

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**YUMURTALIK KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
HYDROXYTYROSOL'ÜN SİTOTOKSİK, APOPTOTİK,
PI3K/AKT VE ERK 1/2 YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Latife Merve OKTAY

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2015

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**YUMURTALIK KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
HYDROXYTYROSOL'ÜN SİTOTOKSİK, APOPTOTİK,
PI3K/AKT VE ERK 1/2 YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Latife Merve OKTAY

**Danışman
Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2015

TEZ ONAYI

Latife Merve OKTAY tarafından hazırlanan "**Yumurtalık Kanseri Hücre Kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik, Apoptotik, PI3K/Akt ve ERK 1/2 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**"adlı tez çalışması 21/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL Celal Bayar Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU Celal Bayar Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK Şifa Üniversitesi	

Enstitü Müdürü	Prof.Dr. Kenan DOST	
-----------------------	----------------------------	-------

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Programı'nda, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Latife Merve OKTAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yumurtalık Kanseri	2
2.1.1. Yumurtalık Kanseri Alt Tipleri ve Moleküler Biyolojisi	2
2.1.1.1. İleri Derecede Seröz Karsinom (HGSC) Moleküler Biyolojisi	5
2.1.1.2. Endometrioid Karsinom (EC) Moleküler Biyolojisi	7
2.1.2. Yumurtalık Kanserini Araştırmak için Kullandığımız Model Hücre	
Hatları	8
2.1.2.1. OVCAR-3 İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı	8
2.1.2.2. MDAH-2774 İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı	9
2.1.3. Yumurtalık Kanserinde Tedavi Yaklaşımları.....	9
2.2. Apoptozis	10
2.3. Hücre İçi Sinyal İleti Yolakları	11
2.3.1. PI3K/Akt Sinyal İleti Yolağı	11
2.3.1.1 Yumurtalık Kanserinde PI3K/Akt Sinyal İleti Yolağı	13
2.3.2. ERK 1/2 Sinyal İleti Yolağı	13
2.3.2.1 Yumurtalık Kanserinde ERK 1/2 Sinyal İleti Yolağı	15
2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	15
2.5. Hydroxytyrosol [4-(2-Hidroksietil)-1,2-Benzenediol]	16
2.5.1. Kimyasal Yapısı.....	18
2.5.2. Etki Mekanizmaları	18
2.5.2.1. Antikanser Etkisi	18
2.5.2.1.1. Anti-proliferatif ve Pro-apoptotik Etkileri ile Hücre	
Döngüsüne Etkileri	19
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntemler	21

