilmiştir. Örneğin resveratrol (trans-3,5,4-trihidroksistilben), antioksidan, anti-inflamatuar, kardiyoprotektif, nöroprotektif ve antikanser etkinlikleri ile bilinen doğal bir polifenolik bileşiktir. Yakın zamanda, Bishayee (Bishayee, 2009) resveratrol ile yaptığı antikanser aktivitesi çalışmalarında kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için oldukça etkili olduğunu belirlemiştir. Resveratrolün meme kanseri önleme ve tedavisindeki potansiyel rolü, Sinha ve meslektaşları tarafından incelenmiş ve bu bileşiğin, çoklu kanser tiplerine karşı antikanser aktivite gösterdiği ve kanser hücresi ölümünü indüklediği, hücre döngüsünü durdurduğu ve çeşitli sinyal yollarını inhibe ettiğini belirlemiştir (Sinha ve ark., 2012).

Kurkumin ise yine antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser ve anti-diyabetik özellikleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteler için yaygın olarak incelenen polifenolik bileşiklerden biridir. Kurkumin, pankreas, kolon, göğüs, prostat ve mesane kanserleri de dahil olmak

üzere çok çeşitli kanser tiplerine karşı anti kanser aktiviteye sahiptir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan polifenolik bileşiklerden biri olan kurkuminin deneysel çalışmalardaki etkinliğinin yüksek olduğu; ancak klinik kullanımına yönelik bazı kısıtlılıklara sahip olduğu net olarak bilinmektedir. Bu kısıtlılıkların başında, söz konusu bileşiğin suda çözünürlüğünün az olması, etkinliğinin ancak yüksek dozlarda gözlenebilmesi ve düşük metabolik stabiliteye sahip olması gelmektedir. Dolayısıyla, polifenolik bileşiklerin ve türevlerinin antikanserojenik ilaçlarda yer alabilmesi için belirtilen problemlerin çözümüne yönelik iyileştirmelerin yapılmasına da ihtiyaç duyulmaktadır (Xia ve ark., 2012).

Son yıllarda, fitokimyasallar üzerine gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, fenolik yapıdaki çeşitli moleküllerin kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilerinin olduğu görülmektedir (Vadde ve ark., 2015; Absalan ve ark., 2016; Nejad ve ark., 2017). Örneğin, Hindistan'da geleneksel tedavilerde sıklıkla kullanılan bir formülasyon olan Triphala'nın metanol ekstraktındaki fenolik bileşiklerin (kuersetin, naringin, homoorientin ve isorhamnetin) (Vadde ve ark., 2015) ve üzüm çekirdeği ekstraktlarından elde edilen resveratrolün kolon kanseri kök hücreleri üzerinde etkili olduğu ve ilgili kanserin tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Reddivari ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Çalışmada kullanılan cihaz/alet çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan cihaz ve aletler

Cihaz/Alet Adı	Firma-Model
-80 Dondurucu	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan-ES20
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
CO ₂ ’li inkübatör	Esco
Laminar akışlı steril kabin	Esco Airstream
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Nüve
Ters-faz mikroskop	Olympus CKX41
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Hassas Terazi	Radwag
Otomatik pipetler	Ependorf
Pipet tabancası	Greiner
Spin vortex	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Mikroplaka Elisa Okuyucu	Tecan
Buz makinası	Vision
Light Cyler Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	qTOWER3G- Analytic Jena
Otomatik Pipet	Ependorf
Mikro santrifüj	Hettich
PCR cihazı	Bio-Rad
Nanodrop	DeNovix

3.1.2 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal / Sarf Adı	Marka-Firma
DMSO	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium)	Biochrom Ag
EMEM	Biochrom Ag
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn
RPMI 1640	Biochrom Ag
MTT	Sigma-Aldrich
PBS	Biochrom Ag
5 Fluorouracil (5-FU)	Deva
Tripan blue boyası	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA çözeltisi	Sigma-Aldrich
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Revers Transkriptaz	Takara
TRIzol	Invitrogen, ABD
Oligo-dt	Macrogen
PFu	Laboratuvarımızda Üretildi
Evagreen	Biotium
dNTPs	Macrogen
L-Glutamin	Biochrom Ag
Gentamisin	Biochrom Ag
Hücre kültürü flakları (25 ve 75 cm ²)	Greiner
Kriyotüp (Hücre dondurma ampülü)	Greiner
Mikrosantrifüj tüpleri	Isolab

0,2 ml'lik PCR tüpleri	Isilab
15 ve 50 ml'lik Eppendorf tüpleri	Isolab
96 kuyucuklu mikrolakalar	Corning
Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM)	Gibco
Epidermal Growth Factor (EGF)	Gibco
DMEM Ham's F12 Medium	Biochrom Ag
Hydrocortisone	Sigma
İnsulin	Sigma

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi, Stoklanması ve Büyüme Karakteristiklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC3) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda oluşturulan hücre stoklarından alınmıştır. MCF-7, DMEM besi ortamı ile PC-3 ve HT-29, RPMI 1640 ile %10 (v/v) inaktif fetal sıgır serum ve %1 (v/v) L-glutamin içeren besi ortamı içerisinde 37 °C' de, %5 CO₂ içeren %95 nemli inkübatörde kùltive edilerek; çoğaltılmıştır. Yine tez çalışması kapsamında kullanılmış olan sağlıklı kolon (CCD-18Co, ATCC CRL-1459), meme (MCF12A, ATCC CRL-10782) ve prostat (RWPE-1, ATCC CRL-11609) hücre hatları da ATCC'den temin edilmiştir.

Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

Sıvı azot tankında (-196 °C) stoklanmış durumda kryotüplerde bulunan hücreler, çıkartıldıktan sonra vakit kaybetmeden 37 °C'deki su banyosunda çözdürülmüştür. İçeriği çözünen kryotüp biyogüvenlik kabinine alınmıştır. Tüp içeriği %10 FBS ve

antibiyotik içeren büyüme ortamı ile (MCF7 için DMEM, PC3 ve HT29 için RPMI1640) dikkatlice toplanarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler 800 rpm (devir/dakika)'de +4 °C'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifigasyon sonrasında oluşan üst faz (süpernatant) atılarak, pellet üzerine taze besi ortamı eklenmiş ve hücre süspansiyonu homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler sayılarak uygun büyüklükte kültür kabına alınmıştır. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra kültür kabı 37 °C' de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin morfolojileri ters-faz ışık mikroskobu ile incelenmiştir ve hücrelerin besi ortamı iki günde bir değiştirilmiştir. %80-90 konfluensiye ulaşan hücreler pasajlanarak çoğaltılmıştır.



Şekil 5. Hücrelerin çözündürülmesi ve kültüre alınması

ATCC'den temin edilen ve laboratuvara kuru buz içerisinde donmuş halde gelen hücreler de yukarıda özetlenen hücre çözdürme protokolüne uygun şekilde çözündürülerek kültüre alınmıştır. Kültür sırasında, ATCC'nin uyarılarına uygun şekilde RWPE-1 için KSFM (serumsuz keratinosit besi ortamı), CCD-18Co için ise %12 FBS (fötal sıgır serumu) içeren EMEM ve MCF12 için büyüme faktörleri ile zenginleştirilmiş DMEM F12 HAM'S besi ortamı kullanılmıştır.

RWPE-1 hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besi ortamı kompozisyonu:

- Keratinosit Serumsuz Ortam (K-SFM)
- 0.05 mg/ml BPE (Bovine Pituitary Extract)
- 5 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor)

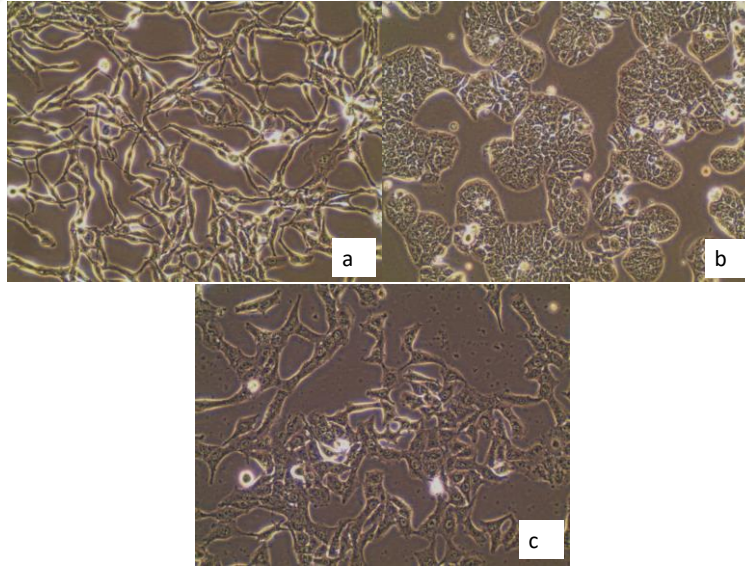
CCD-18Co hücrelerinin çoğaltılması için kullanılan besi ortamı kompozisyonu:

- %12 FBS (Fetal Bovine Serum)
- %1 L-glutamin
- %0,1 gentamisin
- %88,9 EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

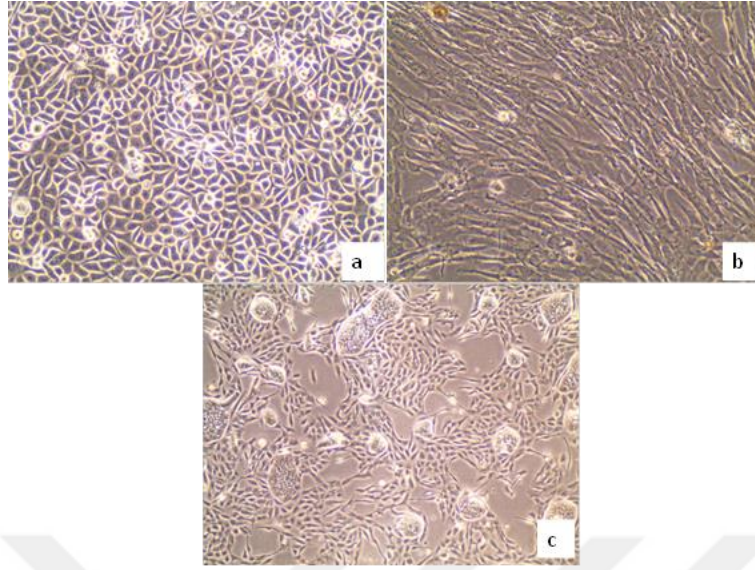
MCF12A hücreleri için kullanılan besi ortamı kompozisyonu:

- 70 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor)
- %1 L-glutamin
- %0,1 gentamisin
- 500 ng/ml HCT (Hydrocortisone)
- %7 Horse Serum
- DMEM F12 HAM'S (Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F12 Medium)

Kültürü sürdürmek için hücrelerin besi ortamı 2-3 günde bir tazelenmiştir.



Şekil 6. Kanser hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: HT29, b: MCF7, c: PC3, 10X büyütme)



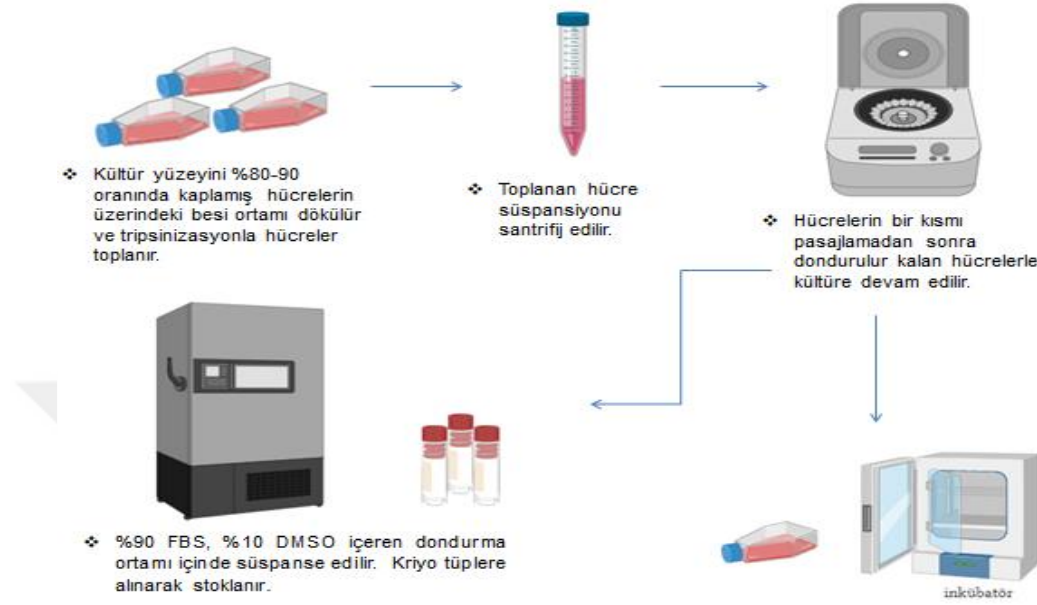
Şekil 7. Sağlıklı hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: RWPE-1, b: CCD-18Co, c: MCF12A, 10X büyütme)

Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması/stoklanması

Kültür yüzeyini %80-90 oranında kaplamış hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 37 °C’de ısıtılmış olan, steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponlu salin ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 37°C’de ısıtılmış tripsin- EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C’de inkübatör içerisinde 5 dk bekletilerek, hücrelerin birbirlerinden ve yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan hücrelerin üzerine serum içeren besi ortamı ilave edilerek süspansiyon homojenize hale getirilmiş ve santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpler 800 rpm (devir/dakika)’de +4°C’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifügasyon sonrasında oluşan üst faz (süpernatant) atılarak, pellet üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonundan, hücrelerin pasaj oranına göre seyreltilerek yeni hücre kültür kaplarına aktarılmıştır ve hücreler 37 °C’de, %5 CO_2 içeren %95 nemli ortamda inkübe edilmiştir.

İlgili hücrelerin stoklanması için hücreler tripsinize edildikten sonra santrifüj edilen hücre pelleti üzerine hazırlanan dondurma ortamı (%90 (v/v) FBS, %10 (v/v) dimetilsülfoksit, DMSO) eklenmiştir ve hücreler kriyotüplere 1 mL hacimde olacak şekilde paylaştırılmıştır. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra tüpler, gece boyu köpük kutu

içerisinde -86 °C’de bekletildikten sonra ertesi gün hücreler, teorik olarak sonsuza kadar stoklanabilecekleri, -196 °C sıcaklığa sahip sıvı azot tankına kaldırılmıştır.



Şekil 8. Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması/stoklanması

Hücrelerin Büyüme Karakteristiklerinin Belirlenmesi

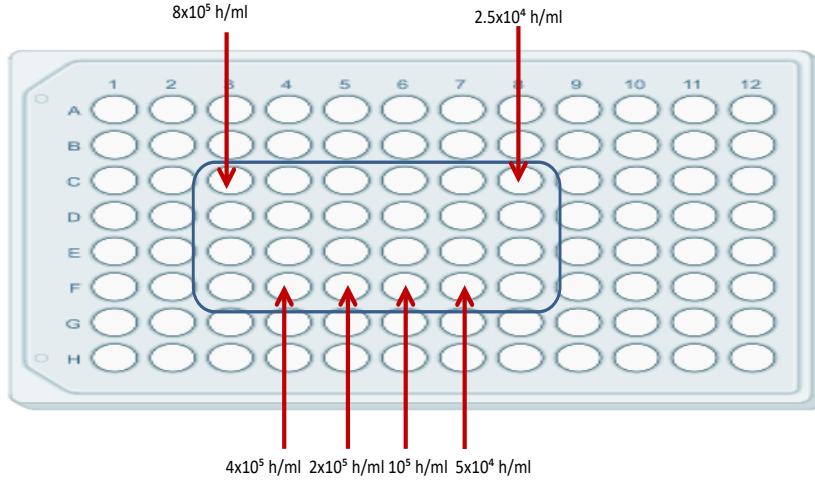
Bu tez çalışması kapsamında biyolojik aktiviteleri incelenen maddelerin, çalışmada kullanılan hücreler ile etkileşiminin ve maddelerin etkinliğinin doğru analiz edilebilmesi için ilk olarak doğru hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Hücrelerin büyüme eğrileri dikkate alınarak çalışılması gereken hücre sayılarına karar verilmiştir. Bu sayılara karar verirken hücrelerin 24 saat sonunda logaritmik evreye girmiş olması gerekliliği göz önüne alınmıştır. Belirtilen hücrelerin büyüme karakteristiğinin belirlenmesi için MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi uygulanmış ve kanser hücre hatlarının ve sağlıklı hücrelerin her birine ait büyüme eğrisi grafikleri oluşturulmuştur. Yapılan bu çalışmanın uygulama basamakları genel olarak aşağıda belirtilmiştir.

Kültür yüzeyini %80-90 oranında kaplamış hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 37 °C’de ısıtılmış olan, steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen

fosfat tamponu (PBS) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 37 °C’de tripsin –EDTA çözeltisi eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan hücrelerin üzerine besi ortamı ilave edilerek süspansiyon homojenize hale getirilmiştir ve santrifüj tüpüne alınmıştır. Bu aşamada hücre sayısını hesaplamak için hücre süspansiyonundan 200 µl mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonu +4 °C’ 800rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelletinin besi ortamı içinde homojenizasyonu sağlanmıştır. Neubauer Lamı aracılığıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Hücre sayısı (h/ml)} = \frac{\text{canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4}{\text{sayılan kare sayısı}}$$

Söz konusu hücrelerin büyüme karakteristiklerinin en doğru şekilde ortaya konulabilmesi için farklı sayıda hücreler ile deneme planlanmış ve aşağıdaki pleyt planı (Şekil 9) oluşturularak; hücrelerin, 96 gözlü kültür kaplarına 6 farklı seyreltmede (8×10^5 h/ml, 4×10^5 h/ml, 2×10^5 h/ml, 10^5 h/ml, 5×10^4 h/ml ve $2,5 \times 10^4$ h/ml), 3 tekrarlı olacak şekilde ekimi gerçekleştirilmiştir. 15 gün boyunca hücreler her 24 saatte bir kez canlılık analizlerinin yapılması için inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, ile canlılık testi uygulandı. MTT'nin mitokondriyal suksinat dehidrogenaz enzimi ile indirgenerek MTT-formazan kristallerine dönüşmesi temeline dayanan MTT testi, aslen mitokondriyal aktiviteyi ölçmesine rağmen dolaylı yoldan hücre canlılığının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (Erden Tayhan, 2019).



Şekil 9. Hücrelerin büyüme karakteristiklerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planı

Şekil 9’de görüldüğü gibi pleyt planı hazırlanarak uygun etiketleme yapılmıştır.

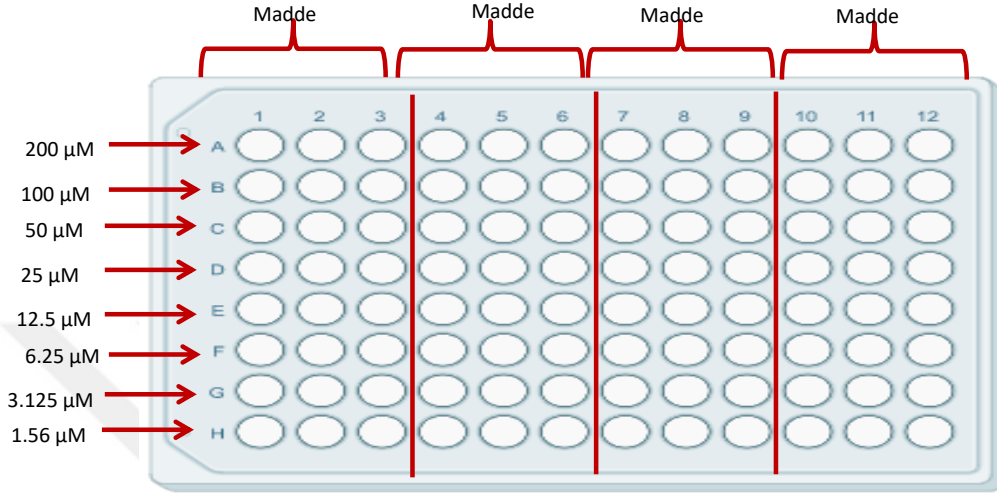
MTT testi için;

Pleytteki kullanılmış besi ortamı çekilmiş ve hücrelerin üzerine %10 MTT (0,5 mg/ml konsantrasyonda, PBS içerisinde hazırlanmış) içeren besi ortamı eklenmiştir. Hücreler karanlıkta 37 °C’deki %5 CO₂’li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. 3 saat inkübasyonun sonunda hücrelerin üzerindeki MTT içeren besi ortamı çekilmiştir. Hücrelerin üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Hücreler 2-3 dk boyunca 100 rpm’de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlanmıştır. Hücre kültür pleytleri UV spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutularak ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. İlgili prosedür 15 gün boyunca her 24 saatte bir bütün hücre hatları (meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC3) ve kolon kanseri (HT29), sağlıklı kolon (CCD-18Co), meme (MCF12A) ve prostat (RWPE-1)) için tekrarlanmıştır.

3.2.2 Polifenolik Bileşiklerin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Belirlenmesi

Yukarıda belirtilen ve TÜBİTAK tarafından desteklenen proje kapsamında sentezleri gerçekleştirilen bileşiklerin, kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin

belirlenmesi için öncelikle, meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC3) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları kültüre alınmış ve analiz için yeterli hücre sayısına ulaşana kadar kültüre devam edilmiştir.



Şekil 10. Polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planı

Yukarıda bahsettiğimiz MTT yöntemi için ilk olarak pleyt planı hazırlanmıştır. Tüm hücre hatlarında test edilecek maddelerinin uygulanmasının ardından 4, 24, 48 ve 72. saatte ölçümler gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin büyüme eğrileri dikkate alınarak bu testin başlangıç hücre sayılarına karar verilmiştir (Çizelge 3). Bu sayılara karar verirken hücrelerin 24 saat sonunda logaritmik evreye girmiş olması gerekliliği göz önüne alınmıştır. Çünkü sağlıklı bir analiz için hücrelerin logaritmik evredeyken test bileşikleriyle buluşması gerekmektedir. Bu sayede, söz konusu polifenolik bileşiklerin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayıp baskılamadığı net olarak gözlemlenebilmektedir.

Çizelge 3. Polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin ve sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi analizinde kullanılan başlangıç hücre sayıları

Kullanılan Hücre Hattının Adı	Teste Başlangıç Hücre Sayısı
HT29	5×10^4 h/ml
MCF7	5×10^4 h/ml
PC3	4×10^4 h/ml

RWPE-1	5x10 ⁴ h/ml
CCD-18Co	5x10 ⁴ h/ml
MCF-12A	4x10 ⁵ h/ml

Sentezi gerçekleştirilmiş olan söz konusu polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri, MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Bu uygulamada meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC3) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları ve kontrol olarak sağlıklı kolon (CCD-18Co), sağlıklı meme (MCF12A) ve sağlıklı prostat (RWPE-1) kullanılmıştır ve test edilen bileşikler (Çizelge 4) sekiz farklı konsantrasyonda (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM) denenmiştir.

Çizelge 4. Polifenolik bileşiklerin isimleri, deney sırasında kullanılan kod adları ve molekül ağırlıkları

MADDE ADI	KOD	MOLEKÜL AĞIRLIĞI
F-1	M1	258
P-1	M2	274
İP	M3	300
EP	M4	302
R-5	M5	274
2- met	M6	288
3- met	M7	288
4- met	M8	288
4- OH	M9	274
2-tertbutil	M10	314
2-propoksi	M11	316

İlgili bileşiklerin çözelti haline getirilmesi için kullanılan çözügen DMSO'dur ve hesaplama yapılırken ana stokta bulunan maksimum DMSO miktarının %0,1 olmasına dikkat edilmiştir. Böylelikle DMSO'dan gelecek herhangi bir sitotoksik etkinin önüne geçilmiştir. Steril ana stoklar hazırlandıktan sonra, ilk çalışma konsantrasyonu 200 µM

olarak ayarlanmış, ardından seri dilüsyonlar yapılarak sekiz farklı konsantrasyonda maddenin seyreltilmesi sağlanmıştır.