	Sayfa
3.2.1. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Devamlılığı	21
3.2.2. Tripan Mavisi Yöntemi ile Hücrelerin Sayımı	22
3.2.3. Hydroxytyrosol'ün Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	23
3.2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	23
3.2.4.1. XTT Yöntemi	23
3.2.4.2. Tripan Mavisi Yöntemi	24
3.2.5. DNA Fragmentasyon Testi (Cell Death Detection ELISA) ile Apoptozisin Belirlenmesi	26
3.2.6. Apoptosis Antikor Array Yöntemi	28
3.2.7. Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik Etkisinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 Sinyal Yolakları ile Bağlantılı Olup Olmadığının Test Edilmesi	30
3.2.7.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı için Yöntem	30
3.2.7.2. ERK 1/2 Sinyal Yolağı için Yöntem	31
3.2.8. İstatistiksel Analiz	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	33
4.1. Bulgular	33
4.1.1. Hydroxytyrosol'ün OVCAR-3 ve MDAH-2774 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ile İlgili Bulgular	33
4.1.2. DNA Fragmentasyon Testi Bulguları	37
4.1.3. Apoptosis Antikor Array Bulguları	37
4.1.4. Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik Etkisinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 Sinyal Yolakları ile Bağlantılı Olup Olmadığına İlişkin Bulgular	40
4.1.4.1. PI3/Akt Sinyal Yolağı ile İlgili Bulgular	40
4.1.4.2. ERK 1/2 Sinyal Yolağı ile İlgili Bulgular	41
4.2 Tartışma	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AİP	Apoptosiz İnhibitör Proteinleri
ARID1A	AT'ce Zengin Etkileşim Domaini İçeren Protein 1A
AXIN1	Axis İnhibitör 1
Bad	Bcl-2 İlişkili Hücre Ölüm Agonisti
Bak	Bcl-2 İlişkili Antagonist Öldürücü
Bax	Bcl-2 İlişkili X Protein
Bcl-2	B-hücreli Lenfoma 2
BRAF	v-Raf Mürin Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu-B1
BRCA1	Meme Kanseri Geni 1
BRCA2	Meme Kanseri Geni 2
CCC	Berrak Hücreli Karsinoma
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CIAP 1	Bakuloviral IAP Tekrarı İçeren Protein 2
COX-2	Siklooksijenaz-2
CREB	Siklik Adenozin Monofosfat Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
CTNNB1	Beta-Katenin 1 Geni
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Endometrioid Karsinoma
EGF	Epidermal Çoğalma Faktörü
ER	Östrojen Reseptör
ERK1/2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz 1/2
FAS	Yağ Asidi Sentaz
FoxM1	Forkhead Kutu M1
FOXO-1	Forkhead Transkripsiyon Faktörü 1
GPCR	G-Protein Bağlı Reseptörler
HGSC	İleri Derecede Seröz Karsinoma
HT	Hydroxytyrosol
IGFR	İnsülün Benzeri Çoğalma Faktörü Reseptörü
Jak-STAT 3	Janus Protein Kinaz/ Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktive Edici Protein 3
KRAS	Kirsten Rat Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu
LGSC	Düşük Derecede Seröz Karsinoma

LOH	Heterozigosite Kaybı
LPA	Lizofosfotidik Asit
MAPK	Mitojenle-Aktive Protein Kinaz
MC	Müsinöz Karsinoma
MSI	Mikrosatellit İnstabilite
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa Beta
p21^{WAF1/Cip1}	Siklin Bağımlı Kinaz 1A
p27^{Kip1}	Siklin Bağımlı Kinaz 1B
P53 (TP53)	Tümör Protein 53
PAK1	P21 Proteiniyle Aktive Olan Kinaz
PI3K	Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz
PIK3CA	Fosfotidil İnozitol 3 Kinaz Katalitik Alfa
PIP₂	Fosfotisil İnozitol 4,5-Bifosfat
PIP₃	Fosfotidilinositol 3,4,5-Trifosfat
Pin1	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans İzomeraz
PKC	Protein Kinaz C
PP2A	Serin/Treonin Protein Fosfatazı
PPP2R1A	Protein Fosfataz 2'nin Yapısal ve Düzenleyici Alfa Altünitesi
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RB	Retinoblastoma
Rho	Rodopsin
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
SCNA	Somatik Kopya Sayı Değişiklikleri
SGK	Serum/Glukokortikoidle Düzenlenen Kinaz
TNFRSF6	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör Süperailisi Üyesi 6
VGEF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XIAP	X Bağlantılı Apoptozis İnhibitör Proteini
IC₅₀	%50'yi Öldüren Konsantrasyon
μM	Mikro Molar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. PI3K/Akt Yolağında Sinyal İletimi	13
Şekil 2.2. ERK 1/2 Yolağında Sinyal İletimi	14
Şekil 2.3. Oleuropein'den Hydroxytyrosol Oluşumu Mekanizması	17
Şekil 2.4. Hydroxytyrosol'ün Kimyasal Yapısı	18
Şekil 4.1. MDAH-2774 Hücre Kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün Farklı Dozlarının 24., 48., 72. Ve 96. Saatlerdeki Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	35
Şekil 4.2. OVCAR-3 Hücre Kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün Farklı Dozlarının 24., 48., 72. ve 96. Saatlerdeki Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	36
Şekil 4.3. MDAH-2774 Hücrelerinin İlaçsız ve 100 µM HT ile Muamele Edilen 72. Saat 20X Mikroskop Görüntüleri	36
Şekil 4.4. OVCAR-3 Hücrelerinin İlaçsız ve 100 µM HT ile Muamele Edilen 96. Saat 40X Mikroskop Görüntüleri	37
Şekil 4.5. Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 Hücre Kültürlerinde 72. Saatteki, OVCAR-3 Hücre Kültürlerinde 96. Saatteki Apoptotik Etki Yüzdeleri...	38
Şekil 4.6. MDAH-2774 (72.saat) ve OVCAR-3 (96.saat) Hücre Hatlarında Hydroxytyrosol ve PI3K/Akt Yolağı İnhibitörü LY294002 ile İlgili Bulgular	40
Şekil 4.7. MDAH-2774 (72.saat) ve OVCAR-3 (96.saat) Hücre Hatlarında Hydroxytyrosol ve ERK 1/2 Yolağı İnhibitörü FR180204 ile İlgili Bulgular	41

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Yumurtalık Kanserlerinin Histolojik Özellikleri, Öncüleri ve Ayırıcı Moleküler Özellikleri	5
Tablo 2.2. İleri Derecede Seröz Karsinom Moleküler Özellikleri	7
Tablo 2.3. Endometrioid Karsinom Moleküler Özellikleri	8
Tablo 3.1. Apoptozis Antikor Array Kitinin İçerdiği Apoptotik Proteinler	29
Tablo 4.1. MDAH-2774 (72.saat) Hücre Kültürlerinde XTT Testi Sitotoksosite ve Tripan Mavisi Hücre Canlılığı Bulguları	33
Tablo 4.2. OVCAR-3 (96.saat) Hücre Kültürlerinde XTT Testi Sitotoksosite ve Tripan Mavisi Hücre Canlılığı Bulguları	34
Tablo 4.3. Hydroxytyrosol ile Muamele Edilen MDAH-2774 Hücre Kültürlerinde İstatistiksel Olarak Anlamlı Değişim Gösteren Apoptotik Proteinler ve Değişim Oranları	39
Tablo 4.4. Hydroxytyrosol ile Muamele Edilen OVCAR-3 Hücre Kültürlerinde İstatistiksel Olarak Anlamlı Değişim Gösteren Apoptotik Proteinler ve Değişim Oranları	39

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL' a, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili Arş. Gör. Dr. Harika ATMACA' ya, 2013-149 proje numaralı bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli mali desteği sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)' ne ve gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEFAM)' ne ve çalışanlarına, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme yürekten teşekkür ederim.

Latife Merve OKTAY
Manisa, 2015

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yumurtalık Kanseri Hücre Kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik, Apoptotik, PI3K/Akt Ve ERK 1/2 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Latife Merve OKTAY

**Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Berrin TUĞRUL

Hydroxytyrosol'ün çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antitümöral, çoğalmayı inhibe etme ve apoptozisi destekleme etkileri olduğu gösterilmiştir. Birkaç tümör hücre hattında çeşitli mekanizmalar üzerindeki etkisi bakımından da çalışılmıştır. Bu çalışmada hydroxytyrosol'ün insan yumurtalık kanser hücre hatlarındaki (MDAH-2774 ve OVCAR-3) sitotoksik, apoptotik etkileri ile sitotoksik etkisinin fosfatidilinositol 3-kinaz /Akt (PI3K/Akt) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK1/2) sinyal ileti yolakları ile bağlantılı olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatlarında, 24., 48., 72. ve 96. saatlerde hydroxytyrosol'ün artan konsantrasyonlarının (50-400 μ M) hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için XTT testi ve tripan mavisi boyama yöntemi, apoptotik etkiyi belirlemek için DNA fragmentasyon testi ve protein antikor array yöntemi, PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal ileti yolakları üzerinden etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için yolaklarla ilgili spesifik inhibitörleri kullanılarak araştırıldı. Elde edilen bulgular ANOVA ve ardından Dunnett's istatistiksel analizleriyle değerlendirildi.

Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatteki IC₅₀ değeri 102.3 μ M, OVCAR-3 hücre kültürlerinde 96. saatteki IC₅₀ değeri 51.5 μ M olarak hesaplandı.

Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatteki apoptotik etkisi en yüksek 100 μ M konsantrasyonda görülürken, 150 μ M'da azaldığı, 200 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise apoptozisin görülmediği tespit edildi. OVCAR-3 hücre kültürlerinde ise 96. saatte en yüksek apoptotik etkisi 100 μ M konsantrasyonda görülürken, 100 μ M'ın üzerindeki konsantrasyonlarda giderek azalan apoptotik etkisi olduğu belirlendi.

Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 hücre kültürlerinde pro-apoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif kaspaz-3, Htra2/Omi ve SMAC/DIABLO proteinleri ile yine pro-apoptotik ölüm reseptörleri olan TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 ve FAS/TNFRSF6 moleküllerinin seviyesinde artışa, apoptozis inhibitör proteinleri

(AIP) ailesinden Survivin'in miktarında ise azalmaya sebep olduğu; OVCAR-3 hücre kültürlerinde ise anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ve Pro-kaspaz-3 ile AIP ailesinden CIAP-1, CIAP-2, XIAP, Livin ve Survivin'in miktarlarında azalmaya, pro-apoptotik olan sitokrom-c miktarında ise artışa sebep olduğu tespit edildi.

HT'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre kültürlerinde PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden olmadığı, ancak ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden olabileceğı bulundu.

Bu bulgular HT'nin yumurtalık kanseri hücre hatlarında sitotoksik, apoptotik etkilerinin olduğunu ve sitotoksik etkisinin ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden etkisi olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: yumurtalık kanseri, hydroxytyrosol, sitotoksisite, apoptozis, ERK 1/2.

2015, 57 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of the Effects of Hydroxytyrosol on Cytotoxicity, Apoptosis, PI3K/Akt And ERK 1/2 Pathways in Ovarian Cancer Cell Cultures

Latife Merve OKTAY

**Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin TUĞRUL

It has been shown that hydroxytyrosol (HT) has antitumoral, anti-proliferative and apoptotic effects on various cancer cell types. It was also studied in several tumor cell lines in terms of its action mechanisms. In this study, we aimed to evaluate the cytotoxic, apoptotic effects of hydroxytyrosol and whether its cytotoxic effect on through phosphatidylinositol 3- kinase / Akt (PI3K/Akt) and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) signal transduction pathways in human ovarian cancer cell cultures OVCAR-3 and MDAH-2774.

To investigate the cytotoxic effect of increasing concentrations of HT (50-400 μ M) XTT assay was used in OVCAR-3 and MDAH-2774 cell lines at 24., 48., 72. and 96. hours. To determine the apoptotic effect of HT, DNA fragmentation assay and protein antibody array methods were used. XTT assay was used to determine whether hydroxytyrosol is effective on PI3K/Akt and ERK 1/2 signal transduction pathways, specific inhibitors of these pathways were used. The findings were evaluated by ANOVA followed by Dunnett's statistical analyzes.

IC₅₀ value of HT in MDAH-2774 cell cultures was calculated as 102.3 μ M at 72 h and 51.5 μ M in OVCAR-3 cell cultures at 96 h.

Apoptotic effect of HT in MDAH-2774 cells at 72 h was the highest at 100 μ M, and kept lowering at 150 μ M concentrations and was not seen at 200 μ M and higher concentrations. Highest apoptotic effect was seen at 100 μ M concentration in OVCAR-3 cells at 96 h, however apoptotic effect was decreased over 100 μ M concentrations.

In our study, HT increased the levels of pro-apoptotic molecules Bad, Bax, active caspase-3, Htra2/Omi and SMAC/DIABLO and also increased the levels of pro-apoptotic death receptors TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 and FAS/TNFRSF6, however, it decreased the levels of Survivin which is one of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in MDAH-2774 cells. In OVCAR-3 cells, HT decreased the levels of anti-apoptotic proteins Bcl-, pro-caspase 3 and IAP family proteins CIAP-1, CIAP-2, XIAP, Livin and Survivin and increased the levels of cytochrome c.