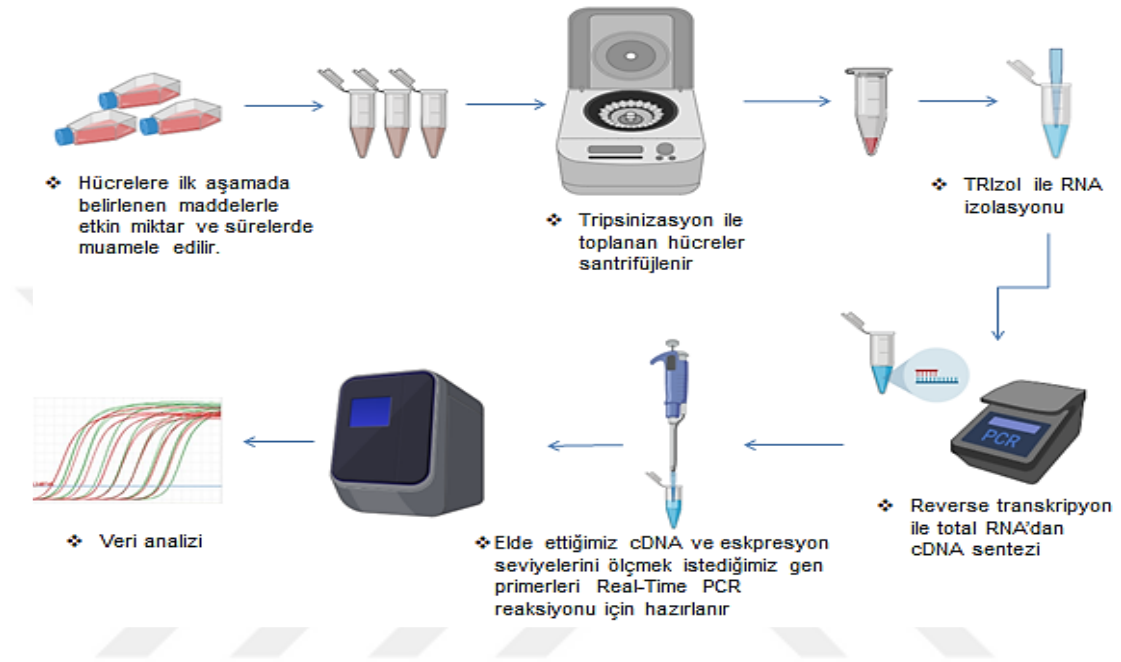
Önceki bölümlerde de belirtildiği üzere, Çizelge 3’de belirtilen başlangıç hücre sayıları pleytlere ekildikten 24 saat sonra (hücreler logaritmik evredeyken) gözlere, hazırlanmış çözeltiler (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM) uygulanmıştır. Söz konusu uygulama 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Madde ilavesi yapılan pleytlar 4, 24, 48 ve 72. Saat MTT testi ile canlılık analizi yapmak üzere 37°C’de, %5 CO₂ içeren %95 nem oranına sahip inkübatöre kaldırılmıştır. MTT için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekilmiştir ve hücrelerin üzerine 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT içeren besi ortamı eklenmiştir. Hücreler karanlıkta 37 °C’deki %5 CO₂’li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. UV spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutulmuştur ve absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Her bir örneğin absorbans değeri, o deney setine ait hücre kontrolün absorbans değerine oranlanıp % canlılık oranları belirlenerek grafiklenmiştir. Grafiklerde üç tekrarın ortalaması ± standart sapmaları (SD) sütun grafik olarak verilmiştir. Uygulanan testten elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad Prism programı (versiyon 6, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

3.2.3 Antiproliferatif Aktivitesi Yüksek Olan Polifenolik Bileşiklerin Etkili Olduğu Konsantrasyonlarda Hücre Ölümü (Apoptoz) ile İlgili Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında, yapılan MTT testi sonucuna bakılarak sekiz farklı konsantrasyon (200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM) içerisinde polifenolik bileşiklerin en etkin olduğu konsantrasyonlar belirlenmiştir ve en etkili maddeler olan M2 ve M7 ile çalışmaya karar verilmiştir. Meme kanseri (MCF-7), prostat kanser (PC3) ve kolon kanser (HT29) hücrelerinde apoptozda görev alan önemli genlerin (Bcl-2, Bax, p53 ve Kaspaz-3) mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri, gerçek

zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla hücrelerden önce RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş; ardından, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile cDNA sentezlenmiştir.



Şekil 11. Programlı hücre ölümü (apoptoz) ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

MCF7, HT29 ve PC3 hücre hatları, 25 cm²'lik flasklara ekilmiştir. Her bir hücre hattı için birer flaska etken madde verilmeyerek kontrol grubu oluşturulmuştur. Birer flaska da ilgili hücreler proje kapsamında sentezlenecek maddelerden MTT testi sonucu anti-proliferatif aktivitesi olduğu tespit edilen madde/maddelerin etkin konsantrasyonlarıyla, etkinlik gösterdiği belirlenen süre boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrası besi ortamı uzaklaştırılıp, kültive edilmiş hücrelerden total RNA, TRIzol kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda izole edilmiştir. Total RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazı (Denovix DS-11) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen RNA -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Yapılan alışmalar sonucunda M2 ve M7 maddelerinin çalışmalarda kullanılan meme kanseri hücre hattı (MCF-7), prostat kanseri hücre hattı (PC-3) ve kolon kanseri hücre hattı (HT-29) zerinde özellikle 48. Saat sonunda anti-proliferatif etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Ve deney planı bu bilgi doğrultusunda oluşturulmuştur.
- M2 ve M7 maddelerinin hücrelerle etkileşiminden 48 saat sonra yapılan canlılık testi sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri kullanılarak RNA izolasyonuna başlamadan önce hücrelere muamele edilecek madde miktarları belirlenmiştir.
- Belirtilen bu hususlar çerçevesinde, M2, M7 ve madde ile muamele edilmemiş kontrol grubu olmak üzere her hücre ayrı ayrı T25'lik flasklara alınmıştır. Devam eden günlerde hücrelerin %80-90 konfluensiye ulaştığı görüldüğünde maddeler belirlenen konsantrasyon değerlerine seyreltilerek hücre besi ortamlarına eklenmiştir.
- Hücrelerin madde ile etkileşiminden 48 saat sonra mikroskopta görüntü alınarak hücrelerin apoptoza yönelim gösterdikleri tespit edilmiştir. Daha sonra tripsinizasyon işlemi ile hücreler flasklardan kaldırılarak 15 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. 800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücre pelleti 1 ml besi ortamı ile toplanarak 2 ml'lik efendorf tüpe alınmıştır. RNA izolasyonu aşamasına geçmeden önce besi ortamını uzaklaştırmak için hücreler 4 C'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra, ilgili firmanın TRIzol ile RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

Total RNA'dan Revers Transkripsiyon ile Komplementer DNA (cDNA) Sentezi):

Her bir örnekten izole edilen total RNA'dan tek zincirli cDNA, aşağıda verilen protokol doğrultusunda elde edilmiştir.

Çizelge 5’de verilen tüm PCR bileşenleri, steril, nükleaz-free PCR tüpüne konulmuştur ve reaksiyon, 42 °C’de 60 dk inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5. PCR bileşenleri

Total RNA	0.1 ng-5 µg
Primer (Oligo(dT)₁₈)	0.5 µg (100 pmol)
DEPC’li su	12.5 µL’e kadar
5x Reaksiyon tamponu	4 µL
dNTPmix (10 mM)	2 µL (1 mM)
Revers Transkriptaz	1 µL (200 U)
Toplam Hacim	20 µL

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time–PCR, RT-qPCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, qTOWER3G Real-Time PCR Thermocycler’da gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu çalışmada, RT-qPCR analizlerinde çift iplikli DNA’ya bağlanarak ışıma yapan EvaGreen boyası kullanılmıştır. EvaGreen, PCR için daha az inhibe edici ve SYBR Green ile kıyaslandığında daha az toksik olan, çift sarmallı DNA bağlayıcı bir boyadır. Serbest halde sulu çözelti içerisinde zayıf bir floresan olan bu boya çift sarmallı DNA ile bağlandığında oldukça floresan hale gelmektedir. Araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda kullanılır. Bu çalışmada, miktar tayini için göreceli kantifikasyon (relative quantification) yapılmıştır. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR), gen ekspresyon seviyesini ölçmek için göreceli bir miktar tayini olarak kullanılır. Primer olarak çizelge 6’da verilen tümör baskılayıcı gen p53, anti-apoptotik gen Bcl-2, apoptotik gen Bax ve referans (housekeeping) gen olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. GAPDH, glikolizin altıncı aşamasını katalize eden ve böylece hücrenin enerji sağlaması için glikozu parçalamaya yarayan bir enzimdir.

Çizelge 6. RT-qPCR'da kullanılan primer dizileri

Primer	DNA dizisi (5' → 3')	Tm
P53	5'-GCCCAACAACACCAGCTCCT-3'	62.5°C
	5'-CCTGGGCATCCTTGAGTTCC-3'	62.5 °C
Bcl-2	5'- ATCGCCCTGTGGATGACTGAG-3'	63.3 °C
	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'	65.3 °C
Bax	5'-GGACGAACTGGACAGTAACATGG-3'	64.7 °C
	5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'	62.9 °C
GAPDH	5'-GGATTGGTCGTATTGGG-3'	64.5 °C
	5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'	65.39 °C

Çizelge 7. Real-Time PCR bileşenleri

Primer 1	1 µL
Primer 2	1 µL
dNTP mix	0.2 µL
PFu	0.5 µL
10X Buffer	1 µL
20X EvaGreen	0.5 µL
cDNA	1.2 µL
Su	4.6 µL
Toplam Hacim 10 µL	

PCR reaksiyonu için Çizelge 7'de belirtilen bileşenler Real-Time PCR cihazında kullanılan özel şeffaf düz kapaklı PCR tüpleri içerisinde kabarcık olmamasına dikkat edilerek karıştırılmıştır ve cihaza yerleştirilmiştir. Başlangıç denatürasyonu 94°C'de 3 dakika ve bunu takiben toplam 40 döngü; 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 56 °C'de 30 saniye bağlanma ve 72 °C'de 1 dakika zincir uzaması gerçekleşecek şekilde PCR programı qTOWER3G Real-Time PCR cihazında oluşturulmuştur. Uzama DNA polimeraz enziminin en yüksek aktiviteye sahip olduğu 72 °C'de gerçekleşir. Enzim türüne göre süreyi ayarlarız. PFu enzimi 1 dakikada 600 baz ekleme kapasitesine sahiptir.

Erime eğrisi analizi için 40. döngünün sonuna melting curve analizi eklenmiştir. PCR ürünlerinin varlığı ve saflık kontrolleri erime eğrisi analizleriyle yapılmıştır.

mRNA Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması:

Real-time PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kantifikasyonu için “Komperatif $\Delta\Delta CT$ ” yöntemi kullanılmıştır. $\Delta\Delta CT$ değeri; PCR ürünlerinin miktarındaki önemli artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir. Kalibratör olarak referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubundan yararlanılmıştır. Hedef genin bir kontrol gene (GAPDH) göre relatif ekspresyonuna bakılmıştır. Bu yöntem düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir. Hesaplama yaparken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{Kontrol } \Delta CT = \text{Kontrol } CT_{(\text{gen})} - \text{Kontrol } CT_{(\text{GAPDH})}$$

$$\text{Örnek } \Delta CT = \text{Örnek } CT_{(\text{gen})} - \text{Örnek } CT_{(\text{GAPDH})}$$

$$\Delta\Delta CT = [(\text{Örnek } \Delta CT)_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta CT)_{\text{ort.}}]$$

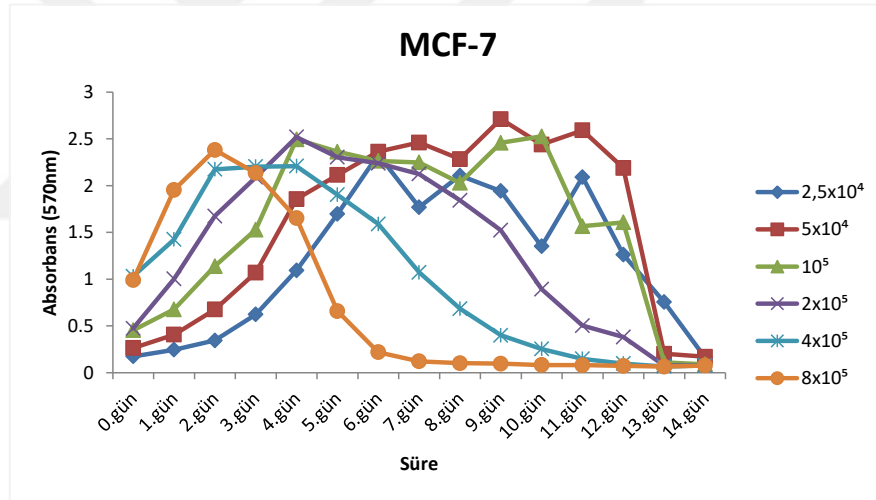
$$\text{Hedef gen mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

PCR eksponansiyel bir süreç olduğundan değişim 2'nin üstel fonksiyonu şeklinde ifade edilmektedir. Kontrol için elde edilen $\Delta\Delta CT$ değerleri yaklaşık olarak “0” olduğu $2^{-\Delta\Delta CT}$ için değerleri “1” dir. Elde ettiğimiz sonuç ilgilendiğimiz hedef genin örnek grubundaki ekspresyonunun kontrole göre relatif miktarıdır. Bir orantı ifadesi olduğundan birim içermez. Kontrole göre örnekteki hedef genin ekspresyonunun kaç kat arttığını veya azaldığını göstermektedir (Rao ve ark., 2007).

4. BULGULAR

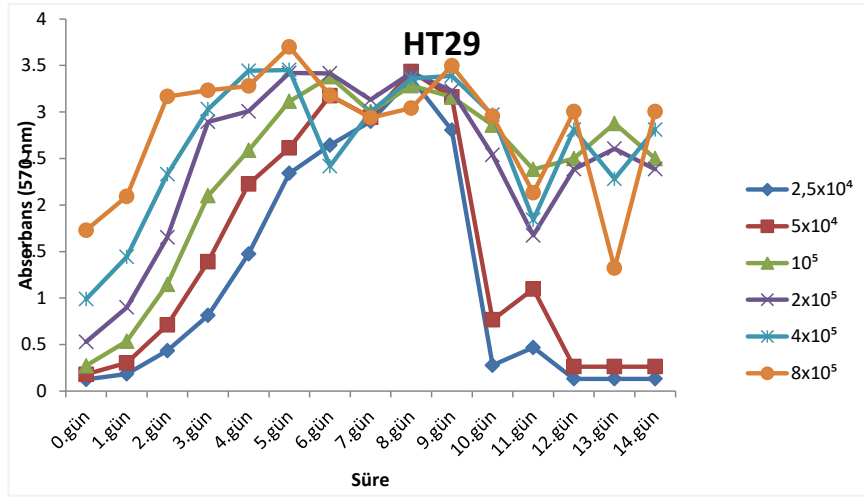
4.1 Büyüme Eğrisi Grafiklerinin Değerlendirilmesi

Yukarıda belirtilen uygulama basamakları izlenerek 15 gün boyunca MTT testi uygulanmış ve sonuçta, elde edilen absorbans değerlerinin zamana karşı grafiği çizilerek büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 12, 13, 14, 15, 16 ve 17). Oluşturulan büyüme eğrileri, hücrelerin kültüre adapte olduğu için yavaş ürettiği uyum dönemini, hücre sayısındaki artışın ivme kazandığı logaritmik dönemi, besin elementleri gibi kısıtlardan dolayı hücre sayısındaki artışın durduğu durağan dönemi ve hücrelerin ölmeye başladığı ölüm dönemini içermektedir.



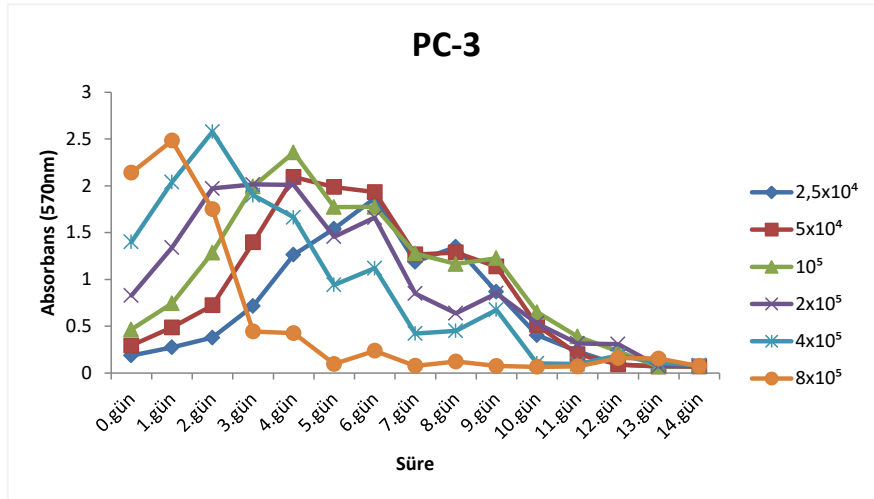
Şekil 12. MCF7 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

Şekil 12’de de görüldüğü üzere, MCF7 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği (adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) 5x10⁴ h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş eğridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur.



Şekil 13. HT29 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

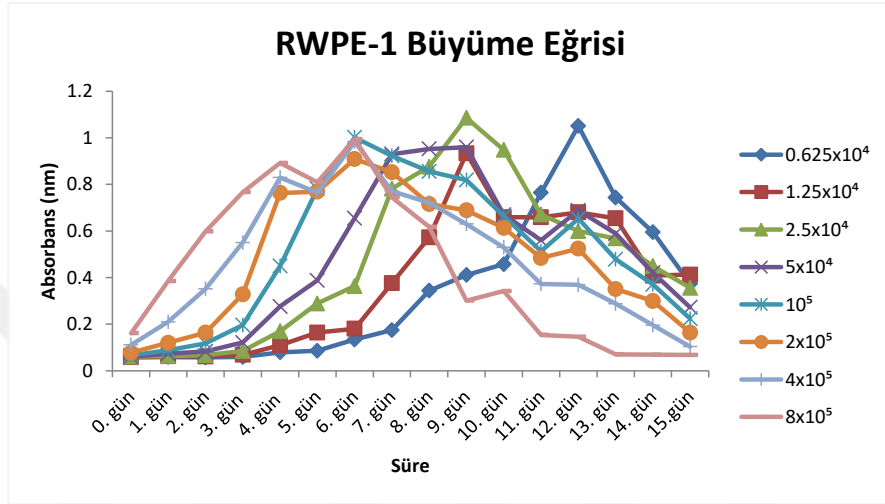
Şekil 13’de de görüldüğü üzere, HT29 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği (adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) $2,5 \times 10^4$ h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş eğridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur.



Şekil 14. PC3 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

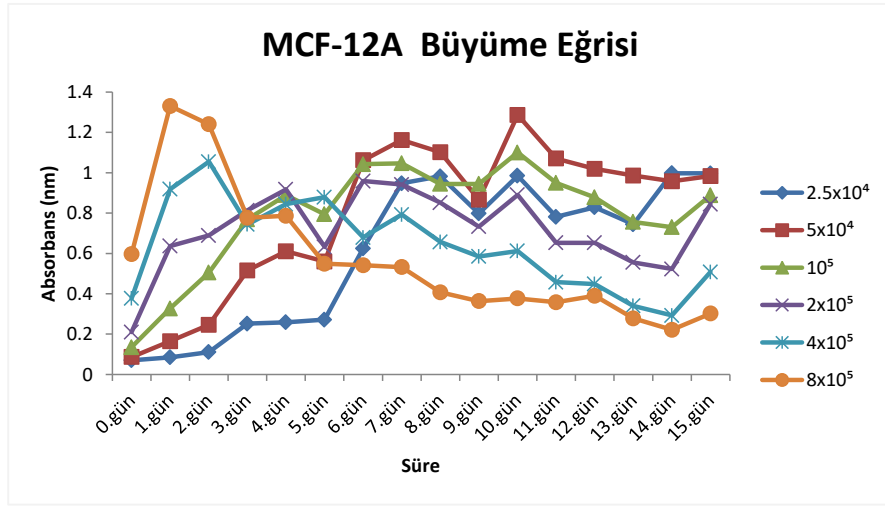
Şekil 14’de de görüldüğü üzere, PC3 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği

(adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) 5×10^4 h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş eğridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur.



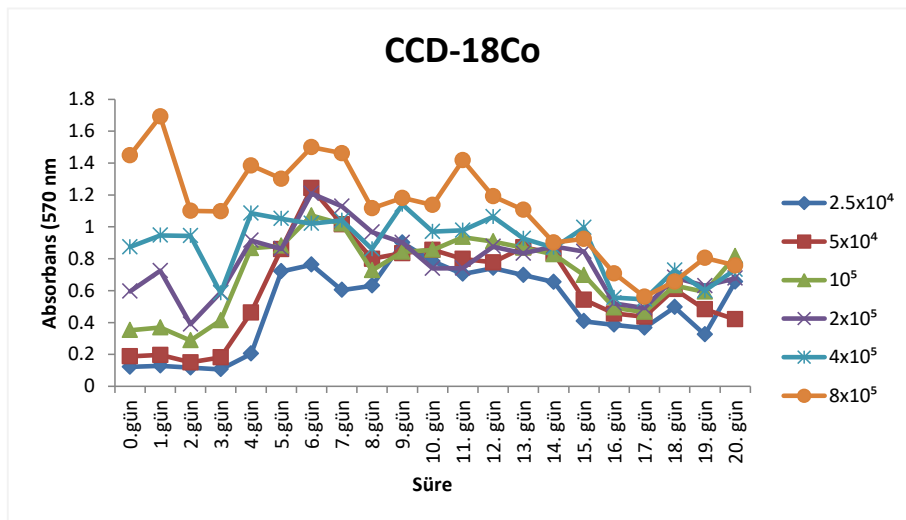
Şekil 15. RWPE-1 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

Şekil 15’de de görüldüğü üzere, RWPE-1 hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği (adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) 5×10^4 h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş eğridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur.



Şekil 16. MCF-12A hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

Şekil 16’da da görüldüğü üzere, MCF-12A hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği (adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) 10^5 h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş egridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur



Şekil 17. CCD-18Co hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristikleri

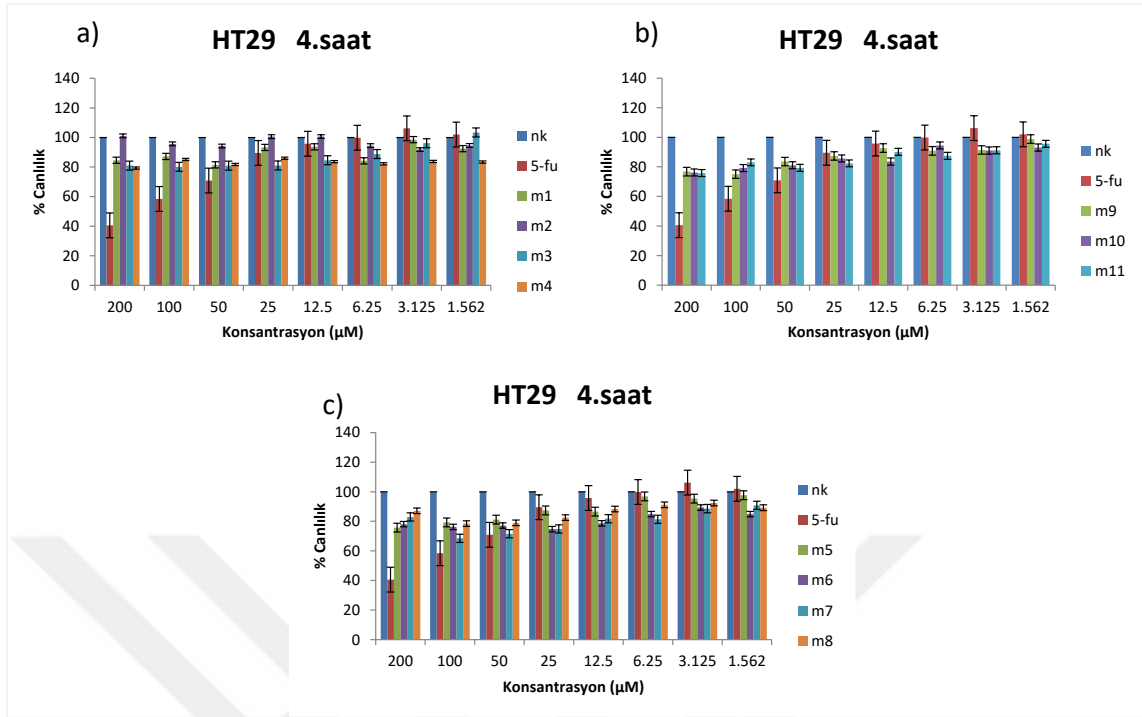
Şekil 17’de de görüldüğü üzere, CCD-18Co hücrelerinin farklı hücre konsantrasyonlarında gösterdiği büyüme karakteristiği incelendiğinde, en doğru büyüme eğrisi grafiği (adaptasyon, logaritmik büyüme, durağan ve ölüm fazının hepsinin yer aldığı grafik) 5×10^4 h/ml başlangıç hücre konsantrasyonu ile oluşturulmuş egridir. Dolayısıyla, projenin bir sonraki basamağını oluşturan, polifenolik bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde, ilgili hücre sayısı dikkate alınmış ve deney planı buna göre oluşturulmuştur.

4.2 Polifenolik Bileşiklerin Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Değerlendirilmesi

Elde edilen absorbans değerleri dikkate alınarak, GraphPad Prism 6.0 programıyla IC_{50} değerleri (hücre canlılığında %50 azalmaya neden olan inhibisyon konsantrasyonu) hesaplanmış (Çizelge 8) ve ek olarak maddelerin yüzde canlılık grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 18-29).

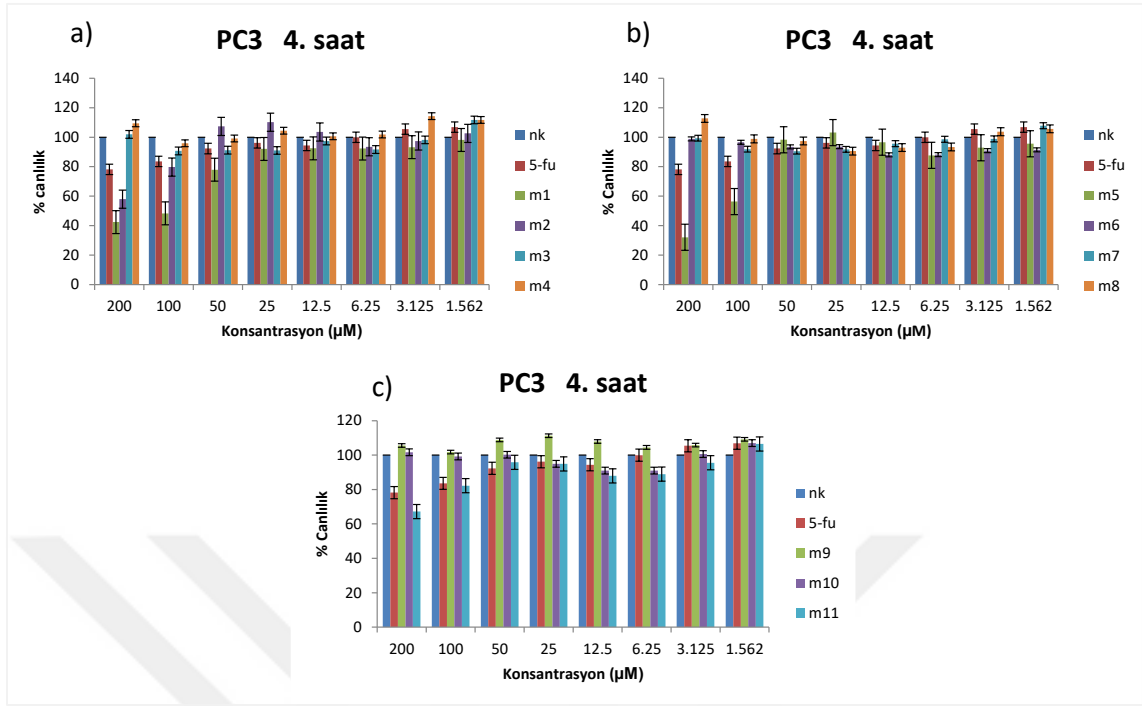
Çizelge 8. Polifenolik bileşiklerin farklı kanser hücre hatlarında ve farklı zamanlardaki IC_{50} değerleri (* ile gösterilen değerlere ait hücre canlılıkları negatif kontroldeki hücrelerin canlılığından yüksek olduğu için herhangi bir inhibisyon değeri hesaplanamamıştır.)

	4. SAAT			24. SAAT			48. SAAT			72. SAAT		
	HT-29	PC-3	MCF-7	HT-29	PC-3	MCF-7	HT-29	PC-3	MCF-7	HT-29	PC-3	MCF-7
M1	35.02	61.33	46.36	25.43	35.01	141.4	41.36	29.77	80.06	141.4	31.82	68.74
M2	6.53	99.85	3.94	202.5	64.80	129.9	163.1	60.14	82.73	122.6	52.10	76.12
M3	3.28	2.90	2.96	0.75	106.3	11.74	11.7	3.75	136.5	237.4	58.19	110.1
M4	1.69	4.80	6.62	0.72	167.7	111.6	514	62.75	106.2	115.9	46.28	87.16
M5	22.06	97.45	0.14	2.69	55.72	141.4	163.4	46.47	99.58	110.0	43.02	106.4
M6	76.95	60.66	61.24	55.39	16.98	141.4	667.6	86.00	126.4	89.12	37.66	60.83
M7	6.23	0.30	10.58	1.99	11.18	25.28	113.6	15.51	38.66	101.3	9.35	22.28
M8	15.19	3.26	24.99	0.48	5.67	2.55	191.1	47.51	177	221.7	54.62	293.5
M9	38.66	*	*	2.83	*	213.1	74.52	8.99	0.82	*	2.81	73.94
M10	24.39	*	17.35	4.36	188	141.4	99.86	26.89	200.8	367.6	1.59	223.3
M11	12.92	100.8	68.25	3.94	58.88	355.7	279.3	58.52	202.0	101.8	59.82	3.293
P.K	76.95	28.90	30.03	1.52	0.73	7.63	5.255	50	70.15	97.08	26.09	4.61



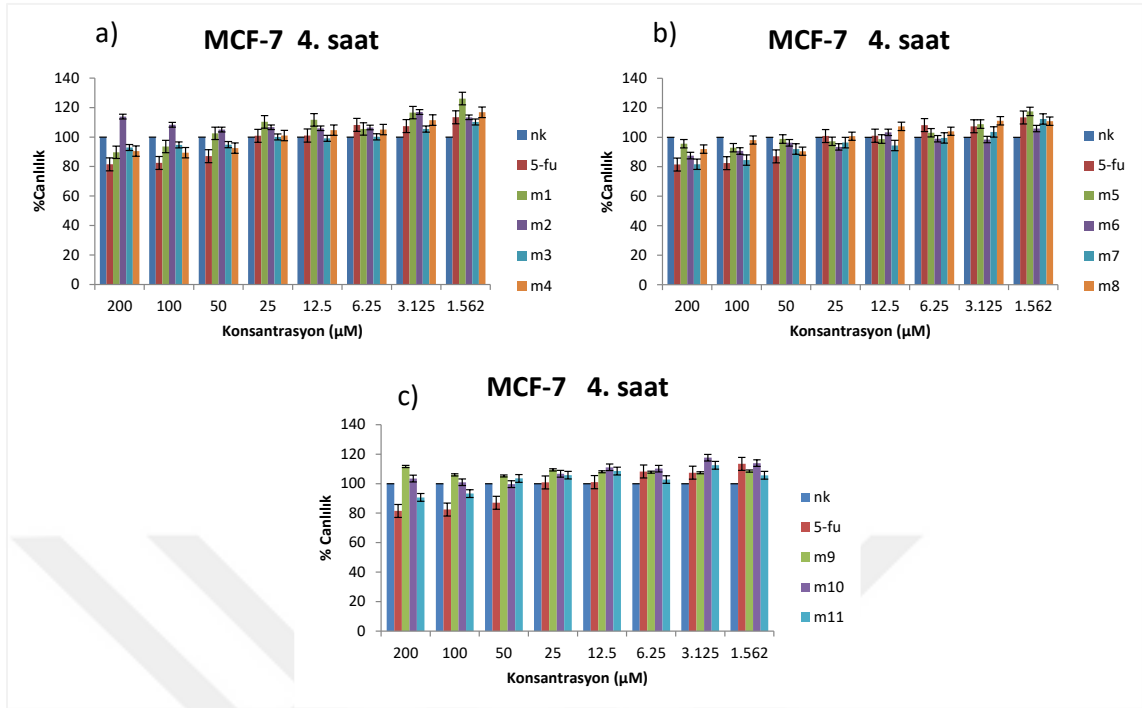
Şekil 18. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 4. saatteki etkileri

Şekil 18 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) olmak üzere antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. M4 bileşiğinin düşük dozlarda bile akut antiproliferatif etkisini devam ettirdiği, hücrelerin yaklaşık %80 canlılıkta kaldığı görülmektedir. Şekil 18 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) olmak üzere antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. M6 ve M7 bileşiklerinin diğerlerine göre daha yüksek antiproliferatif etki yarattığı görülmektedir. Şekil 18 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200, 100 ve 50 µM) olmak üzere antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Yüksek dozlarda her üç bileşiğin de oldukça etkili olduğu, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



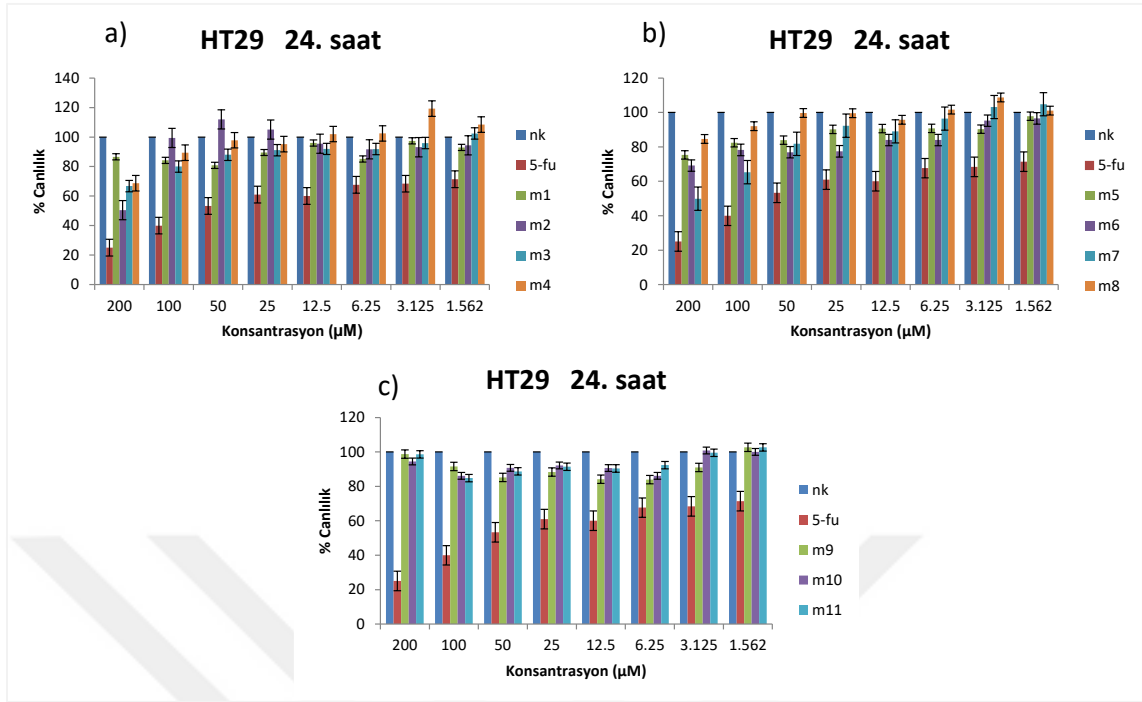
Şekil 19. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 M10, M11), PC3 üzerinde 4. saatteki etkileri

Şekil 19 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200, 100 ve 50 µM) M1 bileşiğinin oldukça etkili olduğu, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ek olarak M2'nin de yine yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) antiproliferatif etki yarattığı görülmektedir. Şekil 19 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M5 bileşiğinin oldukça etkili olduğu, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 19 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M11 bileşiğinin oldukça etkili olduğu, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



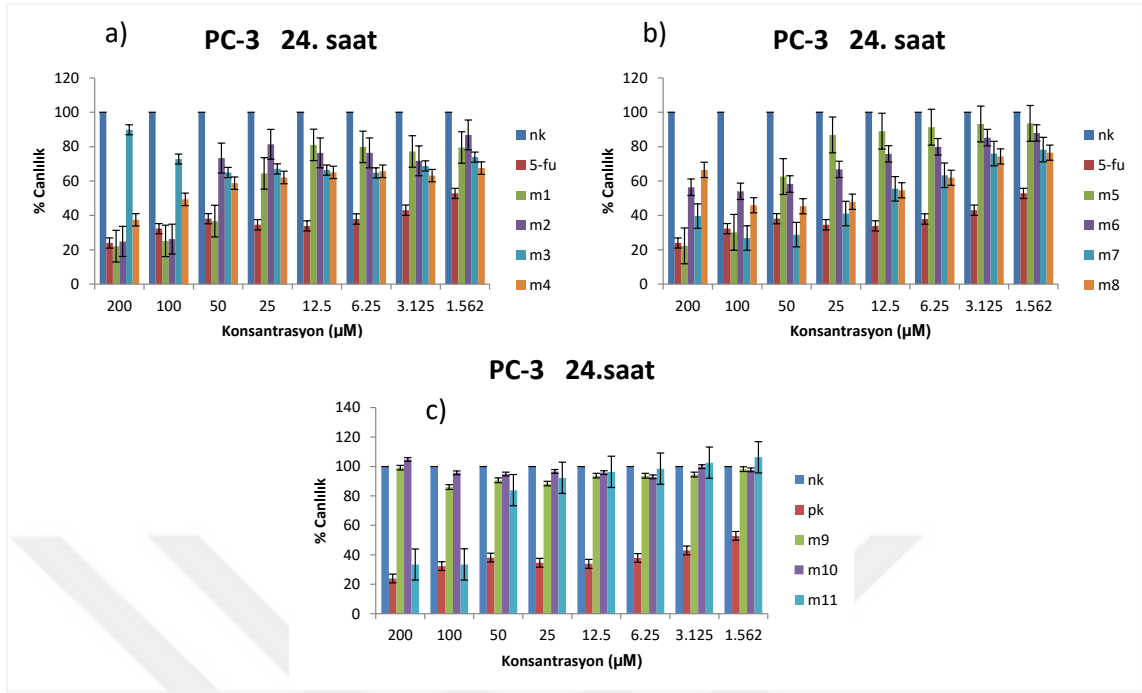
Şekil 20. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF7 üzerinde 4. saatteki etkileri

Şekil 20 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) M1, M3 ve M4 bileşiklerinin antiproliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 20 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) M5, M6 ve M7 bileşiklerinin antiproliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 20 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) M11 bileşiğinin antiproliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



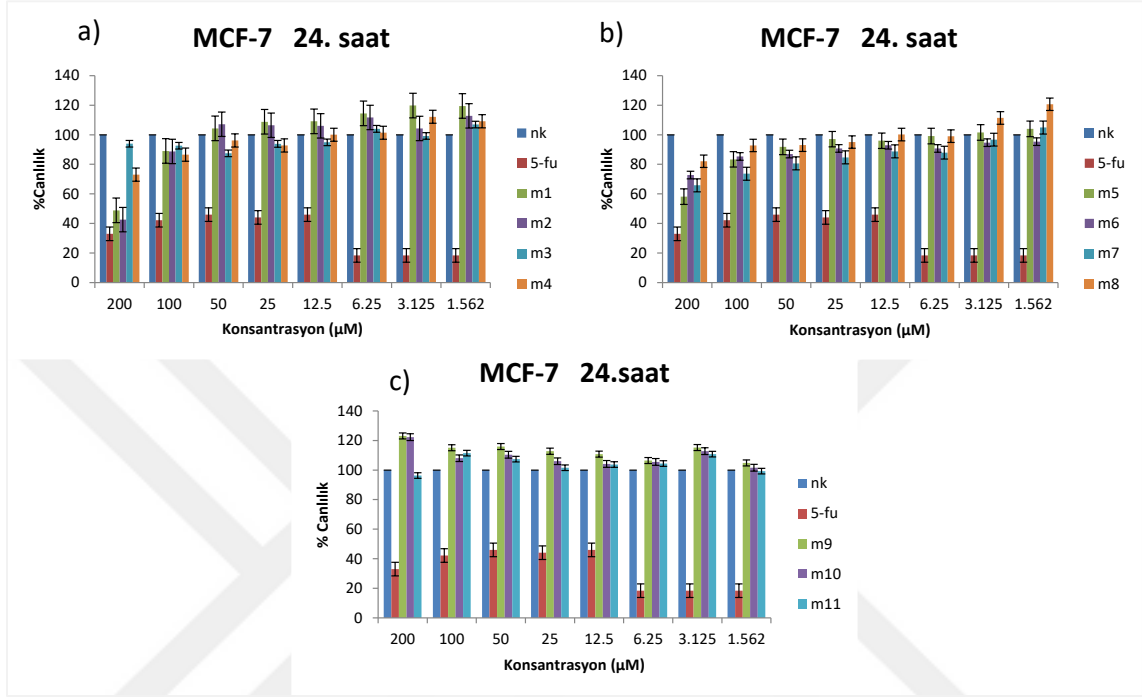
Şekil 21. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 21 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, M1, M2 ve M3'te madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı; M4'te ise yok olduğu belirlenmiştir. Şekil 21 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200, 100 ve 50 µM) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 21 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle bazı dozlarda (100-6,25 µM aralığında) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



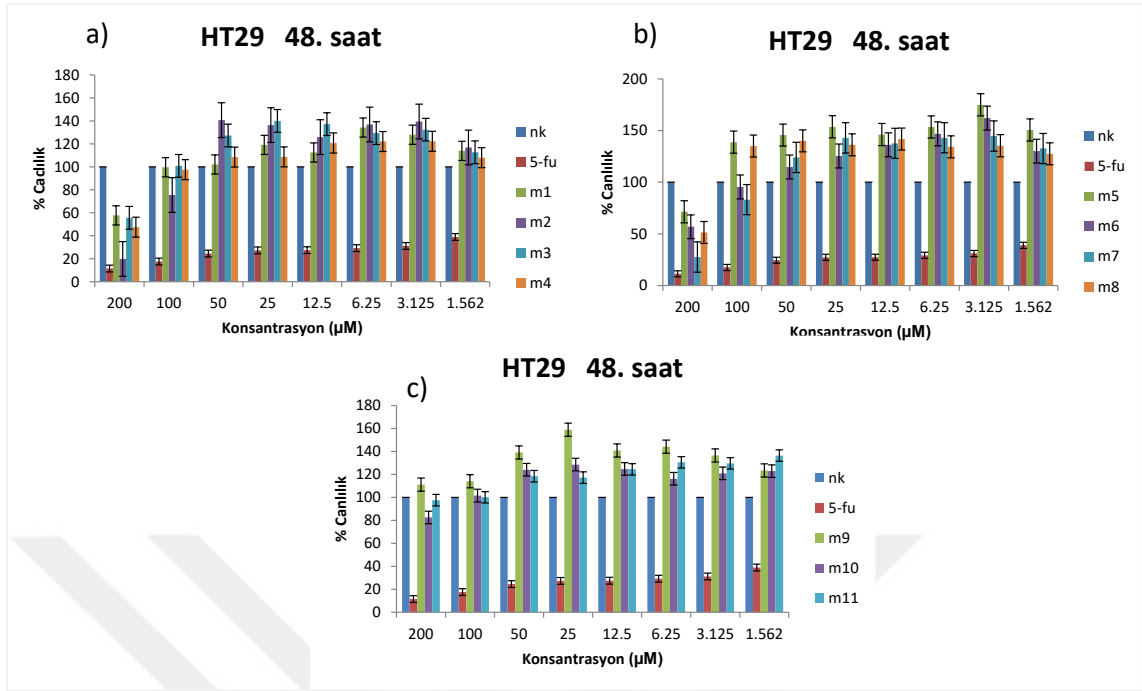
Şekil 22. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3 ve M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 22 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200-100 µM) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, özellikle M2 ve M4'ün çok etkin olduğu görülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda bu maddelerin mevcut kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 22 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200-100 µM) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, özellikle M5, M7 ve M8'in çok etkin olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise antiproliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. M7 bileşiği özellikle daha düşük konsantrasyon seviyesi olan 50 µM'da pozitif kontrol ile kıyaslandığında daha etkin olduğu görülmektedir. Hücre canlılığını %30-20 seviyesine kadar düşürmüştür. Şekil 22 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200-100 µM) tüm bileşiklerin antiproliferatif etki gösterdiği, özellikle M11'in çok etkin olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



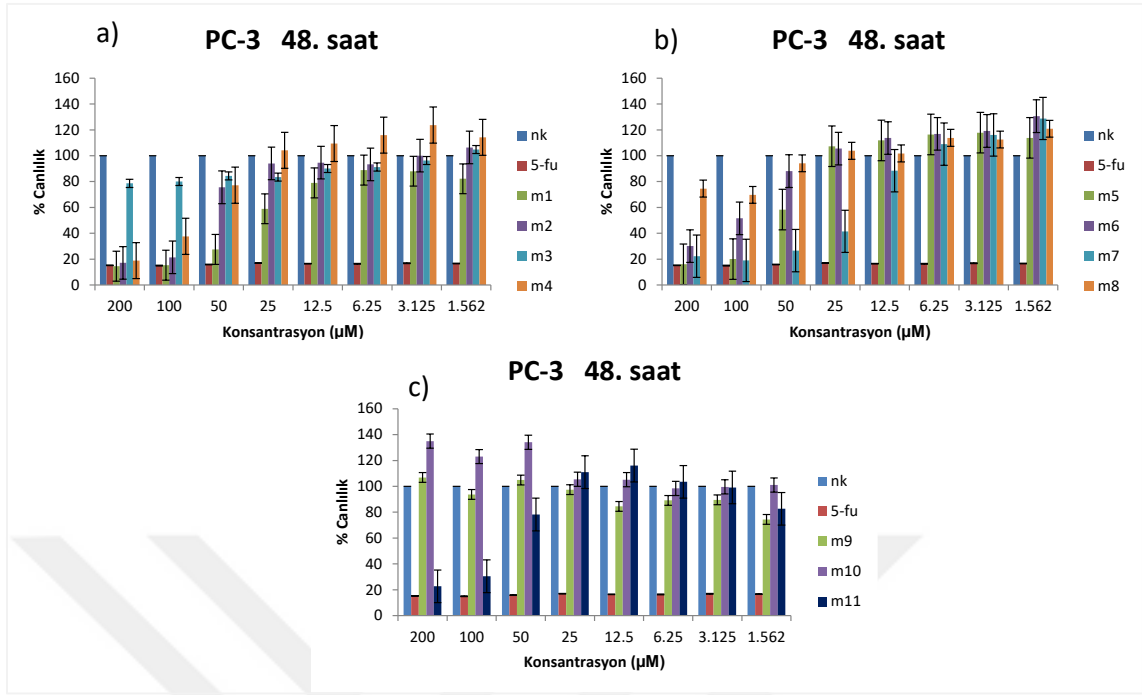
Şekil 23. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF7 üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 23 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 µM) M1 ve M2'nin anti-proliferatif etki gösterdiği, özellikle görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 23 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, negatif kontrol ile kıyaslandığında, özellikle yüksek dozlarda (200 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği, özellikle görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 23 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) M11'in düşük seviyede anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