We have shown that cytotoxic effect of HT is not through PI3K/Akt signaling pathway however, it may effect through ERK1/2 signaling pathway in both OVCAR-3 and MDAH-2774 cells.

These findings show that HT has cytotoxic and apoptotic effects on ovarian cancer cell lines and it may show its cytotoxic effect through ERK 1/2 signalling pathway.

Key words: ovarian cancer, hydroxytyrosol, cytotoxicity, apoptosis, ERK 1/2

2015, 57 pages

1. GİRİŞ

Yumurtalık kanseri jinekolojik kanserler içinde en öldürücü olanıdır. Bunun nedeni erken dönemde herhangi bir belirti vermemesi ve erken tanı için günümüzde etkili bir tanı yönteminin olmamasıdır [1,2]. Yumurtalık kanserinin iyi karakterize edilen ve farklı hastalıklar olduğu kabul edilen 5 alt tipi vardır. Bunlar en sık görüldenden en az görülene doğru sırasıyla; ileri derecede seröz (HGSC), berrak hücreli (CCC), endometrioid (EC), müsinöz (MC) ve düşük derecede seröz (LGSC) yumurtalık kanseridir [3].

Karboplatin/paklitaksel kombinasyonu yumurtalık kanseri tedavisinde ilk tercih olmasına rağmen gelişen ilaç direnci nedeniyle kemoterapötiklerin etkinliği kaybolmaktadır. Tümör dokularının cerrahi müdahale ile çıkarılması ve kemoterapi sonrasında yumurtalık kanseri hastalarının %60-70'inde hastalık tekrarlamakta ve platin bazlı kemoterapiye direnç gelişmektedir [4]. Bu nedenlerle yumurtalık kanseri tedavisinde etkili yeni ajanların belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Hydroxytyrosol [4-(2-Hidroksietil)-1,2-benzenediol] (HT) zeytin meyvesinde, yağında ve yapraklarında bulunan oleuropein'in hidrolizi ile açığa çıkan fenolik bir fitokimyasal moleküldür. Bu molekülün meme, kolon, kolorektal, melanom, prostat ve insan promiyelositik lösemi hücre hatlarında sitotoksik, apoptotik ve çeşitli sinyal ileti yollarında etkili olduğu gösterilmiştir [5-10].

Yaptığımız literatür araştırmasına göre Hydroxytyrosol'ün yumurtalık kanseri hücre kültürlerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanında HT'nin yumurtalık kanseri hücre hatlarındaki olası sitotoksik ve apoptotik etkilerinin moleküler mekanizmaları bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, Hydroxytyrosol'ün çeşitli konsantrasyonlarının, insan yumurtalık kanserinin HGSC alt tipi olan OVCAR-3 ve EC alt tipi olan MDAH-2774 kültürlerinde sitotoksik, apoptotik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca HT'nin belirli konsantrasyonlarda gözlenen sitotoksik etkisinin, PI3K/Akt ve ERK 1/2 sinyal yolları ile bağlantılı olup olmadığı yollarla ilişkili spesifik inhibitörleri (sırasıyla LY294002 hidroklorid ve FR180204) kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yumurtalık Kanseri

Jinekolojik kanserler arasında yumurtalık kanseri (OC) dünya çapında gelişmiş ülkelerde 225.500 yeni vaka ve tahmini 140.200 ölüm ile mortalitenin önde gelen nedenidir [11]. Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda görülen kanser ölümleri arasında dördüncü sıradadır [2]. GLOBOCAN 2008 verilerine göre ülkemizde her yıl 1800 kadın yumurtalık kanserine yakalanırken, 1200 kadın bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. 2009 yılı verilerine göre ise Amerika Birleşik Devletleri'nde 20.460 kadın yumurtalık kanserine yakalanmış, 14.436 kadın hayatını kaybetmiştir. Hastalığın bu kadar ölümcül olmasının sebebi erken dönemde herhangi bir belirti vermemesi ve erken tanı için günümüzde etkili bir tanı yönteminin olmamasıdır [2]. Belirtilerinin spesifik olmaması nedeniyle de hastaların çoğunda metastaz olmadan önce fark edilememektedir [1].