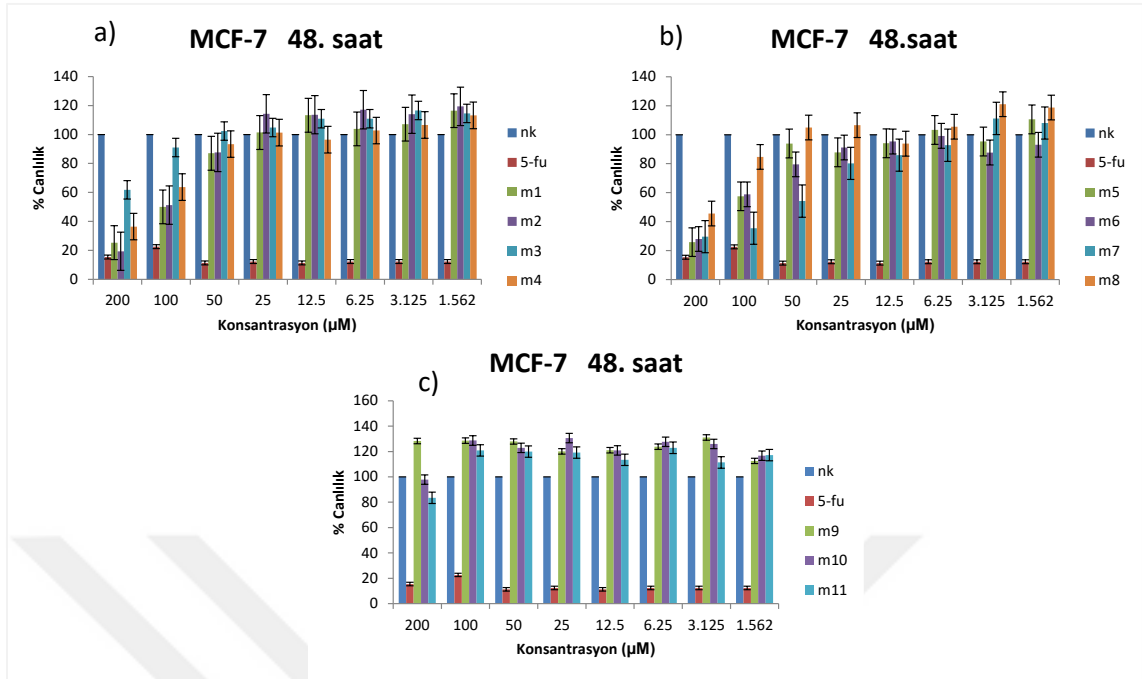
Şekil 24. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 48. saatteki etkileri

Şekil 24 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M3) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği; en etkili maddenin ise M2 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 24 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği; en etkili maddenin ise M7 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 24 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda sadece (200 µM) M10'un anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



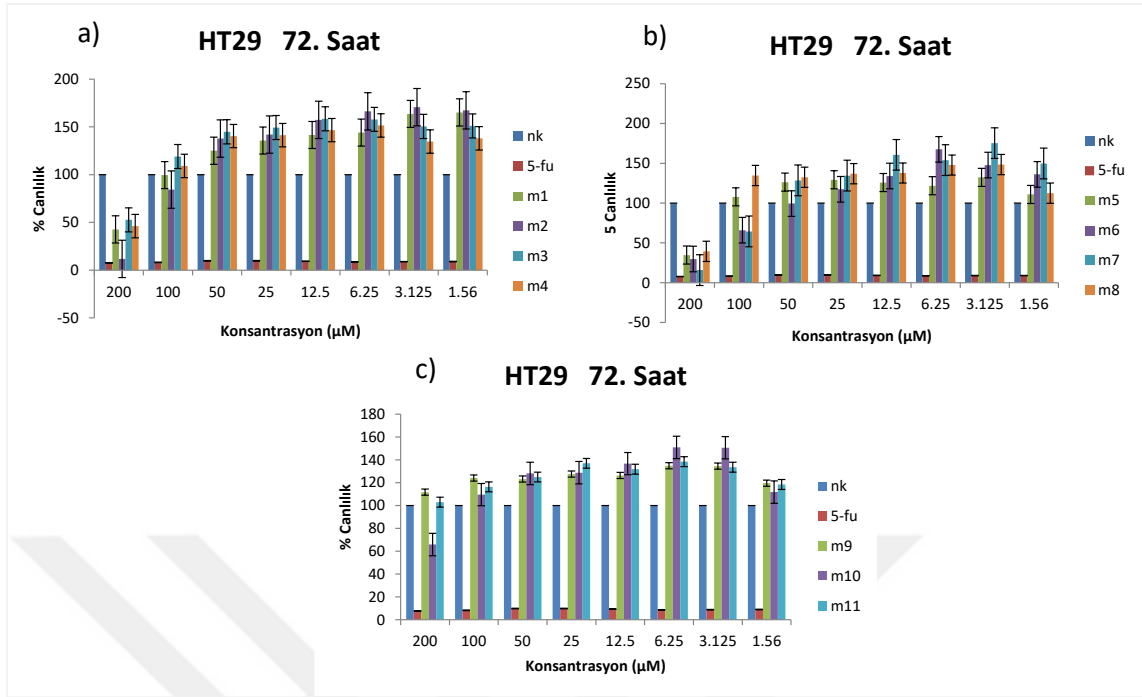
Şekil 25. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 48. saatteki etkileri

Şekil 25 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda sadece (200 ve 100 μM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 25 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği; ancak, M5, M6 ve M7'nin en etkin bileşikler olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 25 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μM) özellikle M11'in anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



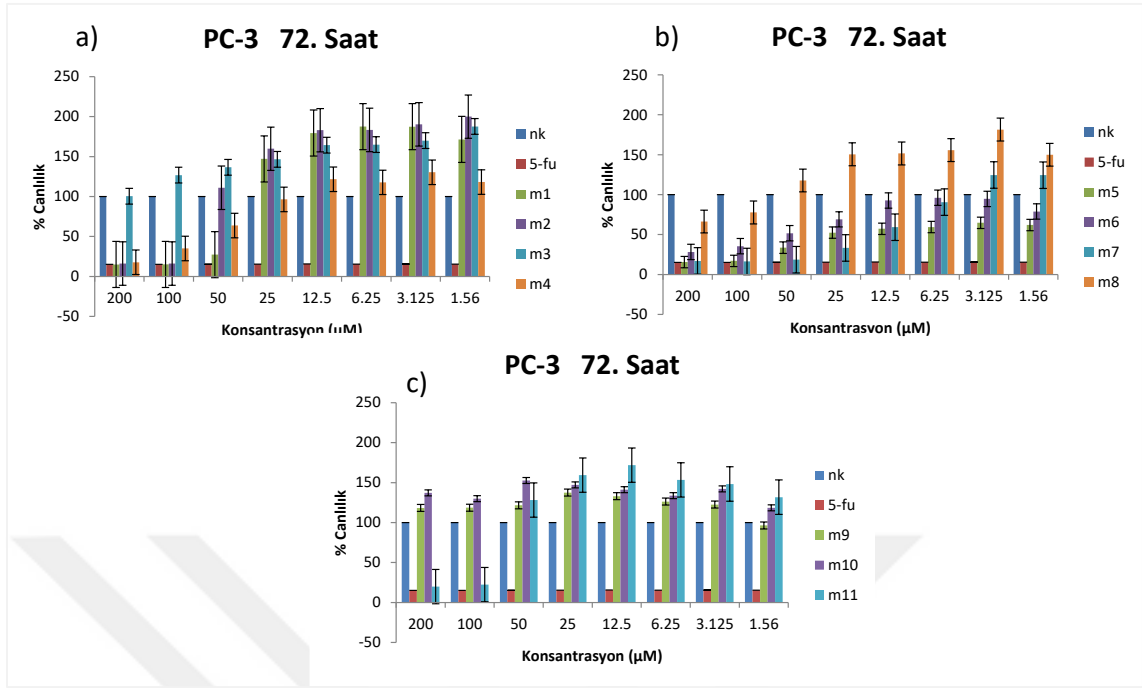
Şekil 26. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-7 üzerinde 48. saatteki etkileri

Şekil 26 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği, en etkin olanların ise M1 ve M2 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 26 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği, en etkin olanların ise M5, M6 ve M7 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 26 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 μ M) M11'in anti-proliferatif etki gösterdiği, görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



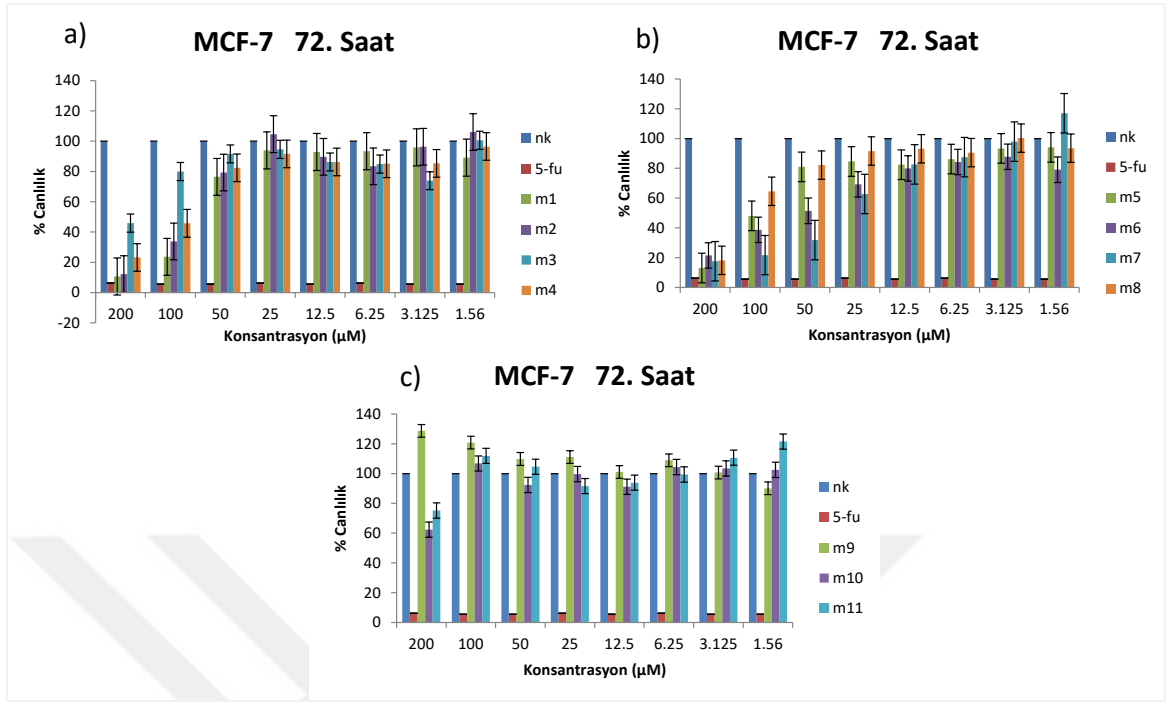
Şekil 27. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), HT29 üzerinde 72. saatteki etkileri

Şekil 27 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. En etkili maddenin M2 olduğu ve madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 27 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. En etkili maddenin M7 olduğu ve madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 27 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 µM) M10'un anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 28. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), PC3 üzerinde 72. saatteki etkileri

Şekil 28 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200, 100, 50 µM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği, en etkilisinin ise M1 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 28 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200, 100, 50 µM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği, en etkililerin ise M5, M6 ve M7 olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 28 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M11'in anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 29. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-7 üzerinde 72. saatteki etkileri

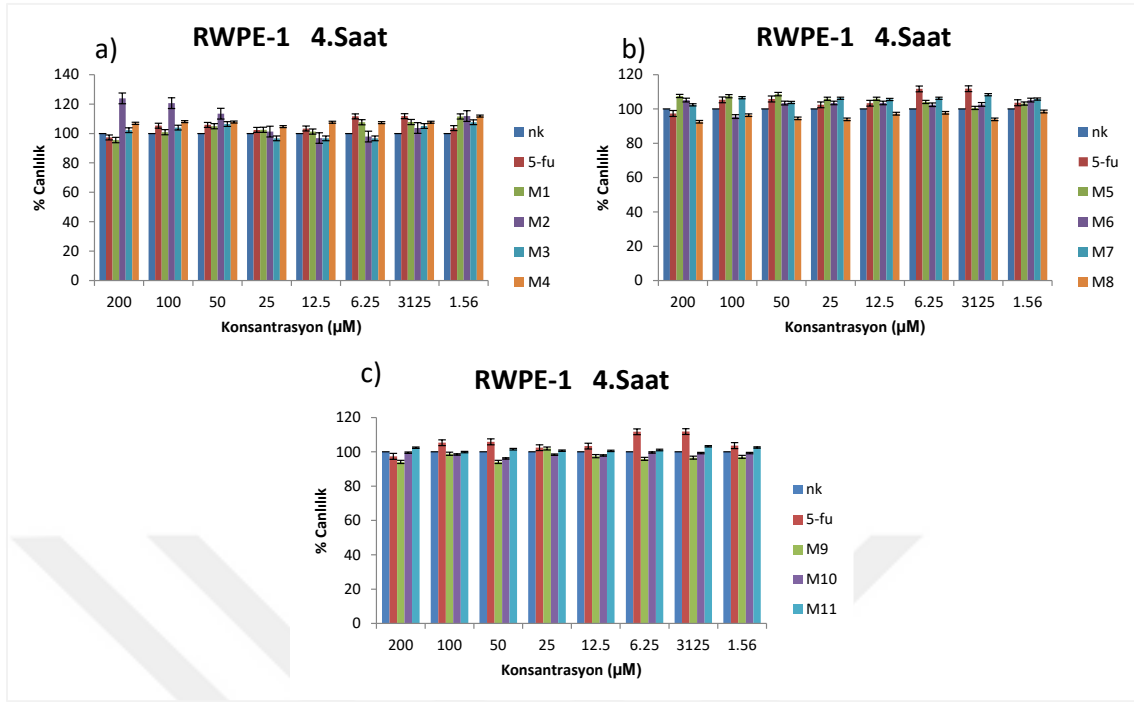
Şekil 29 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Özellikle M1 bileşiğinin aktif olduğu ortaya konmuştur. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 29 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μM) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Özellikle M7 bileşiğinin aktif olduğu ortaya konmuştur. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Şekil 29 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 μM) M10 ve M11'in anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.

4.3 Polifenolik Bileşiklerin Sağlıklı Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Kanser hücre hatlarına ek olarak kontrol olarak sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini görmek amaçlı yapılan çalışma sonucunda grafikler oluşturulmuştur (Şekil 30-41).

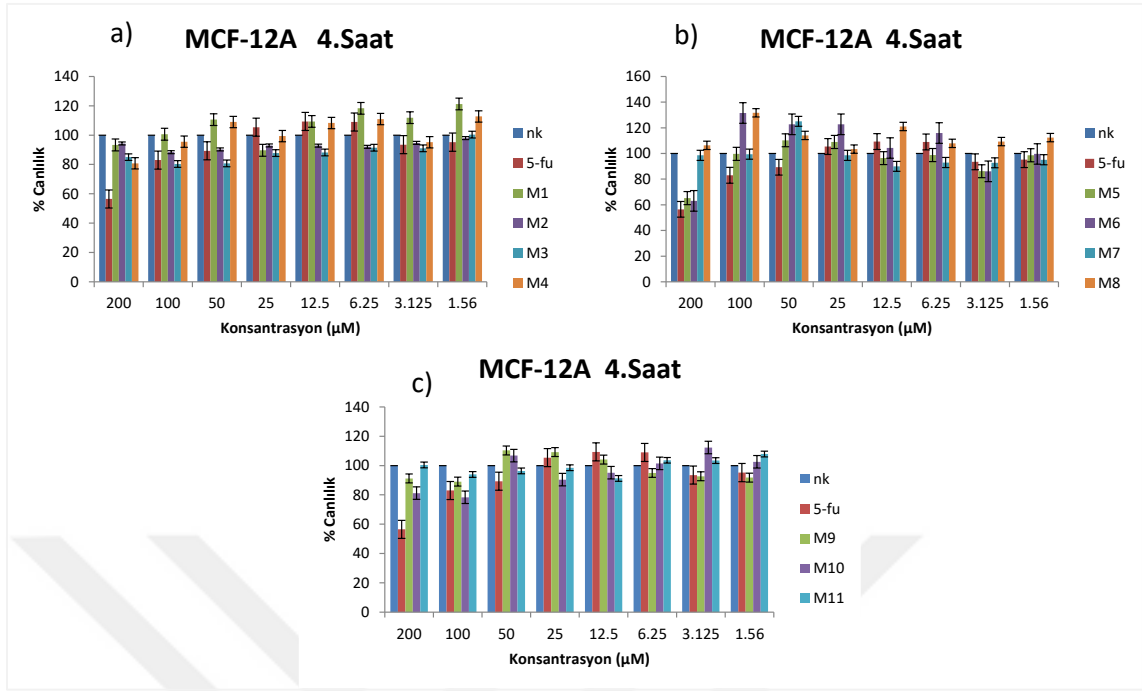
Çizelge 9. Polifenolik bileşiklerin farklı sağlıklı hücre hatlarında ve farklı zamanlardaki IC₅₀ değerleri (* ile gösterilen değerlere ait hücre canlılıkları negatif kontroldeki hücrelerin canlılığından yüksek olduğu için herhangi bir inhibisyon değeri hesaplanamamıştır.)

	4. SAAT			24. SAAT			48. SAAT			72. SAAT		
	CCD-18Co	RWPE-1	MCF-12A	CCD-18Co	RWPE-1	MCF-12A	CCD-18Co	RWPE-1	MCF-12A	CCD-18Co	RWPE-1	MCF-12A
M1	*	*	*	*	102.8	*	*	155.9	130.4	*	107.8	208.2
M1	*	*	*	136.4	*	*	89.23	103.6	193.2	81.52	67.8	*
M3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	192.5	*
M4	*	*	*	189.7	*	*	*	169.7	*	203.5	125.1	*
M5	*	*	*	*	*	*	*	155.96	*	*	121.9	*
M6	*	*	*	217.3	*	*	*	103.7	*	*	105.1	102.8
M7	*	*	*	203.3	*	*	179.8	146.5	*	161.7	80.61	170.1
M8	*	*	*	*	*	*	*	188.7	*	*	162.2	*
M9	*	*	*	*	*	*	212.8	*	*	*	*	*
M10	*	*	*	*	*	*	*	*	185.3	*	*	183.7
M11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	195.3	*
P.K	*	*	162.1	63.26	*	2.465	17.78	151.5	1.484	9.111	3.302	1.482



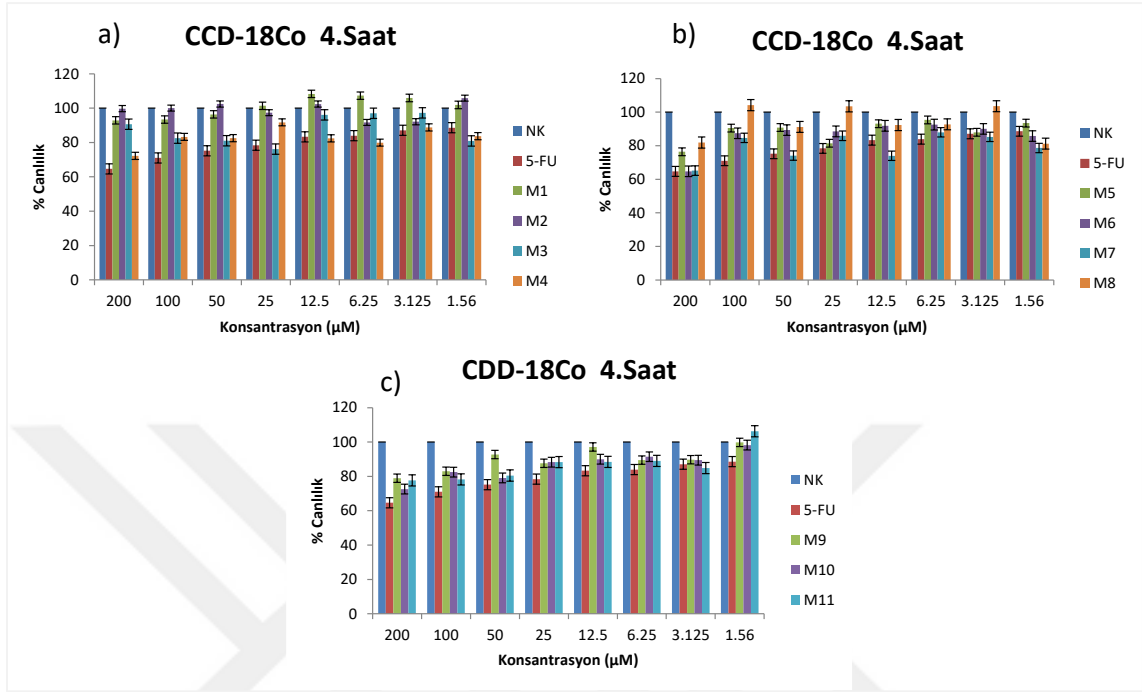
Şekil 30. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 4. saatteki etkileri

Şekil 30 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) olmak üzere kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisini göstermeye başlamış olan maddelerin, aynı konsantrasyonda RWPE-1 hücreleri üzerinde toksik bir etki oluşturmadığı görülmektedir. Yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M1 ve M2 maddelerinin prostat kanseri hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi görülürken, aynı maddenin insan sağlıklı prostat hücresi üzerinde negatif kontrolle kıyaslandığında toksik bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 30 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, bileşiklerin hücre üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. 4. saatte prostat kanseri hücre hattı (PC3) yüksek dozlarda oldukça etkili olan M5 bileşiğinin sağlıklı prostat hücresine toksik olmadığı görülmektedir. Şekil 30 (c) 'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, bileşiklerin hücre çoğalmasına olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Prostat kanseri hücre hattı üzerinde 200 µM konsantrasyonda etkili olan M11 maddesi, negatif kontrolle kıyaslandığında sağlıklı prostat hücreleri için toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 31. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 4. saatteki etkileri

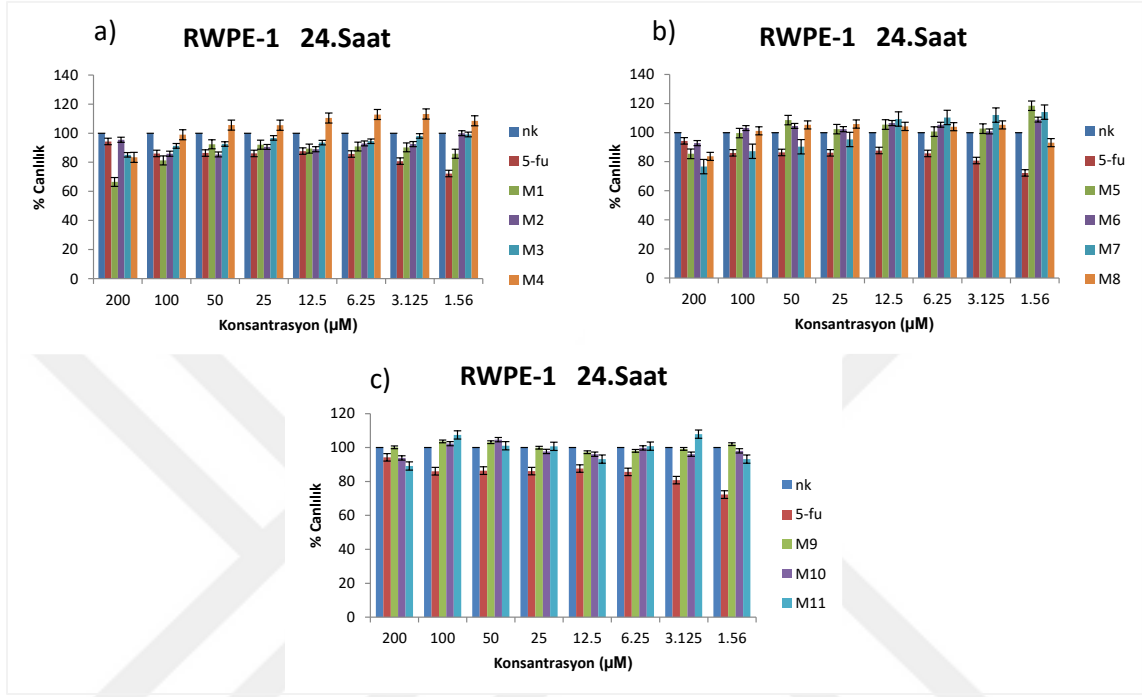
Şekil 31 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, negatif kontrol ile kıyaslandığında M1, M2, M3 ve M4 maddelerinin hücrelerin % canlılık oranını %90 - %80'a düşürdüğü görülmektedir. Ancak mevcut kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına bakıldığında hücre çoğalması üzerinde anlamlı bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 31 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle en yüksek doz olan 200 µM konsantrasyonda negatif kontrol ile kıyaslandığında M5 ve M6 maddelerinin hücre proliferasyonunu etkilediği belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında toksik etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Meme kanseri hücreleri üzerinde 4. Saatte M7 maddesi 100 µM konsantrasyonda anti-proliferatif bir etki gösterirken sağlıklı meme hücrelerinde aynı konsantrasyon değerinde herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 31 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında bileşiklerin hücre üzerinde anlamlı bir toksik etkisi görülmemektedir.



Şekil 32. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 4. saatteki etkileri

Şekil 32 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, negatif kontrol ile kıyaslandığında M1, M2, M3 ve M4 maddeleriyle muamele edilen hücrelerin proliferasyonunun azaldığı görülmektedir. Ancak rutin kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında maddelerin toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına bakıldığında hücre çoğalması üzerinde anlamlı bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 32 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle en yüksek doz olan 200 μ M konsantrasyonda negatif kontrol ile kıyaslandığında M6 ve M7 maddelerinin hücre proliferasyonunu etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca M7 bileşiğinin 12.5 μ M konsantrasyonda da sağlıklı kolon hücresi üzerinde anti-proliferatif etkisi görülmektedir. Ancak hücre canlılığı %60 seviyesinde olduğu belirlenmiştir ve maddenin toksik etkisi olmadığı görülmektedir. Şekil 32 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 4 saat sonra, özellikle pozitif

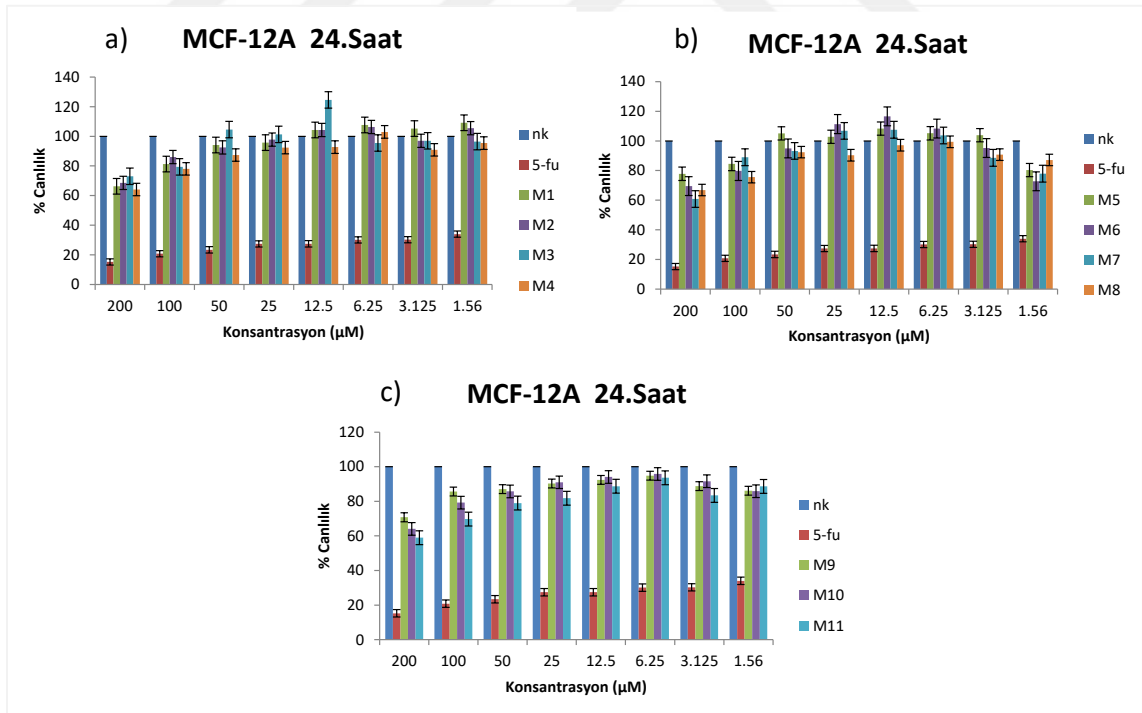
kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında bileşiklerin hücre üzerinde anlamlı bir toksik etkisi görülmemektedir.



Şekil 33. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 33 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle M1 maddesinin 200 µM konsantrasyonda anti-proliferatif etkisi görülmektedir. Bileşiklerin prostat kanseri hücre hattı (PC3) ile etkileşiminden 24 saat sonra, tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği, özellikle M1, M2 ve M4 maddelerinin oldukça etkin olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı prostat hücreleri ile yapılan çalışmada kanser hücrelerine etkili olan bu maddelerin (M1, M2 ve M4), sağlıklı prostat hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 33 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle en yüksek dozda (200 µM) M7 maddesinin anti-proliferatif bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak prostat kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M7 maddesinin prostat kanser hücre hattı ile etkileşiminden 24 saat sonra 200 µM konsantrasyonda hücre canlılığını %40-30 seviyesine düşürdüğü görülmüştür. Bileşiğin kanser hücreleri üzerindeki etkisi dikkate alındığında sağlıklı prostat

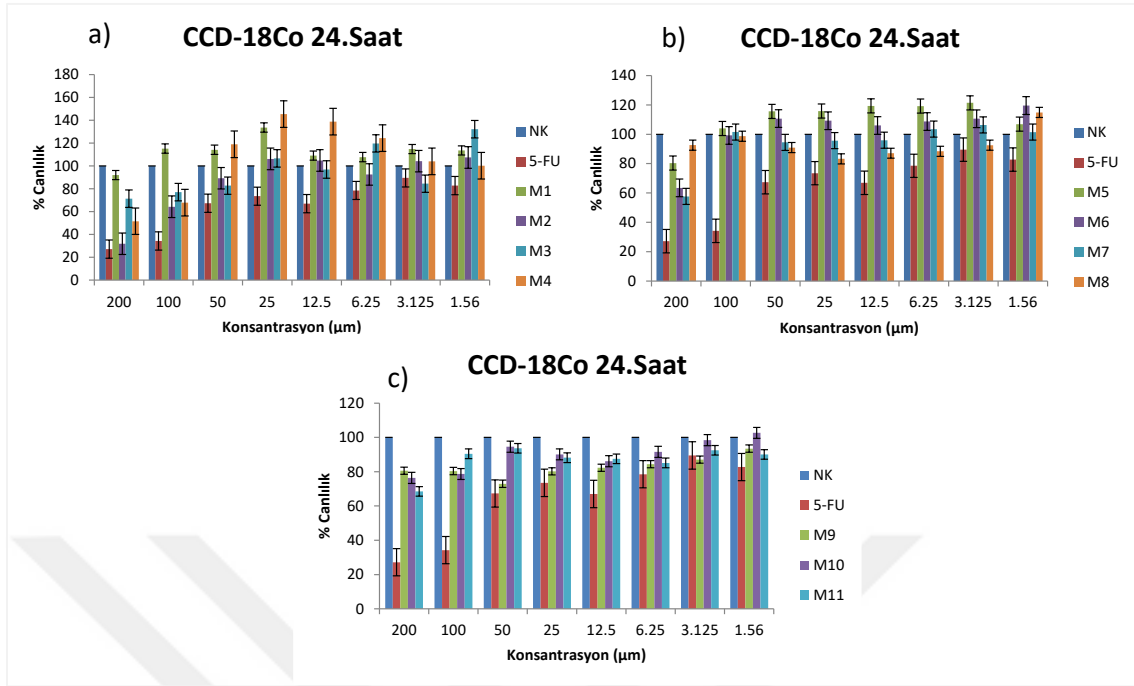
hücrelerine karşı aynı toksik etkiyi göstermediği belirlenmiştir. M7 maddesinin, 100 μ M konsantrasyonda prostat kanseri hücreleri üzerinde daha etkili olduğu ve hücre canlılığını %30-20 seviyesine düşürdüğü görülmüştür. Aynı madde (M7) 100 μ M konsantrasyonda sağlıklı prostat hücresine toksik değildir. Prostat kanseri hücre hattı üzerinde yüksek dozlarda (200-100 μ M) tüm bileşiklerin çok etkin olduğu görülmüştür. Özellikle M5 ve M8 'in çalışılan bütün konsantrasyonlarda oldukça etkin olduğu belirlenmiştir. Bu maddelerin (M5, M6 ve M8), sağlıklı prostat hücrelerine toksik etki göstermediği görülmektedir. Şekil 33 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, maddelerin hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Prostat kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada, bileşiklerle PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle M11 maddesinin yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) çok etkin olduğu görülmüştür. M11 maddesi aynı konsantrasyonlarda sağlıklı prostat hücrelerine toksik etki göstermemektedir.



Şekil 34. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 34 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) bütün

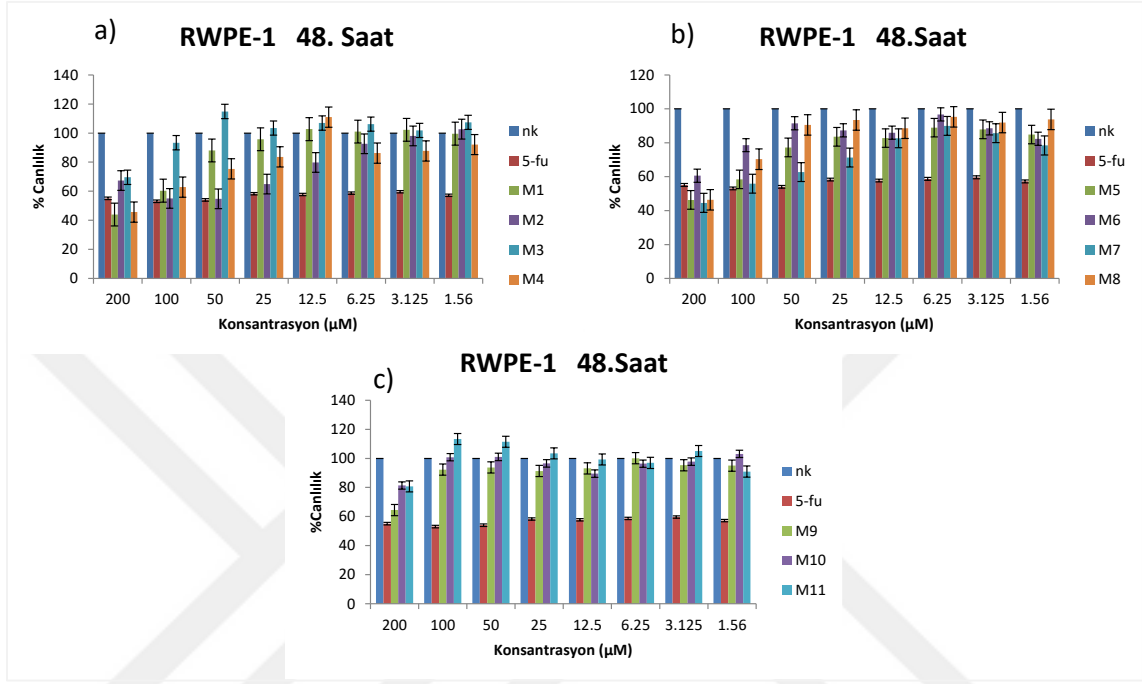
bileşiklerin hücre üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada M1 ve M2 maddelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminden 24 saat sonra, 200 μ M konsantrasyonda meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir. Aynı maddelerin (M1 ve M2) sağlıklı meme hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin daha düşük seviyede olduğu görülmüştür. Şekil 34 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Şekil 34 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) tüm bileşiklerin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir.



Şekil 35. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 24. saatteki etkileri

Şekil 35 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) M2 ve M3 maddelerinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak rutin kemoterapide kullanılan pozitif kontrol ile kıyaslandığında maddelerin daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 35 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) MCF7 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 μ M) M6 ve M7 maddelerinin anti-proliferatif etki gösterdiği, madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak rutin kemoterapide kullanılan pozitif kontrol ile kıyaslandığında maddelerin daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Bir önceki rapor döneminde yapılan çalışmada kolon kanseri hücre hattı üzerinde 100 ve 50 μ M konsantrasyonlarda etkili olan maddelerin aynı konsantrasyonlarda sağlıklı kolon hücresine toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda herhangi bir toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 35 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) CCD-

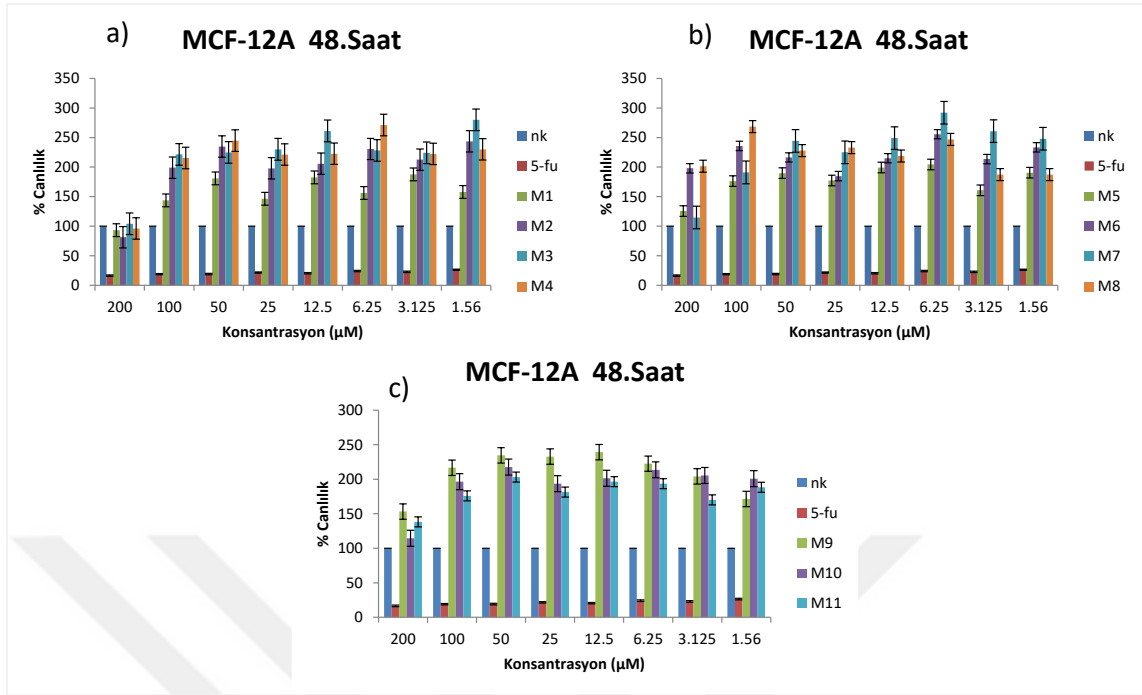
18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında bileşiklerin hücre üzerinde anlamlı bir toksik etkisi görülmemektedir.



Şekil 36. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 48. saatteki etkileri

Şekil 36 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda sadece (200 ve 100 µM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise toksik etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Prostat kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada, bileşiklerle PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle (200 ve 100 µM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. M2 maddesinin prostat kanser hücreleri üzerinde en etkin olduğu 200 µM konsantrasyonda aynı maddenin sağlıklı prostat hücreleri üzerindeki etkisi pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında daha azdır. Şekil 36 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda

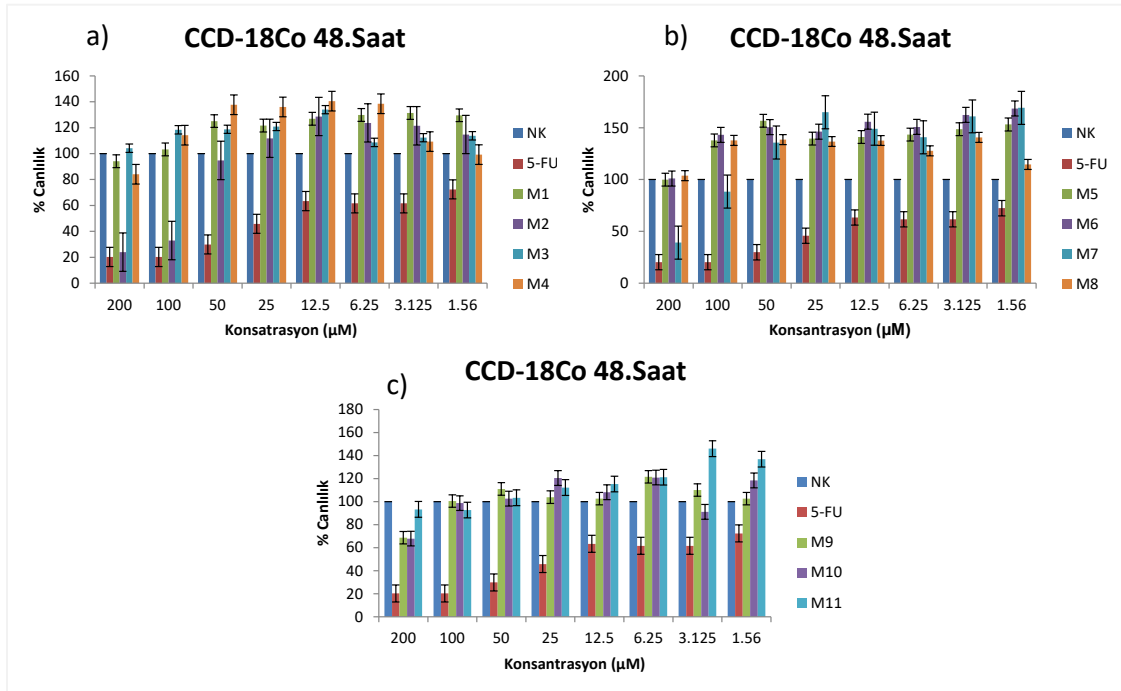
sadece (200 ve 100 μ M) M5, M7 ve M8'in anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise toksik etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Prostat kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M7 maddesinin prostat kanser hücre hattı ile etkileşiminden 48 saat sonra 200 μ M konsantrasyonda hücre canlılığını %25-20 seviyesine düşürdüğü görülmüştür. Bileşiğin kanser hücreleri üzerindeki etkisi dikkate alındığında sağlıklı prostat hücrelerine karşı aynı toksik etkiyi göstermediği belirlenmiştir. M7 maddesinin, 100 μ M konsantrasyonda prostat kanseri hücreleri üzerinde daha etkili olduğu ve hücre canlılığını %15-10 seviyesine düşürdüğü görülmüştür. Aynı maddenin (M7) 100 μ M konsantrasyonda pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında sağlıklı prostat hücrelerine daha az toksik etkisi olduğu belirlenmiştir. Şekil 36 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, maddelerin hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Prostat kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada, bileşiklerle PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 24 saat sonra, özellikle M11 maddesinin yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) çok etkin olduğu görülmüştür. M11 maddesi aynı konsantrasyonlarda sağlıklı prostat hücrelerine toksik etki göstermemektedir.



Şekil 37. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 48. saatteki etkileri

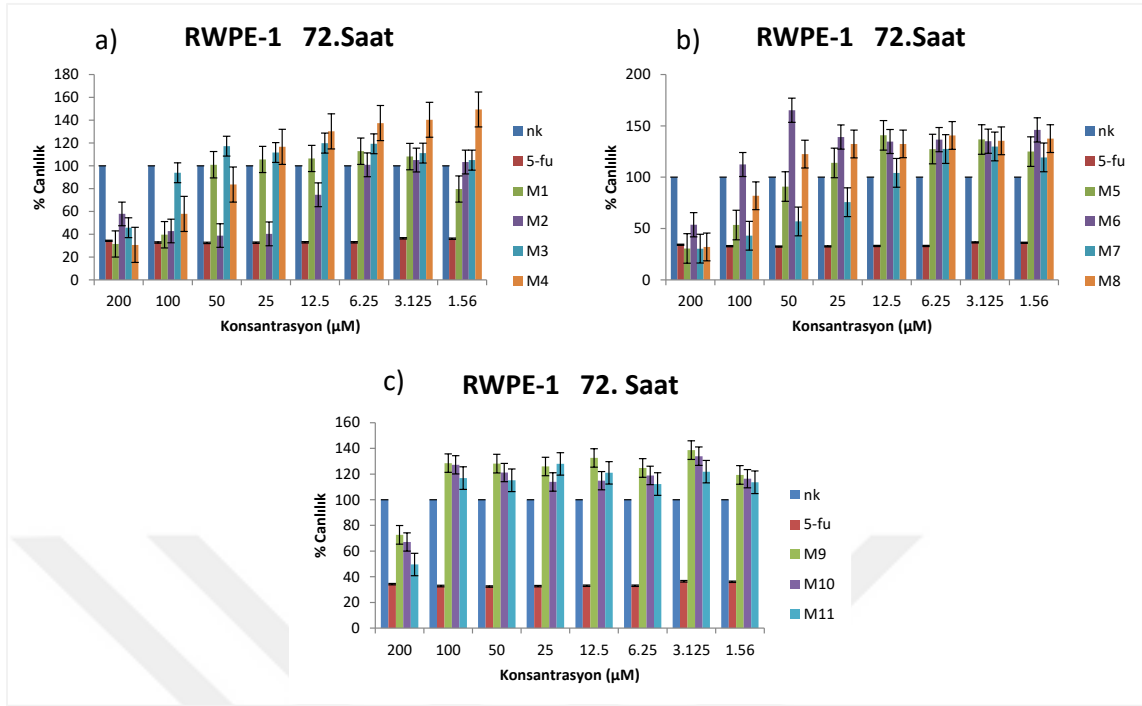
Şekil 37 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) bütün bileşiklerin hücre üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada M1 ve M2 maddelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminden 48 saat sonra, 200 µM konsantrasyonda meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir. Aynı maddelerin (M1 ve M2) sağlıklı meme hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin daha düşük seviyede olduğu görülmüştür. Şekil 37 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M5 ve M7 maddelerinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında bu maddelerin (M5 ve M7) toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Meme kanseri hücreleri ile

yapılan çalışmada M6 ve M8 maddelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminden 48 saat sonra, yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 100 μ M) meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir. Sağlıklı meme hücreleri ile yapılan çalışmada kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olan yüksek dozların sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca meme kanseri hücre hattı üzerinde etkili olan M7 maddesinin yalnızca 200 μ M konsantrasyonda sağlıklı hücreler üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir ve aynı konsantrasyonda ki pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında M7 maddesinin toksik etkisinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. M7 bileşiğinin meme kanseri hücreleri üzerinde etkili olduğu diğer konsantrasyonlarda (100 ve 50 μ M), sağlıklı meme hücrelerine toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 37 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle en yüksek dozda (200 μ M) M10 maddesinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi çok daha az olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir.



Şekil 38. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 48. saatteki etkileri

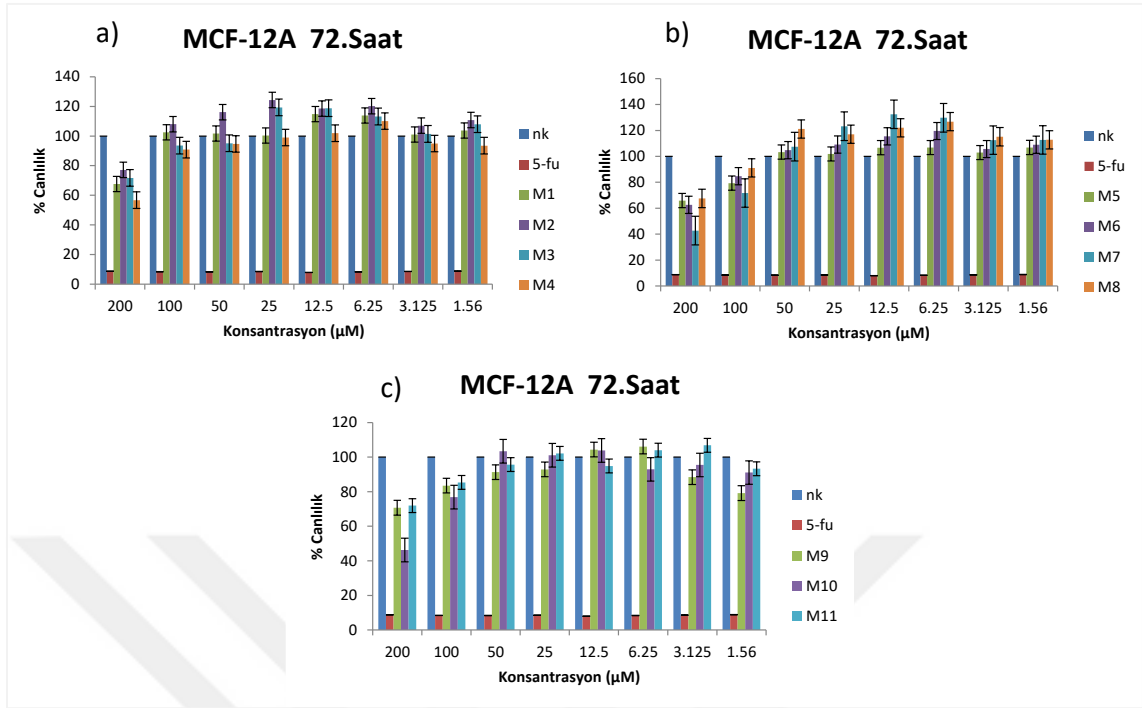
Şekil 38 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda sadece (200 ve 100 μ M) M2 maddesinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise toksik etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Bir önceki dönemde kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M2 maddesinin kolon kanser hücre hattı ile etkileşiminden 48 saat sonra özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 100 μ M) anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Sağlıklı prostat hücreleri ile yapılan çalışmada 48. saatin sonunda M2 maddesinin yalnızca 200 ve 100 μ M konsantrasyonda anti-proliferatif olduğu ancak pozitif kontrol (5-Fu)'dan daha az toksik olduğu görülmüş ve diğer konsantrasyonlarda M2 maddesinin toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 38 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 μ M) M7 maddesinin anti-proliferatif etki gösterdiği olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca M7 maddesinin pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında daha az toksik olduğu görülmektedir. Bir önceki dönemde kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M7 maddesinin kolon kanser hücre hattı ile etkileşiminden 48 saat sonra özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 μ M) anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Kolon kanseri hücrelerinin hücre canlılığı %20 seviyesine kadar düştüğü belirlenmiştir. Ancak sağlıklı kolon hücreleri üzerinde M7 maddesinin toksik etkisi olmasına rağmen hücre canlılığı %40-50 civarında olduğu görülmektedir. Kolon kanseri hücre hattı üzerinde etkili olan diğer bileşiklerin (M6 ve M8), sağlıklı kolon hücreleri üzerinde toksik etkisi görülmemektedir. Şekil 38 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle yüksek dozda sadece (200 μ M) M9 ve M10'un anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak rutin olarak kullanılan kemoterapi ilacı 5-Fu ile kıyaslandığında maddelerin toksik etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Konsantrasyon azaldıkça bileşiklerin anti-proliferatif etki göstermediği ancak pozitif kontrol (5-Fu)'nun toksik etkisinin devam ettiği görülmektedir.