İlerlemiş yaş, genetik profil, hormonal profil (erken başlayan regl, yüksek yumurtlama döngüsü sayısı, geç menopoza, kısırlık, endometriozis), çevresel faktörler (beslenme, obezite, sigara kullanımı, virüs vb.), coğrafi alanlar, ırksal ve etnik varyasyon (genetik miras ile korelasyon gösterir) yumurtalık kanseri gelişiminde etkili olan faktörlerdir [2]. Yumurtalık kanseri için önemli risk faktörlerinden biri de BRCA1, BRCA2, yanlış eşleşme tamir genleri ya da germline TP53 mutasyonları etkisiyle olan yumurtalık, meme, rahim ve kolon kanserleri ile ilgili pozitif aile öyküsü görülmesidir. Yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %15'i ailesel, %85'i sporadiktir [11].

2.1.1. Yumurtalık Kanseri Alt Tipleri ve Moleküler Biyolojisi

Normal yumurtalık gonadal sırttan gelişir ve 3 temel hücre tipi içerir: 1) endodermden türeyen ve çoğalıp oositlere farklılaştıkları yer olan gonadal sırtta göç eden germ hücreleri, 2) östrojen ve progesteron üreten endokrin ve interstisyel hücreleri ve 3) Müller kanalından türeyen, yumurtalığı kaplayan ve yumurtalık yüzeyinin hemen altındaki inklüzyon kistleri sınırını çizen epitelyal hücreler. Benign ve malign tümörlerin her ikisi de bu üç yumurtalık hücre tipinin birinden

kaynaklanabilir. Germ hücreli tümörler en sık 20'li ve 30'lu yaşlarda görülür ve yumurtalık kanserlerinin %3-5'inden sorumludur. Tüm yumurtalık kanserlerinin %7'sini oluşturan seks-kord-stromal tümörler genellikle hormon salgılayan yumurtalık bağ dokusundan ileri gelir ve her yaştaki kadında görülebilir. Epitelyal yumurtalık kanserleri ise genellikle 40 yaşından sonra gelişir ve malign yumurtalık tümörlerinin yaklaşık %90'ını meydana getirir [11].

Geçmişte yumurtalık kanseri tek bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Ancak yumurtalık karsinomu çeşitli histopatolojik özelliklere sahip ve farklı biyolojik davranışları ifade eden çeşitli tümörleri içerir [12].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yumurtalık neoplasmlarını histolojik farklılaşmalarına göre epitelyal, seks-kord stromal ve germ hücreli neoplazmlar olarak sınıflandırmaktadır. Epitelyal yumurtalık tümörleri en büyük grubu temsil eder ve seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, geçiş hücreli ve son olarak Brenner tümörler olmak üzere alt gruplara bölünmüştür [12].

Klinik, hücresel ve moleküler olarak yumurtalık kanserleri histolojik düzeye, moleküler fenotipe ve genotipe göre tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Tip 1'e dahil olanlar; düşük derece seröz (LGSC), müsinöz (MC), endometrioid (EC) ve berrak hücreli (CCC) karsinomlardır. Bunlar genellikle yavaş büyüyen, erken evrede (I ya da II) tanı konulan tiplerdir ve konvensiyonel kemoterapiye dirençlidirler ancak hormonal tedaviye yanıt verebilirler. Daha yaygın olarak görülen tip 2 grubu ise ileri derecede seröz (HGSC), ileri derecede endometrioid ve farklılaşmamış olarak adlandırılan histotipleridir. Bu kanserler geç evrede (III-IV) ortaya çıkar, agresif olarak büyür ve konvensiyonel kemoterapiye, daha az olarak da hormonal tedaviye yanıt verir [11].