Şekil 39. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), RWPE-1 üzerinde 72. saatteki etkileri

Şekil 39 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3 ve M4) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda sadece (200, 100µM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise toksik etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Prostat kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada, bileşiklerle PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 48 saat sonra, özellikle (200, 100 ve 50 µM) M1, M2 ve M4'ün anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. M2 maddesinin prostat kanser hücreleri üzerinde en etkin olduğu 200 µM konsantrasyonda aynı maddenin sağlıklı prostat hücreleri üzerindeki etkisi pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında daha azdır. Ayrıca prostat kanseri hücreleri üzerinde 50 µM konsantrasyonda oldukça etkili olan M1 maddesinin aynı konsantrasyonda sağlıklı prostat hücreleri üzerinde toksik etkisi görülmemektedir. Şekil 39 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda sadece (200 ve 100 µM) M5, M7 ve M8'in anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise toksik

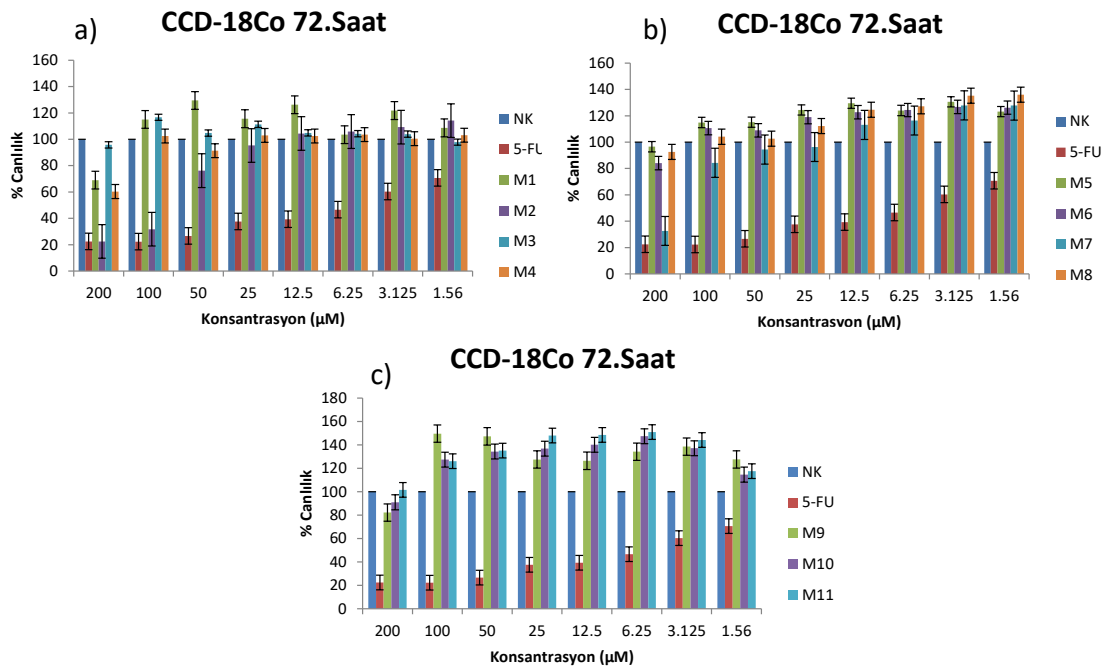
etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında, pozitif kontrol (5Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Prostat kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M6 maddesinin prostat kanser hücre hattı ile etkileşiminden 48 saat sonra özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 100 μ M) anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Konsantrasyon azaldıkça M6 maddesinin anti-proliferatif etkisi azalmasına rağmen devam etmiştir. Sağlıklı prostat hücreleri ile yapılan çalışmada 72. Saatin sonunda M6 maddesinin yalnızca 200 μ M konsantrasyonda anti-proliferatif olduğu ancak pozitif kontrol (5-Fu)'dan daha az toksik olduğu görülmüş ve diğer konsantrasyonlarda M6 maddesinin toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 39 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) RWPE-1 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, 200 μ M konsantrasyonda maddelerin hücreler üzerinde anti-proliferatif etkisi belirlenmiştir. Prostat kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmada, bileşiklerle PC3 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle M11 maddesinin yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) çok etkin olduğu görülmüştür. M11 maddesi 200 μ M konsantrasyonda sağlıklı prostat hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisinin daha düşük olduğu ve 100 μ M konsantrasyonda sağlıklı prostat hücrelerine toksik etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 40. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), MCF-12A üzerinde 72. saatteki etkileri

Şekil 40 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) bütün bileşiklerin hücre üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada M1, M2 ve M4 maddelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminden 72 saat sonra, 200 µM konsantrasyonda meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir. Aynı maddelerin (M1, M2 ve M4) sağlıklı meme hücreleri üzerinde pozitif kontrol ile kıyaslandığında toksik etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 40 (b)' görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7, M8) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 µM) M5 ve M7 maddelerinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında bu maddelerin (M5 ve M7) toksik etkisi daha azdır. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir. Meme kanseri hücreleri ile

yapılan çalışmada M6 ve M8 maddelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminden 72 saat sonra, yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 100 μM) meme kanseri hücrelerine anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir. Sağlıklı meme hücreleri ile yapılan çalışmada kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olan yüksek dozların sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisinin bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca meme kanseri hücre hattı üzerinde etkili olan M7 maddesinin yalnızca 200 μM konsantrasyonda sağlıklı hücreler üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu görülmektedir ve aynı konsantrasyonda ki pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında M7 maddesinin toksik etkisinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. M7 bileşiğinin meme kanseri hücreleri üzerinde etkili olduğu diğer konsantrasyonlarda (100 ve 50 μM), sağlıklı meme hücrelerine toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 40 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10 ve M11) MCF-12A hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle en yüksek dozda (200 μM) M10 maddesinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Ancak kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında yüksek konsantrasyonda maddelerin toksik etkisi çok daha az olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol (5-Fu) düşük konsantrasyonlarda da toksik etki gösterirken, bileşiklerin toksik etkisi düşük konsantrasyonlarda görülmemektedir.



Şekil 41. Polifenolik bileşiklerin (nk: negatif kontrol, pk: pozitif kontrol-5Fu, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11), CCD-18Co üzerinde 72. saatteki etkileri

Şekil 41 (a)'da görüldüğü üzere, bileşiklerle (M1, M2, M3, M4) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozlarda (200 ve 100 μ M) M2 bileşiğinin anti-proliferatif etki gösterdiği görülmektedir. Bir önceki dönemde kolon kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin özellikle 200 μ M konsantrasyonda oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Kanser hücre hattı üzerine etkili olan M1, M3 ve M4 bileşiklerinin pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandıklarında sağlıklı hücre için toksik olmadığı görülmektedir. Ayrıca konsantrasyon azaldıkça maddelerin toksik etkisinin azaldığı ancak pozitif kontrol (5-Fu) 'un toksik etkisini devam ettirdiği görülmektedir. Şekil 41 (b)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M5, M6, M7 ve M8) HT29 hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, özellikle yüksek dozda (200 μ M) M7 maddesinin anti-proliferatif etki gösterdiği olduğu görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça ise anti-proliferatif etkinliğin azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca M7 maddesinin pozitif kontrol (5-Fu) ile kıyaslandığında daha az toksik olduğu görülmektedir. Kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada, M7 maddesinin kolon kanser hücre hattı ile etkileşiminden 48 saat sonra özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 100 μ M) anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür. Ancak rutin kemoterapi ilacı olarak kullanılan pozitif kontrol (5-Fu)' ya kıyasla toksik etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Kanser hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada ayrıca, M5, M6 ve M8 bileşiklerinin özellikle 200 μ M konsantrasyonda kolon kanseri hücre hattı üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Şekil 41'de görüldüğü üzere bu maddelerin aynı konsantrasyonda (200 μ M) maddeler üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 41 (c)'de görüldüğü üzere, bileşiklerle (M9, M10, M11) CCD-18Co hücreleri etkileşmeye başladıktan 72 saat sonra, maddelerin sağlıklı kolon hücreleri üzerinde toksik etkisi görülmemektedir.

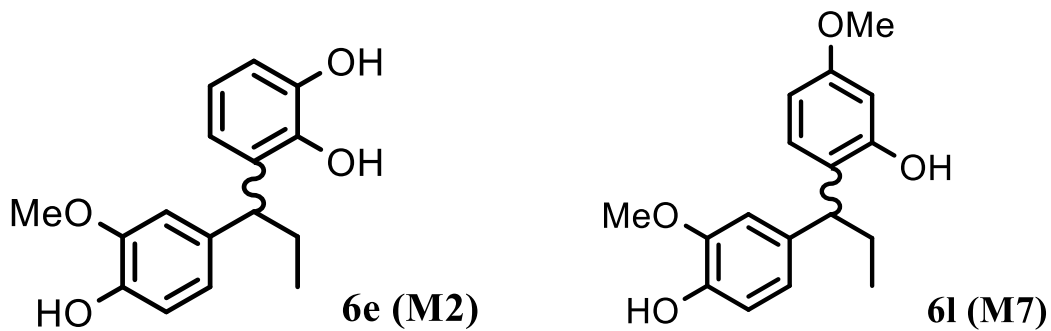
4.4 Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time–PCR, RT-qPCR) Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında, MCF-7 meme kanseri, PC3 prostat kanseri ve HT29 kolon kanseri hücre hatları üzerine, en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla sekiz farklı konsantrasyonda (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,13 μ M, 1,56 μ M) kiral polifenolik bileşikler uygulanmıştır. Ardından yapılan MTT yöntemiyle minimum inhibisyon konsantrasyonu olan IC₅₀ değeri belirlenmiştir (çizelge 10). Yapılan

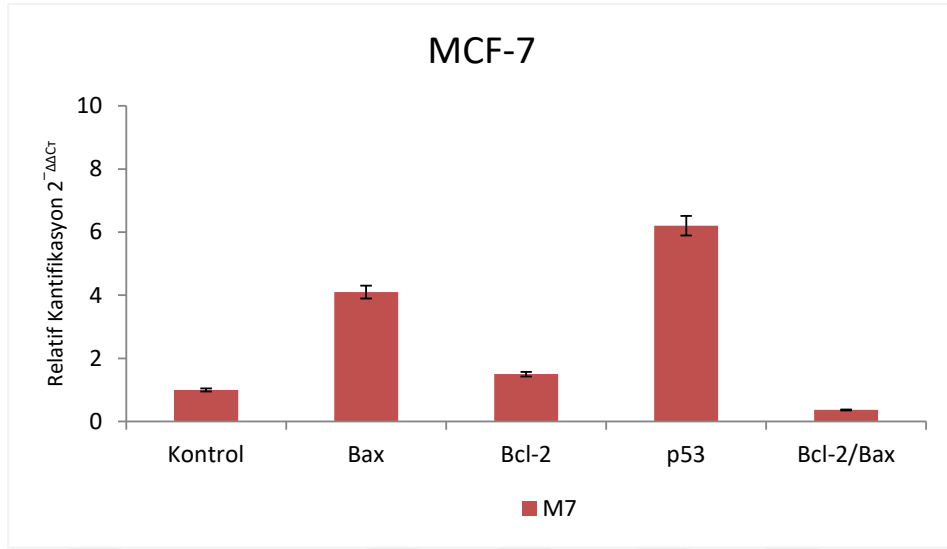
analiz sonuçlarına bakılarak gen ekspresyon çalışmalarında, hücreler üzerinde en belirgin anti-proliferatif etki gösteren M2 ve M7 maddelerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Hücre hatları belirlen doz ve sürede madde ile muamele edilmiş ve daha sonra kültürden alınan hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'larla apoptozda görev alan genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyon oranları RT-qPCR (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirlenmiştir. Bu çalışmalarda housekeeping gen bölgesi olan ve tüm hücreler için vazgeçilmez bir hücre içi protein olduğundan GAPDH kullanılmıştır. GAPDH gen ekspresyon seviyesi değerini elde ettikten sonra, çalışmada kullanılan diğer genlerin ekspresyon değerleriyle oranlayarak hedef genin ekspresyon değeri hesaplanmıştır. (Şekil 42-51)

Çizelge 10. MTT yöntemi sonucunda M2 ve M7 maddelerini belirlenen IC₅₀ değerleri ve süresi

Hücre Adı	IC ₅₀ Değeri	Süre
MCF-7	M2: 82,73 µM	48 saat
	M7: 38,66 µM	
HT29	M2: 163,1 µM	48 saat
	M7: 113,6 µM	
PC3	M2: 60,14 µM	48 saat
	M7: 15.51 µM	

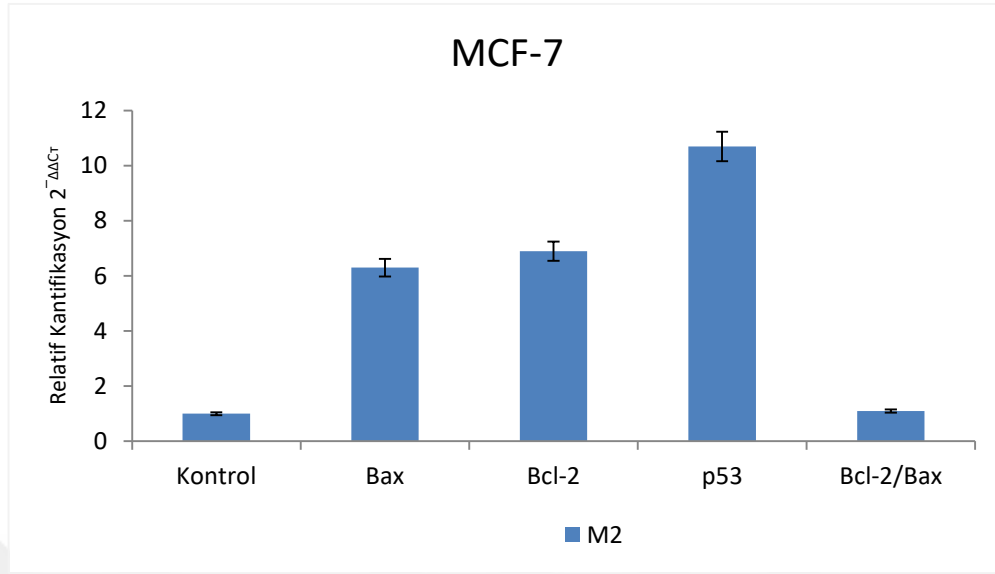


Şekil 42. M2(3-(1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propil)benzen-1,2-diol) ve M7(4-(1-(2-hidroksi-4-metoksifenil)propil)-2-metoksifenol) bileşiklerinin kimyasal yapıları



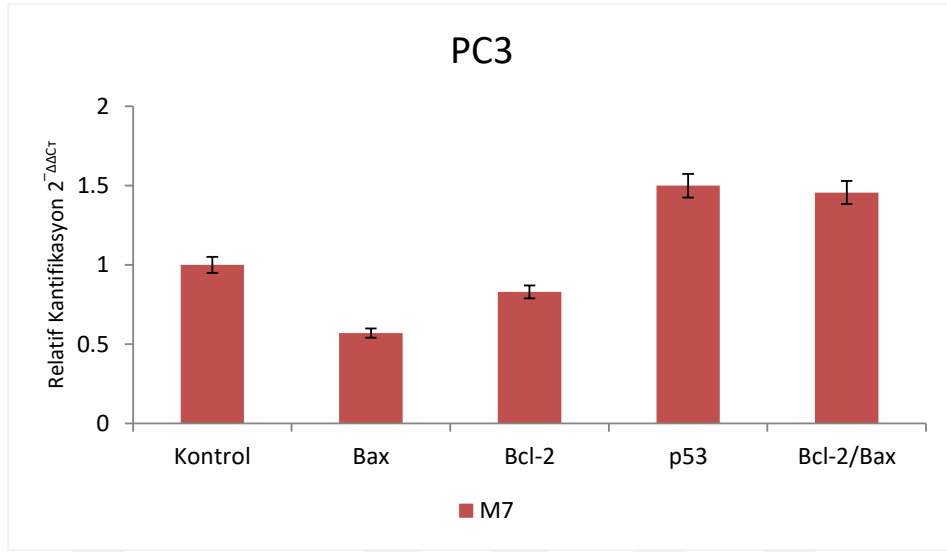
Şekil 43. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücre hattındaki apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 43’de, M7 maddesinin MCF-7 hücrelerindeki apoptoz genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. Madde konsantrasyonu IC_{50} (38,66 μM) olarak uygulanmıştır. Gerçek zamanlı amplifikasyonlar sonucunda oluşturulan bu grafikte M7 maddesinin p53 gen bölgesinin ekspresyonunu 6 kat artırmış olduğu gözlemlenmiştir. DNA hasarına yanıt olarak artan p53 geni, Bax genini aktive ederek Bcl-2 geninin baskılanmasını sağlamaktadır. Bu sayede hücrede Bcl-2/Bax oranını değiştirerek apoptotik sürecin başlamasında görev almaktadır (Hassan ve ark., 2014). Şekilde görüldüğü üzere Bax geninin ekspresyon seviyesi kontrol genine göre 4 kat artmaktadır ve Bcl-2/Bax oranı apoptotik mekanizma lehine değişmiştir.



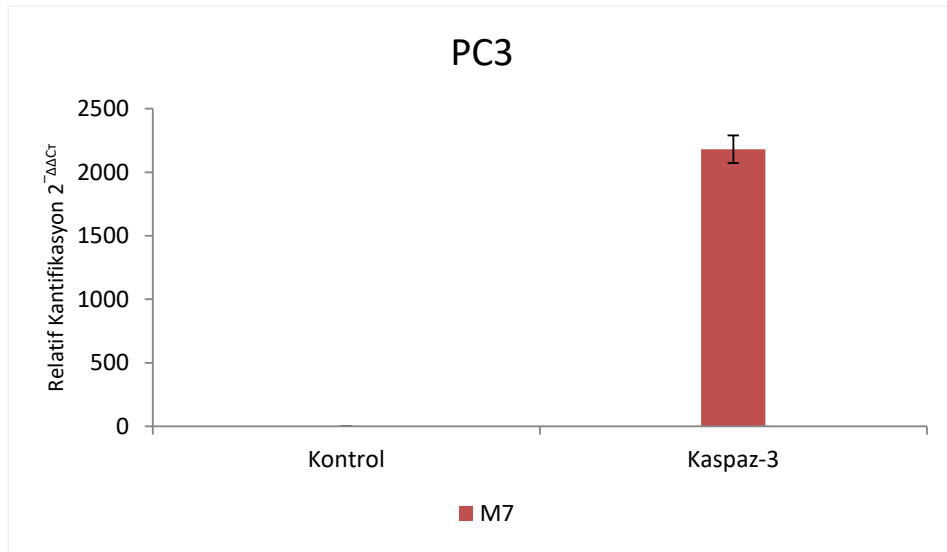
Şekil 44. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen MCF-7 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 44’de, M2 maddesi ile 48 saatlik inkübasyonundan sonra MCF-7 hücrelerinde p53 seviyesinin yaklaşık on kat arttığı görülmektedir. Ayrıca bax geninin ekspresyon seviyesinin de kontrol grubuyla kıyaslandığında arttığı görülmektedir. Ancak buna karşın Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesi de artış göstermektedir. Değişen Bcl-2/Bax oranının anlamlı olmadığı görülmektedir. Ayrıca bu durum bize hücre canlılığını 48 saat sonunda %50 seviyesinde baskılayan bu M2 maddesinin farklı yollar üzerinden etki edebileceği ihtimalini düşündürmektedir.



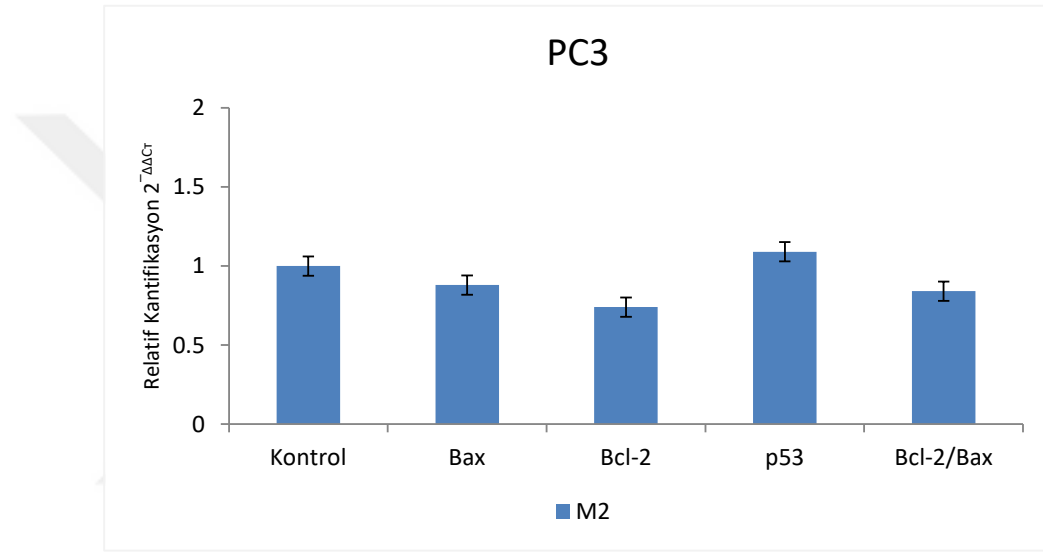
Şekil 45. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 45’de, M7 maddesi ile 48 saat boyunca hücre canlılığını %50 seviyesinde baskılayan doz (15,51 μ M) ile muamele edilen PC3 prostat kanseri hücrelerindeki apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri görülmektedir. MTT analiz yöntemleri sonucunda oldukça düşük dozlarda etkili olan M7 maddesinin apoptozun düzenlenmesinde en önemli genler olarak bilinen p53, Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.