Yumurtalık kanseri oluşumunda gen amplifikasyonu, germline ve somatik mutasyonlar, hipermetilasyonlar ve çok sayıda kromozomal delesyon ile tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin rol oynadığı bulunmuştur. Bu genler, kanser hücre çoğalması, canlılığını sürdürmesi, yayılması ve metastazında merkezi rol oynayan hücre sinyal ileti yolları ile doğrudan bağlantılıdır. Bu yolların dolaşım

haritasının anlaşılması yeni tedavi stratejilerinin bulunması için önemli bir aşama gibi görünmektedir.

Yumurtalık kanseri ile ilişkili olan sinyal ileti yolları; nükleer faktör kappa B (NF-kB) yolağı, Janus protein kinaz/ sinyal ileti ve transkripsiyon aktive edici protein 3 (Jak-STAT 3) yolağı, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) yolağı, proto-onkogen tirozin protein kinaz Src yolağı, ErbB aktivasyon yolağı, lizofosfotidik asit (LPA) yolağı, fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağı, Müllerian inhibitör madde reseptör yolağı, epidermal büyüme faktörü (EGF) yolağı, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) yolağı ve östrojen reseptör (ER) beta yolağıdır [2].

Tip 1 kanserlerde p53 ve BRCA1/2 genleri yabancıl tiptedir, ancak IGFR ekspresyonu ve PI3K yolağının aktivasyonu ile birlikte Ras ve Raf'ta sık mutasyonlar görülür. Tip 2 kanserlerin hemen hemen hepsinde p53 mutasyonu vardır, neredeyse yarısında BRCA1/2 mutasyonu ya da fonksiyon bozukluğu mevcuttur, ancak diğer mutasyonlar nadirdir. Bunlarda onkogenezin, Ras/MAPK ve PI3K yollarını aktive eden birçok çoğalma düzenleyici genin amplifikasyonu tarafından tetiklendiği görülmektedir [11].

Tip 2 HGSC'ler tüm yumurtalık karsinomlarının %70'ni oluşturur ve bu hastalıktan ölümlerin %90'ından sorumludur. Tedavi için klasik yaklaşım agresif cerrahinin ardından platin bileşenleri ve taksanlarla kombine kemoterapidir. Ancak tedavinin ardından 6 ay içinde hastaların yaklaşık %25'inde platine dirençli kanser tekrarlamakta ve genel olarak 5 yıl hayatta kalma oranı %31 olarak bilinmektedir [3].

Çalışmamızda tercih ettiğimiz model hücre hatlarımızdan OVCAR-3, tip 2 HGSC sınıfına dahildir. Kullandığımız ajanın yumurtalık kanserinin farklı alt tiplerindeki etkilerini karşılaştırabilmek amacıyla seçtiğimiz diğer hücre hattı olan MDAH-2774, tip 1 endometrioid (EC) karsinomudur.

Yumurtalık kanserinin alt tiplerine göre histolojik yapıları ve moleküler özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Yumurtalık kanserlerinin histolojik özellikleri, öncüleri ve ayırıcı moleküler özellikleri [11].

Moleküler tip	Histoloji	Öncü	Moleküler özellikler
I	Düşük derecede seröz karsinoma (LGSC)	Border-line karsinoma sekans	KRAS ve BRAF mutasyonları
I	Düşük derecede endometrioid karsinoma	Endometriozis	CTNNB1, PTEN mutasyonları ve mikrosatellit instabilitesi
I	Müsinöz karsinoma	Cystadenoma-borderline sekans	KRAS mutasyonları
I	Berrak hücreli karsinoma	Endometriozis olabilir	PTEN mutasyonları ve LOH*, PIK3CA mutasyonları
II	İleri derecede seröz karsinoma (HGSC)	İnklüzyon kistlerinden yeniden oluşum	p53 mutasyonları, BRCA 1/2 mutasyonları ve BRCA1 metilasyonu
II	İleri derecede endometrioid karsinoma	Epitelial inklüzyon kistleri	p53 mutasyonları, BRCA 1/2 mutasyonları ve BRCA 1 metilasyonu
II	Farklılaşmamış karsinosarkoma	-	-