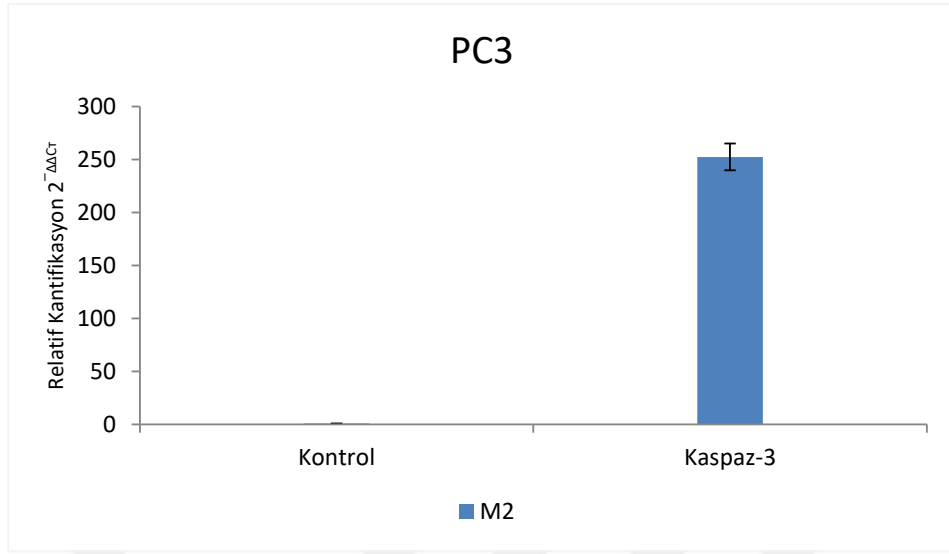
Şekil 46. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi

Şekil 46’da görüldüğü üzere, PC3 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan M7 maddesinin apoptoz mekanizmasında son basamak olarak değerlendirilen (Pfeffer ve Singh 2018) ve sistein proteazlar olarak adlandırılan Kaspaz-3’ün ekspresyon seviyesini iki bin katın üzerinde artırdığı belirlenmiştir. Bu sonuç bize PC3 hücrelerine 15.51 μM IC_{50} değerinde uygulanan M7 maddesinin apoptozda görev alan ve kaspaz-3 aktivasyonu ile sonuçlanan farklı bir mekanizmayı aktifleştirerek hücre ölümüne sebep olduğunu göstermektedir.



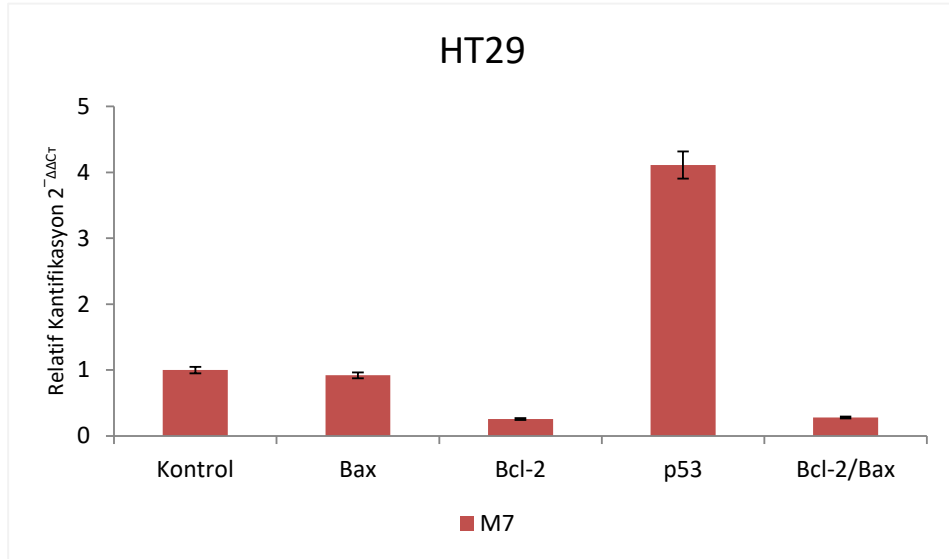
Şekil 47. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 47’de görüldüğü üzere, M2 maddesi ile 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından apoptozda görev alan p53, Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Maddenin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi yapılan MTT testlerinde araştırılmıştır ve hücre canlılığının %50 oranında baskılandığı 60,14 μM konsantrasyonda madde uygulanmıştır. Ancak polifenolik bileşik olan M2 maddesinin hücre ölümünü yukarıda bahsedilen genler üzerinden regüle etmediği gözlenmiştir.



Şekil 48. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen PC3 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi

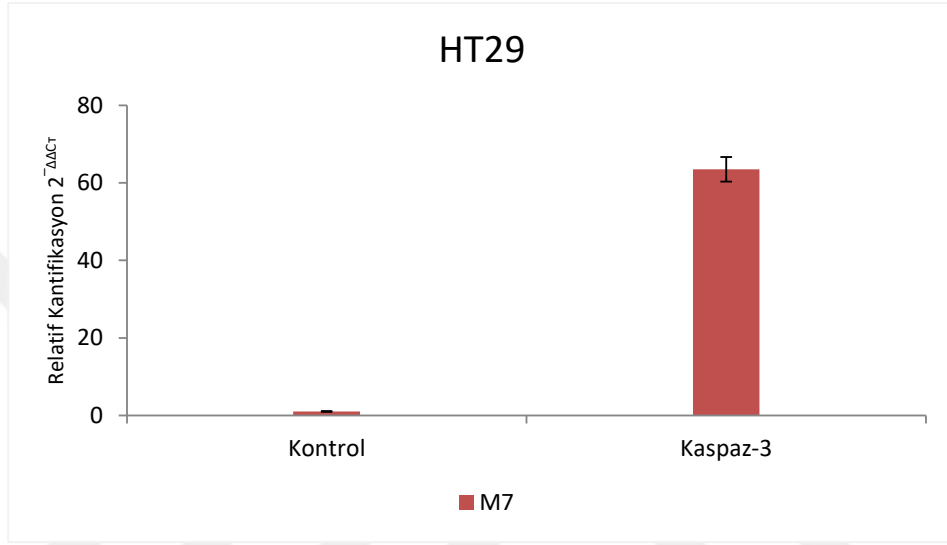
Şekil 48’de, M2 maddesinin hücrelerin apoptoz mekanizmasında son basamak olarak bilinen Kaspaz-3 ekspresyonunu 250 kat artırmış olduğu görülmektedir. Bu sonuç bize M7 maddesinde olduğu gibi M2 maddesinin de apoptozu farklı yollar üzerinden indüklediğini düşündürmektedir.



Şekil 49. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

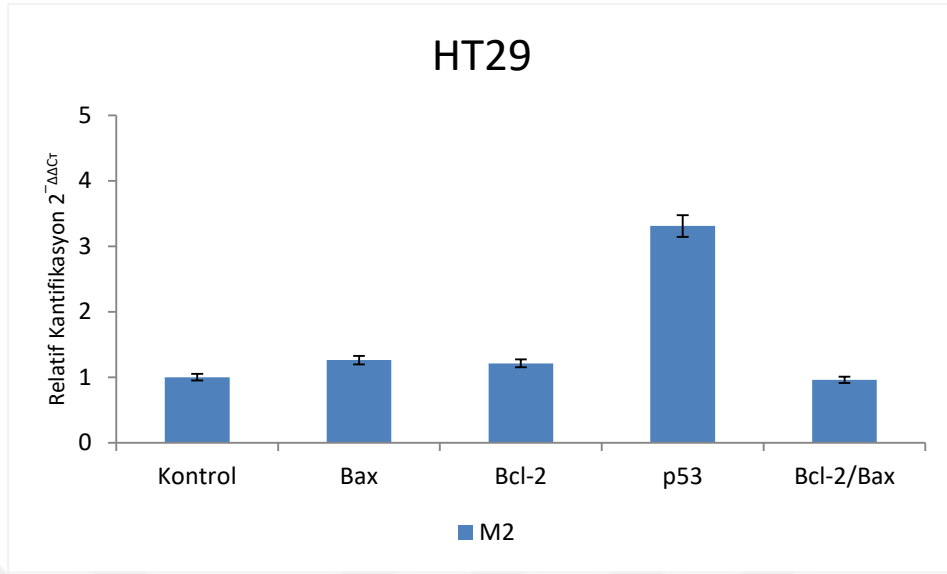
Şekil 49’da görüldüğü üzere, M7 maddeleri ile IC₅₀ (113,6 µM) konsantrasyonunda, 48 saat inkübasyona bırakılan HT29 kolon kanseri hücrelerinde bulunan apoptoz genlerinin

ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış veya azalış olmadığı belirlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında p53 geninin ekspresyon seviyesinin 4 kat arttığı görülmektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptozun en önemli inhibitörü olan Bcl-2 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu görülmektedir. Ancak bu azalmanın apoptozun indüklenmesi için anlamlı seviyede olmadığı belirlenmiştir.



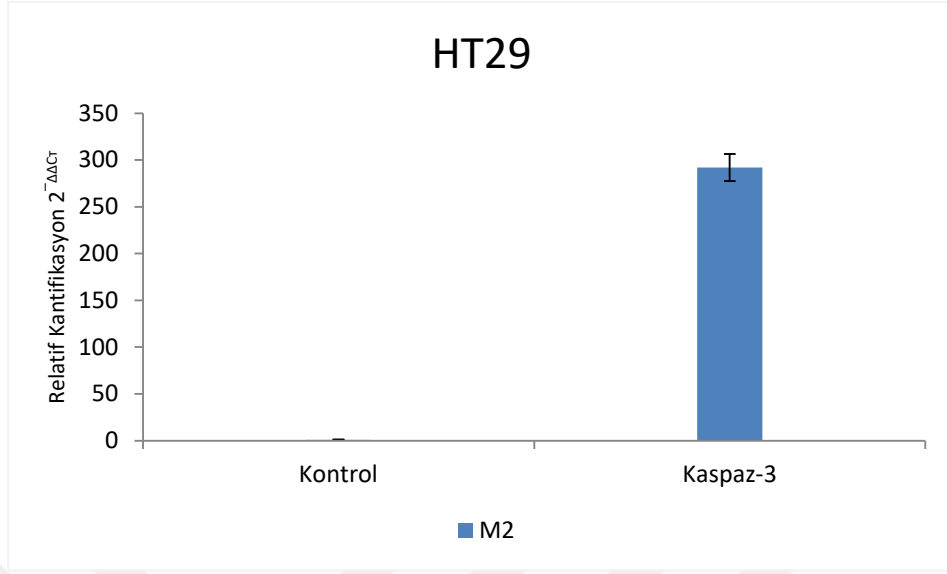
Şekil 50. M7 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi

Şekil 50’de, M7 maddesi ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında HT29 kolon kanseri hücrelerindeki Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi görülmektedir. IC₅₀ (113,6 µM) konsantrasyonunda uygulanan madde miktarının kolon kanseri hücrelerinde Kaspaz-3 seviyesini 60 kat artırmış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 51. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında apoptoz genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 51’de görüldüğü üzere, M2 maddesi ile belirlenen IC_{50} (163,1 μ M) konsantrasyonda 48 saat boyunca muamele edilen HT29 kolon kanseri hücrelerindeki apoptoz genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı belirlenmiştir. DNA’da meydana gelen hasar sonucunda indüklenen p53 geninin apoptoz mekanizmasını indüklediği bilinmektedir (Fridman ve Lowe 2003). Polifenolik bileşik olan M2 maddesinin p53 geninin ekspresyon seviyesini negatif kontrol ile kıyaslandığında 3 kat artırmış olduğu görülmektedir. Ancak bu artışın anlamlı olmadığı ve M2 maddesinin apoptozu farklı bir yolak üzerinden indükleyebileceği düşünülmüştür.



Şekil 52. M2 maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında Kaspaz-3 geninin ekspresyon seviyesi

Şekil 52’de görüldüğü üzere, M2 maddesinin 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından Kaspaz-3 ekspresyonunu yaklaşık 300 kat arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuç bize M2 maddesinin HT29 kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin apoptozu indükleyerek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Şekil 51’deki grafik göz önünde bulundurulduğunda M2 maddesinin apoptozu farklı bir iç yolak veya hücre dışı sinyallerin görev aldığı dış yolak üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal hücrelerle kıyaslandığında oldukça hızlı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalan kanserli hücrelerin çoğalmasını inhibe etmek, kanseri tedavi etmenin önemli bir yolu olarak görülmektedir. Bu nedenle hücrelerin doğal ölüm mekanizması olan apoptozu hedeflemenin oldukça etkili bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Ancak bunu yaparken normal hücrelerin kemoterapötik ilaçlardan etkilenmemesi için spesifik hedeflerin doğru belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan araştırmalar, bu yönde yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Apoptotik yollardan birini hedefleyebilen ve sağlıklı hücrelere toksik olmayan antikanser bileşiklerin bulunmasının, evrensel bir kanser tedavisi yaklaşımı sağlayacağı düşünülmektedir (Pfeffer ve Singh, 2018).

Yapılan bu tez çalışmasında, meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC3) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları ve bu hücrelerle aynı dokuda bulunan sağlıklı meme (MCF12A), prostat (RWPE-1) ve kolon (CCD-18Co) hücreleri kültüre edilmiştir. Anti-proliferatif ve anti-kanser aktivitesi yapılan birçok çalışmada belirtilen polifenolik bileşiklerin, TUBİTAK 1001 projesi kapsamında sentezlenmiş olan türevlerinin doz ve zamana bağımlı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca anti-proliferatif etki gösteren polifenolik bileşiklerin *in vitro* ortamda kanser hücrelerine uygulanması sonucunda hücrelerde apoptoz mekanizmasında rol oynayan bazı genlerin ekspresyonunu değiştirerek apoptotik aktiviteyi artırdıkları belirlenmiştir.

Fenoller ve polifenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksi grubu taşıyan aromatik bir halkaya sahip, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen moleküllerdir. Polifenolik bileşikler ve fenoller antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiallerjik, antitümorejenik, kardiyoprotektif, antimutajenik ve enzimatik aktivitelerin modülasyonu gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olmalarından dolayı da son iki yüzyıldır oldukça ilgi çeken bir konu haline gelmiştir. Ayrıca polifenoller, antikanser ilaçların keşfi için potansiyel aday moleküller olarak gösterilmektedir (Manach ve ark., 2004). Fenolik fonksiyonel grubu taşıyan bileşikler günlük yaşamda pek çok uygulama alanına sahiptir. Örneğin, fenol türevi bileşikler biyolojik aerobik organizmalar ve ticari ürünleri içeren çok sayıda organik maddenin oksidatif yıkımını engelleyen antioksidanların önemli bir

sınıfını oluşturmaktadır. Canlılığın devamı için oksijene ihtiyaç duyan aerobik organizmalarda, metabolizmanın rutin işleyişi için oksijen kullanılmaktadır. Ancak oksijenli solunum yapan bu organizmalarda oksijen kullanımından sonra hücre ve dokular için oldukça zararlı olduğu bilinen serbest radikaller (ROS) açığa çıkmaktadır. Serbest radikallerin yüksek derecede reaktif olmaları yapılarında bulunan eşleşmemiş elektron varlığından kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller, elektron vererek ya da alarak canlı hücrelerdeki lipid, aminoasit, nükleotid ve DNA gibi birçok molekülle reaksiyona girmekte ve hücreye zarar vermektedirler. Bu durumun birçok hastalığa sebep olduğu gibi yaşlanmaya da sebep olduğu bilinmektedir. Antioksidan maddeler vücudu serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumaktadır. Antioksidanların serbest radikaller ile arasındaki bu denge canlının fizyolojik düzeninin korunması açısından oldukça önemlidir (Aitken ve Roman, 2008). Fenollerin yaygın olarak bilinen antioksidan özelliklerinin yanı sıra serbest radikal giderme, enzim inhibe veya aktivite edebilme, metal şelatlama özelliklerinden dolayı lipid, protein ve nükleik asitlere verilen zararı önleyici özellik gösterme, lökosit immobilizasyonunu azaltma, apoptosisi başlatma, proliferasyonu, anjiyogenezi inhibe etme ve fitoöstrojenik aktivite gibi aktiviteleri de rapor edilmiştir (Galati ve ark., 2000; Yang ve ark., 2001; Kanadaswami ve ark., 2005; Loa, Chow ve Zhang, 2009). Fenollerin aromatik halkalarının fonksiyonelleştirilmesi hem endüstriyel hem de organik kimya açısından büyük öneme sahiptir (Pinkus, 1997).

Çalışmalarda sıklıkla kullanılan polifenolik bileşiklerden biri olan kurkuminin deneysel çalışmalardaki etkinliğinin yüksek olduğu; ancak klinik kullanımına yönelik bazı kısıtlılıklara sahip olduğu net olarak bilinmektedir. Bu kısıtlılıkların başında, söz konusu bileşiğin suda çözünürlüğünün az olması, etkinliğinin ancak yüksek dozlarda gözlenebilmesi ve düşük metabolik stabiliteye sahip olması gelmektedir. Bunun yanı sıra, polifenolik bileşik türevlerini içeren ham ekstraktaki fenolik bileşik oranı bulundukları kaynağa göre ve ayrıca elde edilme yöntemine göre bile değişiklik gösterebilmektedir. Bu sebeple, fenolik bileşiklerin kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılması için daha detaylı araştırmalar gerekmektedir (Anantharaju ve ark., 2016). Dolayısıyla, polifenolik bileşiklerin ve türevlerinin antikanserojenik ilaçlarda yer alabilmesi için belirtilen problemlerin çözümüne yönelik iyileştirmelerin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Xia ve ark., 2012).

Yukarıda belirtilen, bu tezin ana bileşenlerinden birini oluşturan ve TUBİTAK projesi kapsamında sentezi gerçekleştirilen polifenolik bileşiklerde, doğal polifenolik bileşiklerin klinik uygulanmasında görülen bu problemlerin çözümüne dair iyileştirmeler yapılmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda fenolik antioksidan bileşiklerin inhibe etme aktivitesi, orto-süstitüentlerin büyüklüğüne bağlı olarak hidroksil grubunun indiktüf ve hiperkonjugatif etkisinden dolayıdır ve hidroksi grubunun hidrojen atomunu uygun şekilde koruyan orto pozisyonundaki süstitüentlerin çokluğu, fenolik radiallyer kararlılığını artırmakta ve dolayısı ile inhibe etme aktivitesini de artırmaktadır (Barclay ve Vinqvist, 2003) sonucuna ulaşılmıştır. Bu nedenle orto pozisyonda metoksi, etoksi, izopropil ve tert-butil süstitüentli fenol türevleri oldukça yüksek performanslı antioksidanlardır. Yapılan çalışmalarda daha fazla sayıda hidroksilik gruba sahip bileşiklerin antikanser aktivitesinin daha iyi olduğu bildirilmektedir. Örneğin, yapısında üç hidroksilik grubu bulunan fenolik bileşik türevi gallik asit, dihidroksi ve monohidroksi benzoik aside göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2015). Bu bilgiler ışığında TUBİTAK 1001 projesi kapsamında fenol türevi olarak orto-pozisyonda metoksi, etoksi, propoksi, izopropil ve tert-butil grubu içeren bileşikler seçilmiştir. Böylece antioksidan aktiviteyi artırıcı yönde aktivitesi olan bu türevlerin kanser ve kanser kök hücreleri üzerindeki etkisini de artıracığı düşünülmüştür.

Son yıllarda, fitokimyasallar üzerine gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde, fenolik yapıdaki çeşitli moleküllerin kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkilerinin olduğu görülmektedir (Vadde ve ark., 2015; Absalan ve ark., 2016; Nejad ve ark., 2017). Fenolik bileşiklerin türevleri ile yapılan çeşitli çalışmalar, bu bileşiklerin prostat, meme ve kolon kanseri hücreleri üzerinde antikanser aktivite sergilediğini ortaya koymaktadır (Mbese, Khwaza, ve Aderibigbe, 2019). Bu literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak sentezi gerçekleştirilmiş olan polifenolik bileşiklerin, meme, prostat ve kolon kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, sentezi gerçekleştirilmiş olan polifenolik bileşiklerin 4, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde insan meme kanser MCF-7, prostat kanser PC3 ve kolon kanseri HT29 hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkileri incelenmiştir. Ayrıca

çalışmamızda bu üç kanser hücresinin yanı sıra bu bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki olası toksik etkilerinin araştırılabilmesi amacıyla insan sağlıklı meme hücresi MCF12A, prostat hücresi RWPE-1 ve kolon hücresi CCD-18Co hücre hatları kullanılmıştır. Polifenolik bileşiklerin, 4-72 saat aralığında inkübasyon sonrasında zamana ve doza bağlı olarak kanser hücrelerinde proliferasyonu baskılandığı görülmüştür. Bu sürelerin sonunda MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu), ile canlılık testi uygulandı. MTT'nin mitokondriyal suksinat dehidrogenaz enzimi ile indirgenerek MTT-formazan kristallerine dönüşmesi temeline dayanan MTT testi, aslen mitokondriyal aktiviteyi ölçmesine rağmen dolaylı yoldan hücre canlılığının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir (Erden Tayhan, 2019).

Yapılan MTT analiz sonuçlarına göre bileşikler negatif kontrol ile kıyaslandığında hücre proliferasyonunda etkili olan doz ve süre tespit edilmiştir. Daha sonra Graphpad Prism 6 programı kullanılarak bileşiklerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmıştır. Yapılan bu tez çalışmasında, en etkili olduğunu görülen polifenolik bileşiklerden M2 ve M7 olarak kodlanan bileşiklerin her hücre hattında farklı konsantrasyonda hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir. (Çizelge 10). Minimum inhibisyon konsantrasyonlarında (IC_{50}) görülen farklılığın, vücut hücrelerindeki farklılıktan dolayı kanser tiplerinin metabolik, genetik ve moleküler düzeydeki farklılıklarından olabileceği düşünülmektedir. Bileşiklerin MCF-7, PC3 ve HT29 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini engellediği gözlemlenmiştir. Her hücre hattı için bulundukları dokudaki sağlıklı hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak kiral polifenolik bileşiklerin belirli doz ve sürelerde oldukça etkili oldukları görülmüştür. Bunun yanı sıra, aynı bileşiklerin meme, kolon ve prostat dokularına ait sağlıklı hücre hatları üzerindeki toksik etkisinin ihmal edilebilir bir seviyede olduğu belirlenmiştir. Antikanser aktivite gösterdiği düşünülen polifenolik bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisini araştırmaya yönelik yapılan bazı çalışmalarda sağlıklı hücre olarak HUVEC hücre hattının kullanıldığı görülmüştür (Zhao ve Hu, 2013). Çalışmamız, kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki gösteren bileşiklerin, meme, kolon ve prostat dokularına ait sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkilerinin test edilmiş olması bakımından literatür örneklerine üstünlük sağlamaktadır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz kanser hücrelerinin (MCF-7, PC3 ve HT29), mevcut tedavilerinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaç 5-Fluorourasil

(5-Fu) pozitif kontrol olarak tercih edilmiştir. DNA ve RNA yapısına ve nükleik asit metabolizmasına katılabilme özelliğine sahip olan 5-Fu tek başına ya da diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine bir şekilde kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2016). Kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisi belirlenen bileşiklerimiz M2 ve M7'nin pozitif kontrol ajanı (5-Fu) ile kıyaslandığında oldukça düşük seviyelerde toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla ilgili bileşiklerin, sağlıklı hücreler üzerinde yan etkisinin olmadığı ancak kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmede oldukça başarılı olduğu net bir şekilde ortaya konulmuştur. Bu durum, kanser tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanların yaygın sitotoksik yan etkilerinin (Hassan ve ark., 2014), bu bileşikler için geçerli olmadığını göstermiştir. Kemoterapinin kanseri tedavi etmesindeki etkinliğine rağmen, kullanılan ilaçların ciddi yan etkileri ve sitotoksititelerinin dezavantajlarından dolayı ideal sonuçlara ulaşabilmek adına yeni, güvenilir ve daha etkili ilaç keşfine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Davatgaran-Taghipour ve ark., 2017). Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, çalışmamız kapsamında kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri belirlenen polifenolik bileşiklerin kemoterapötik ilaç ham maddesi olmaya aday moleküller oldukları açık bir şekilde ortaya konulmuştur.

Polifenolik bileşik türevleri kullanılarak prostat kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada bileşiğin etkisinin hücre tiplerine göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca fenolik bileşiğin PC3 hücre hattı ile etkileşimden 48 saat sonra IC_{50} değeri 300 μM hesaplanmıştır ve kullanılan bileşiğin hücre döngüsünü durdurarak antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Eroğlu ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında, kiral polifenolik bileşikler uygulandıktan sonra 4, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman dilimlerinde MTT analizi ile hücre canlılığı hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda belirtilen yayın ile paralel olarak 48 saatlik inkübasyon süresinde maddelerin en etkin olduğu doz belirlenmiştir. PC3 hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etkisinin en iyi olduğu belirlenen bileşiklerden M2 maddesinin IC_{50} değeri 60.14 μM ve M7 maddesinin IC_{50} değeri 15.51 μM olarak hesaplanmıştır. Fenolik bileşik türevlerinin PC3 hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesinin incelendiği başka bir çalışmada bileşiğin IC_{50} (100 μM) konsantrasyonunda doza bağlı sitotoksikite sergilediği bildirilmiştir (Kassi ve ark., 2014). Literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda kullanmış

olduğumuz ve ilk defa sentezlenen M2 ve M7 kiral polifenolik bileşiklerin PC3 hücrelerinde oldukça düşük dozlarda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür.

HT29 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise kullanılan polifenolik bileşiğin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği IC_{50} değeri $1000\mu M$ olarak hesaplanmıştır ve bu çalışmada bileşiğin sağlıklı hücre üzerindeki sitotoksik etkisine bakılmamıştır (Zhu ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında ise M2 ve M7 maddelerinin HT29 hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonunun ardından maddelerin hücre canlılığının %50 seviyesinde baskılandığı dozu gösteren IC_{50} değeri M2 maddesinde $163,1\mu M$ ve M7 maddesinde $113,6\mu M$ olarak hesaplanmıştır. Ek olarak yapmış olduğumuz çalışmada aynı dokuda bulunan sağlıklı kolon hücresi CCD-18Co, bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkisinin belirlenmesinde kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçta kullanılan M2 ve M7 maddelerinin aynı dokudaki kanser hücrelerine anti-proliferatif etki gösterirken sağlıklı hücrelere toksik olmadığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde, M2 ve M7 maddelerinin meme kanseri hücresi MCF-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri değerlendirildiğinde, hesaplanan IC_{50} değerlerinin ($50-200\mu M$) literatür ile uyumlu bir tablo çizdiği belirlenmiştir (Duo ve ark., 2012).

Sağlıklı bir organizmada, hücrelerde meydana gelen hasar sonucu apoptoz mekanizması devreye girerek hasarlı hücrelerin ölümünü sağlamaktadır. Ancak kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz mekanizması inhibe edildiğinden dolayı hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir. Bu bilgiler ışığında, kanser tedavisinde apoptozu hedeflemenin oldukça etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmaktadır (Kaufmann ve Earnshaw, 2000). Mevcut antikanser tedavilerinde kullanılan yaklaşımların çoğu apoptozisi indükleyerek kanserli hücrelerin ölümünü sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin çoğu aynı zamanda DNA hasarına neden olmakta ve apoptozu dolaylı olarak da aktive edebilmektedir. Anti kanser tedavilerinde kullanılan bu yöntemler kanserli hücrelerde tedaviye direnç gösterebilecek kanserli hücrelerin sayısını artırarak istenmeyen sonuçların oluşmasına sebep olabilmektedir (Elmore 2007). Bu nedenle, apoptozu direkt veya spesifik olarak aktive eden tedavilerin, mevcut tedavilere göre daha güvenilir ve daha etkili olabileceği tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, kemoterapötik ilaç ham maddesi olmaya aday moleküllerin moleküler mekanizmasının doğru anlaşılması

gerekmektedir. Apoptotik yolların kanserde nasıl deregüle edildiğinin ve bu ilaçlarının apoptotik yolak üzerine olan etkilerinin anlaşılması etkili ve güvenilir tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Apoptoz genel olarak anti-apoptotik ve pro-apoptotik bir dizi gen tarafından düzenlenen mekanizmadır. Anti-apoptotik proteinlerin ifadesini baskılamak ve pro-apoptotik proteinlerin sentezini indüklemek terapötik hedeflemede kullanılan en yaygın stratejilerdir. Apoptotik yol hücre içi ve hücre dışı sinyallerle aktive edilir. Hangi yolun aktive olacağı sinyal tipine göre belirlenir (Hassan ve ark., 2014). İnsanda apoptozun regülasyonu, tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 ile başlayıp kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteazlara kadar devam eden bir süreçtir. Genotoksik olaylar neticesinde DNA'da meydana gelen hasar sonucunda p53 geni aktive edilmektedir. DNA'daki hasarın tamir edilebilmesi için p53, hücre siklusunu G₁ fazında durdurmaktadır. Hasar tamir edilemezse hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. P53'ün hücrelerde apoptozun düzenlenmesinden sorumlu gen ailesi olan Bcl-2 ailesinde bulunan genlerin aktivasyonunda da rol oynadığı düşünülmektedir. P53 ekspresyonunun pro-apoptotik Bax genini indüklediği ve hücrelerin apoptoza gitmesinde en büyük engel olduğu düşünülen anti-apoptotik Bcl-2'yi baskıladığı yapılan literatür çalışmalarında belirtilmiştir (Raisova ve ark., 2001; Fridman ve Lowe, 2003; Adams ve Cory, 2007; Pfeffer ve Singh, 2018).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, polifenollerin tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu ileri sürülmektedir (Sharma ve ark., 2017). MCF-7 meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada, polifenolik bileşik olan Kuersetin'e belirli dozlarda (50-200 µM) maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde apoptozun uyarılmasıyla hücre proliferasyonunda doza ve zamana bağlı bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bileşiğin pro-apoptotik Bax geninin ekspresyonunu artırdığını ve buna anti-apoptotik Bcl-2 geninin baskılanmasının eşlik ettiği belirtilmektedir (Duo ve ark., 2012). Başka bir çalışmada HT29 hücrelerinde, Kaempferol fenolik bileşiğin ekstrinsik (dışsal) yolu ve mitokondriyal yolu aktive ederek apoptozu indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. Ek olarak HCT-15 kolon kanserinde yapılan farklı bir çalışmada, polifenolik bileşik olan Mirisetin, kanserli hücrede Bcl-2/Bax oranına bağlı yolu indükleyerek apoptotik hücre ölümünü

tetiklemektedir (Lee ve ark., 2014; Jo ve ark., 2017). PC3 prostat kanseri hücrelerinde Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Gallik asidin kanserli hücrelerde DNA hasarını tetikleyerek ve DNA onarımından sorumlu genleri inhibe ederek hücre çoğalmasını engellemektedir (Liu ve ark, 2013). Polifenoller, farklı kanser hücrelerinde hücre siklusunun durmasına neden olmaktadır. Polifenollerin kanser hücrelerinde oksidatif stresi artırarak DNA'da hasar oluşturduğu ve Kaspaz-3 bağımlı yolağın aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indüklediği bilinmektedir. Ayrıca fenolik bileşikler, tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılan p53'ün ekspresyonunu yukarı yönde regüle ederek de apoptotik yolların aktive edilmesini sağlamaktadır (Anantharaju ve ark., 2016).

DNA hasarı sonucunda tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 geni aktive olmaktadır. Meydana gelen DNA hasarının tamir edilebilmesi için hücre döngüsünü G₁ evresinde durdurmaktadır. Hasar tamir edilemezse p53 geni hücreyi apoptoza götürecektir. P53 geni Bax genini aktive ederek Bcl-2/Bax oranını değiştirmektedir. Artan Bax proteini mitokondriden sitokrom c ve apoptotik moleküllerin salınımını uyarmaktadır. Sitozolde apoptozom adı verilen kompleksin oluşması Pro-kaspaz-9'u aktive etmektedir. Daha sonra Kaspaz-3 aktive olmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. P53 geninde meydana gelen mutasyonlar birçok kanser çeşidinde apoptozun baskılanması ve kanserli hücrelerin çoğalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Singh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada polifenolik bileşik olan resveratrolün p53 ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir (Singh ve ark., 2018).

Yukarıda sunulan literatür verileri göz önünde bulundurularak, bu tez çalışmasında polifenolik bileşiklerin doza bağlı olarak MCF-7, PC3 ve HT29 hücreleri üzerindeki apoptotik aktivasyonun araştırılması amaçlanmıştır ve sonuç olarak polifenolik bileşiklerin uygulanması ile yukarıda bahsi geçen ve apoptozda görev alan genlerin (p53, Bax ve Bcl-2) gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile ifadenme oranları mRNA seviyesinde tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda, MCF-7, PC3 ve HT29 hücrelerinde mitokondriyal yolun uyarılıp uyarılmadığının anlaşılabilmesine adına, hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonlarında M2 ve M7 maddeleri hücrelere uygulandıktan 48 saat sonra, her bir hücrede apoptozda intrinsik

yolun en önemli düzenleyicisi olarak bilinen p53, Bax ve Bcl-2 genlerinin mRNA seviyesindeki ekspresyon sonuçları (Şekil 42-51) gösterilmiştir. MCF-7 hücrelerinde, M2 maddesinin p53 geninin ekspresyon seviyesini kontrol genine göre 10 kat artırmış olduğu görülmektedir. Bu artışın maddenin kanserli hücre DNA'sında oluşturduğu hasar sonucunda indüklendiği düşünülmüştür. Bu sonuç yukarıda da verilen literatür verileriyle örtüşmektedir. P53 genindeki artışa bağlı olarak Bcl-2/Bax oranında apoptoz lehine anlamlı değişme olmadığı görülmektedir. Sonuçlar bize, kiral polifenolik bileşik M2'nin p53 aracılı farklı yollar üzerinden MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklemiş olabileceğini düşündürmektedir (Fridman ve Lowe, 2003). Polifenolik bileşiklerin PC3 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin düşük dozlarda bile oldukça etkili olduğunu yapmış olduğumuz çalışmada gösterilmiştir. Ancak hücrelerin %50'den fazlasını öldüren doz ile yapılan 48 saatlik inkübasyon sonrasında M2 ve M7 maddelerinin apoptozda görevli p53, Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artışa veya azalışa neden olmadığı görülmüştür. Kolon kanseri HT29 hücreleri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu durum bize apoptozun dışsal yoldan ilerlediğini düşündürmüştür. Dışsal yol, ölüm reseptörüne bir ölüm sinyalinin bağlanmasıyla uyarılmaktadır. Sinyal ve reseptörün bağlanmasıyla oluşan ölüm indükleyici sinyalleşme kompleksi (DISC), başlatıcı kaspaz olan Kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlamaktadır. Daha sonra uygulayıcı (cellat) (Yokuş ve Ülker Çakır, 2012) kaspazlar olarak bilinen Kaspaz-3, -6 ve -7 aktifleşmektedir (Zaman, Wang, ve Gandhi 2014). Mevcut tedavilerde kullanılan kemoterapötik maddelerin p53'ten bağımsız olarak da apoptozu başlattıkları bilinmektedir (Bacus ve ark., 2001). Örneğin, polifenolik bileşik türevi resveratrol, HT29 hücrelerinde IC₅₀ (50-150 µM) konsantrasyonunda kullanılmış ve bileşiğin Kaspaz-8'e ve Kaspaz-3'e bağlı apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Miki ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında da sentezi gerçekleştirilen polifenolik bileşiklerin PC3 ve HT29 hücrelerindeki Kaspaz-3 ekspresyon seviyesine olan etkileri araştırılmıştır. Cellat kaspaz olarak da bilinen Kaspaz-3, uygulayıcı kaspazların en önemlisi olarak kabul edilmektedir. Başlatıcı Kaspaz-8 veya -9 aracılığıyla aktive edilmektedir. İndüklenen kaspaz-3, inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktive ederek ve kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ın aktifleşmesini sağlamaktadır. Daha sonra CAD, DNA'nın parçalanmasını sağlamaktadır (Elmore, 2007).

Prostat kanseri hücresi PC3'ün polifenolik bileşik M7 ile 48 saatlik inkübasyonundan sonra, apoptozda son basamak olan Kaspaz-3 geninin ekspresyonunu 2000 katın üzerinde artırmış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada kiral polifenolik bileşik M2'nin de PC3 hücrelerinde Kaspaz-3 ekspresyon seviyesini 250 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuç bize M7 ve M2 kiral polifenolik bileşiklerin IC₅₀ (sırasıyla 15,51 µM ve 60,14 µM) konsantrasyonlarında apoptozu farklı bir yolak üzerinden indükleyerek, hücre ölümüne sebep olduklarını göstermektedir. Bulgular bölümünde de paylaşıldığı üzere, HT29 hücrelerinin bu bileşiklere maruz bırakılmasından sonra M2 ve M7 maddelerinin bu hücre hattındaki kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinde PC3'dekine benzer sonuçlar gösterdiği görülmektedir. M7 maddesi IC₅₀ (113,6 µM) konsantrasyonunda HT29 hücrelerinde Kaspaz-3 ekspresyonunu 60 kat artırmıştır. HT29 hücrelerinde M7 maddesine göre daha etkili olduğu görülen M2 maddesinin Kaspaz-3 ekspresyonunu yaklaşık 300 kat artırarak kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde kaspazların aktivasyonunu sağlayan yolaklarda meydana gelen mutasyonların, kanserli hücrelerin apoptoza gitmesini engellediği sıklıkla görülmektedir. Kaspaz aktivasyonunun kaybı, kanser hücrelerinin sağ kalımını artırdığından kaspaz inhibisyonun üstesinden gelecek yeni stratejilerin bulunması antikanser tedavilerin geliştirilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir (Jiao ve ark., 2016). Bu çalışmada sunulan sonuçlar, M2 ve M7 maddelerinin, PC3 ve HT29 hücrelerinde Kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesinin düzenlenmesi yoluyla apoptozu indükleyerek antikanser etki sergilediklerini göstermektedir. Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda genel olarak, tümör hücrelerinin dışsal yola olan duyarlılığının içsel yola göre daha fazla olduğu ve kanser tedavilerinde dışsal yolun hedeflenmesi gerektiği belirtilmektedir (Lopez ve Tait, 2015). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışmasında kullanılan M2 ve M7 maddesinin moleküler mekanizmasını daha iyi anlaşılabilmesi için farklı yolaklar üzerindeki etkilerin de araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Kanser tedavisi için ümit verici kemoterapötik ajan olduğu düşünülen bu maddelerinin antikanser aktiviteleri daha ileri araştırmalarla teyit edilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Absalan, Abdorrahim, Seyed Alireza Mesbah-Namin, Taki Tiraihi, ve Taher Taheri. 2016. "The effects of cinnamaldehyde and eugenol on human adipose-derived mesenchymal stem cells viability, growth and differentiation: a cheminformatics and in vitro study." *Avicenna journal of phytomedicine* 6(6): 643–57.
- Adams, J. M., ve S. Cory. 2007. "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy". *Oncogene* 26(9): 1324–37.
- Adams, Jerry M., ve Suzanne Cory. 2001. "Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family". *Trends in Biochemical Sciences* 26(1): 61–66.
- Aitken, R. John, ve Shaun D. Roman. 2008. "Antioxidant systems and oxidative stress in the testes." *Oxidative medicine and cellular longevity* 1(1): 15–24.
- Anantharaju, Preethi G., Prathima C. Gowda, Manjunatha G. Vimalambike, ve Subbarao V. Madhunapantula. 2016. "An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers". *Nutrition Journal* 15(1)..
- Bacus, Sarah S. vd. 2001. "Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53". *Oncogene* 20(2): 147–55.
- Barclay, L. Ross C., ve Melinda R. Vinqvist. 2003. "Phenols as Antioxidants". İçinde *The Chemistry of Phenols*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 839–908.
- Bellamy, Christopher O.C., Roger D.G. Malcomson, David J. Harrison, ve Andrew H. Wyllie. 1995. "Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis". *Seminars in Cancer Biology* 6(1): 3–16.
- Bishayee, Anupam. 2009. "Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials". *Cancer Prevention Research* 2(5): 409–18.
- Butterworth, B. E., J. A. Popp, R. B. Conolly, ve T. L. Goldsworthy. 1992. "Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis." *IARC scientific publications* (116): 279–305.
- Chen, Mingshun vd. 2015. "Antioxidant and in vitro anticancer activities of phenolics isolated from sugar beet molasses". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15(1).
- Corn, Paul G., ve Wafik S. El-Deiry. 2002. "Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis". *BioEssays* 24(1): 83–90.
- Davatgaran-Taghipour, Yasamin vd. 2017. "Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: Experimental evidence and clinical perspective". *International Journal of Nanomedicine* 12: 2689–2702.
- Dayem, Ahmed Abdal vd. 2016. "The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: Molecular mechanisms". *Nutrients* 8(9).
- Duo, Jian, Guo Guang Ying, Guo Wen Wang, ve Li Zhang. 2012. "Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation". *Molecular Medicine Reports*
- Edlich, Frank. 2018. "BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500(1): 26–34.
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.
- Erden Tayhan, Seçil. 2019. "Recombinant Human G-CSF Production as a Protein Based Drug Candidate for Hematology and Oncology". *International Journal of Chemistry*

- and Technology* 3(2): 92–100.
- Eroğlu, Canan, Mucahit Seçme, Gülseren Bağcı, ve Yavuz Dodurga. 2015. “Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines”. *Tumor Biology* 36(12).
- Fridman, Jordan S., ve Scott W. Lowe. 2003. “Control of apoptosis by p53”. *Oncogene* 22(56 REV. ISS. 8): 9030–40.
- Futreal, P. Andrew vd. 2001. “Cancer and genomics”. *Nature* 409(6822): 850–52.
- Galati, G. vd. 2000. “Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics”. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 17(1–4): 311–49.
- Hanahan, Douglas, ve Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of cancer: The next generation”. *Cell* 144(5): 646–74.
- Harris, M. H., ve C. B. Thompson. 2000. “The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability”. *Cell Death and Differentiation* 7(12): 1182–91.
- Hassan, Mohamed, Hidemichi Watari, Ali Abualmaaty, vd. 2014. “Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer”. *BioMed Research International* 2014.
- Hassan, Mohamed, Hidemichi Watari, Ali AbuAlmaaty, vd. 2014. “Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer”. *BioMed Research International* 2014.
- Hengartner, Michael O. 2001. “Apoptosis: Corraling the corpses”. *Cell* 104(3): 325–28.
- Ho, Alan, ve Steven F. Dowdy. 2002. “Regulation of G1 cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes”. *Current Opinion in Genetics and Development* 12(1): 47–52.
- Jiao, Xuanmao vd. 2016. “Breast cancer stem cell isolation”. *Methods in Molecular Biology* 1406: 121–35.
- Jo, Sunhyo vd. 2017. “Myricetin induces apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells via mitochondria dysfunction”. *Anticancer Research* 37(4): 1705–10.
- Johnson, Mary G. vd. 1997. “Antitumor agents—CLXVII. Synthesis and structure-activity correlations of the cytotoxic anthraquinone 1,4-bis-(2,3-epoxypropylamino)-9,10-anthracenedione, and of related compounds”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5(8): 1469–79.
- Kanadaswami, Chithan vd. 2005. “The antitumor activities of flavonoids”. *In Vivo* 19(5): 895–910.
- Kassi, Eva vd. 2014. “A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-κB activity and IL-6 secretion”. *Phytomedicine* 21(11): 1483–89.
- Kaufmann, Scott H., ve William C. Earnshaw. 2000. “Induction of apoptosis by cancer chemotherapy”. *Experimental Cell Research* 256(1): 42–49.
- Lee, Hyun Sook vd. 2014. “Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of kaempferol in HT-29 human colon cancer cells”. *International Journal of Molecular Sciences* 15(2): 2722–37.
- Levine, A. J., W. Hu, ve Z. Feng. 2006. “The P53 pathway: What questions remain to be explored?” *Cell Death and Differentiation* 13(6): 1027–36.
- Liu, Kuo Ching vd. 2013. “Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells”. *Environmental Toxicology* 28(10): 579–87.
- Loa, Jacky, Pierce Chow, ve Kai Zhang. 2009. “Studies of structure-activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells”. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 63(6): 1007–16.

- Lockshin, Richard A., ve Carroll M. Williams. 1965. "Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm". *Journal of Insect Physiology* 11(2).
- Loeb, Lawrence A., Keith R. Loeb, ve Jon P. Anderson. 2003. "Multiple mutations and cancer". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(3): 776–81.
- Lopez, J., ve S. W.G. Tait. 2015. "Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within". *British Journal of Cancer* 112(6): 957–62.
- Manach, Claudine vd. 2004. "Polyphenols: Food sources and bioavailability". *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727–47.
- Mbese, Zintle, Vuyolwethu Khwaza, ve Blessing Atim Aderibigbe. 2019. "Curcumin and Its Derivatives as Potential Therapeutic Agents in Prostate, Colon and Breast Cancers". *Molecules (Basel, Switzerland)*
- Miki, Hisanori vd. 2012. "Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells". *International Journal of Oncology* 40(4): 1020–28.
- Mohammadi Nejad, Solmaz, Hilal Özgüneş, ve Nurşen Başaran. 2017. "Öjenolün farmakolojik ve toksikolojik özellikleri". *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* 14(2): 201–6.
- "National Cancer Institute". <http://ncinagpur.in/detail/understanding-cancer> (22 Ağustos 2020).
- Pediconi, Natalia vd. 2003. "Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage". *Nature Cell Biology* 5(6): 552–58.
- Pfeffer, Claire M., ve Amareshwar T.K. Singh. 2018a. "Apoptosis: A target for anticancer therapy". *International Journal of Molecular Sciences* 19(2).
- Pinkus, A. G. 1997. "Synthetic and Natural Phenols. Studies in Organic Chemistry #52 By J. H. P. Tyman (Brunel University, Uxbridge, U.K.). Elsevier: Amsterdam.
- Pogribny, I. P. 2010. "Epigenetic events in tumorigenesis: Putting the pieces together". *Experimental Oncology* 32(3): 132–36.
- Pors, Klaus vd. 2005. "Development of nonsymmetrical 1,4-disubstituted anthraquinones that are potently active against cisplatin-resistant ovarian cancer cells". *Journal of Medicinal Chemistry* 48(21): 6690–95.
- Raisova, Monika vd. 2001. "The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis". *Journal of Investigative Dermatology* 117(2): 333–40.
- Rao, Xiayu, Xuelin Huang, Zhicheng Zhou, ve Xin Lin. 2013. "An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis." *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics* 3(3): 71–85.
- Rao, Yerra Koteswara, Madamanchi Geethangili, Shih Hua Fang, ve Yew Min Tzeng. 2007. "Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study". *Food and Chemical Toxicology* 45(9): 1536–44.
- Reddivari, Lavanya vd. 2016. "Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis". *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16(1).
- Renahan, Andrew, Catherine Booth, ve Chistopher Potten. 2001. "What is apoptosis, and why is it important?" *BMJ (Clinical research ed.)* 322(7301): 1536–38.
- Sharma, Ashita, Mandeep Kaur, Jatinder Kaur Katnoria, ve Avinash Kaur Nagpal. 2017. "Polyphenols in Food: Cancer Prevention and Apoptosis Induction". *Current Medicinal Chemistry* 25(36): 4740–57.

- Sigerist, H E. 1932. "The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer." *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 8(11): 642–53.
- Sinha, Dona vd. 2012. "Chemopreventive and Chemotherapeutic Potential of Curcumin in Breast Cancer". *Current Drug Targets* 13(14): 1799–1819.
- Spierings, Diana C. vd. 2004. "Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors". *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52(6): 821–31.
- Vadde, Ramakrishna, Sridhar Radhakrishnan, Lavanya Reddivari, ve Jairam K.P. Vanamala. 2015. "Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells via Suppressing c-Myc/Cyclin D1 and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio". *BioMed Research International* 2015.
- Vousden, Karen H., ve Xin Lu. 2002. "Live or let die: The cell's response to p53". *Nature Reviews Cancer* 2(8): 594–604.
- Williams, Gary M. 2001. "Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment". *Toxicology* 166(1–2): 3–10.
- Wong, Rebecca S.Y. 2011. "Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment". *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 30(1): 87.
- Xia, Jun vd. 2012. "Targeting pancreatic cancer stem cells for cancer therapy". *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1826(2): 385–99.
- Yang, C. S., J. M. Landau, M. T. Huang, ve H. L. Newmark. 2001. "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds". *Annual Review of Nutrition* 21: 381–406.
- Yokuş, Beran, ve Dilek Ülker ÇAKIR. 2012. "Kanser Biyokimyası". *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 1(2): 7–18.
- Zaman, Shadia, Rui Wang, ve Varsha Gandhi. 2014. "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies". *Leukemia and Lymphoma* 55(9): 1980–92.
- Zhang, J. T. vd. 2016. "5-Fluorouracil induces apoptosis of colorectal cancer cells". *Genetics and Molecular Research* 15(1).
- Zhao, Bing, ve Mengcai Hu. 2013. "Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells". *Oncology Letters*
- Zhu, Bingyan, Boyang Shang, Yi Li, ve Yongsu Zhen. 2016. "Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice". *Molecular Medicine Reports* 13(5): 4159–66.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Aslı YILDIRIM
Doğum Tarihi ve Yeri 20.12.1994/TOKAT
Yabancı Dil İngilizce
e-mail asli.yildirim60@gmail.com

Eğitim;

Derece	Eğitim Kurumu	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2018
Lise	Atatürk Anadolu Lisesi	2012

Projeler ve Burslar;

Proje Türü	Proje Adı
TÜBİTAK 1001	Kiral Polifenoller: Sentezi, Karakterizasyonu, Kanser ve Kanser Kök Hücrelerine Karşı Etkilerinin Araştırılması