*LOH: heterozigosite kaybı

2.1.1.1. İleri Derecede Seröz Karsinom (HGSC) Moleküler Biyolojisi

HGSC’lerde %97 oranında p53 mutasyonları görülür [13]. p53 hücre döngüsünün düzenlenmesinde ve DNA tamirinde anahtar bir rol oynar. Hücresel replikasyon meydana gelmeden önce p53 hücre döngüsünün G2 kontrol noktasında etki ederek hücre büyümesini durdurup DNA hasarının onarılması için hücreyi teşvik

eder. Hasar onarılamayacak ise apoptozisi başlatır. Bu nedenle p53 mutasyonları DNA hasarının yayılmasına ve kromozomol instabiliteye yol açar [3].

Kalıtsal BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları HGSC'lerin %15'inden daha fazlasında görülürken, somatik BRCA1/2 mutasyonları ya da BRCA1 promotor metilasyonu %14-22'sinde görülür [14]. Bu genlerin her ikisi de DNA tamir proteinlerini kodlar. Bu proteinlerin eksikliği homolog rekombinasyon sırasında DNA çift zincir kırıklarının onarımında kusura ve böylece kromozomal instabiliteye sebep olur. Normalde BRCA1/2 işlev kaybı hücreler için ölümcüldür, ancak bu hücrelerde p53 mutasyonlarının varlığı hücrelerin hayatta kalmasını sağlar [3].

HGSC'lerin %50 ya da daha fazlasında bulunan homolog rekombinasyon kusurları; EMSY amplifikasyonu (olguların %8'inde), PTEN delesyonu (%7), RAD51C hipermetilasyonu (%2) ya da diğer nadir mekanizmalar sonucu da meydana gelebilir [3,15].

Kanser Genom Atlası (TCGA)'nda 400'den fazla HGSC ile yapılan derinlemesine moleküler araştırmalar, HGSC'de p53 ve BRCA1/2 hariç tek gen mutasyonlarının nadir olduğunu, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sadece altı gende tekrarlayan mutasyonların bulunduğunu ve bunların tümünün %10'dan daha az bir oranda görülen düşük frekanslı olaylar olduğunu göstermiştir [3].

HGSC'nin ayırıcı özelliği yalnızca tekrarlayan mutasyonlar değil aynı zamanda 100'den daha fazla sayıda tekrarlayan amplifikasyonlar ve delesyonların teşhis edilmesiyle ortaya konan çok sayıdaki somatik kopya sayı değişiklikleri (SCNA)'dır [3].

TCGA çalışmalarından elde edilen bilgiler retinoblastoma (RB), PI3K/RAS, NOTCH ve FoxM1 yolaklarının HGSC oluşumuna katkısı olduğunu göstermektedir. Bu yolaklar hastalığın tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmesine adaydırlar [3].

HGSC oluşumunda rol oynayan bu mutasyon ve değişimler Tablo 2.2'de belirtilmektedir.

Tablo 2.2: İleri derecede seröz karsinom moleküler özellikleri [3]

Kromozomal instabilite / anöploidi (%100)
P53 mutasyonları (> %90), BRCA kaybı (%30-45)
Birkaç mutasyon, çok sayıda SCNA*
Homolog rekombinasyon defektleri
FoxM1 (vakaların %84'ü), RB (%67), PI3K/RAS (%45), NOTCH (%22) sinyal ileti değişiklikleri
*SCNA: somatik kopya sayısı değişiklikleri

2.1.1.2. Endometrioid Karsinom (EC) Moleküler Biyolojisi

Endometrioid karsinoma (EC) yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %10'nunu oluşturur ve genellikle düşük dereceli olarak ve erken evrede ortaya çıkar (ileri derecede karsinoma dönüşebilir). Yumurtalıktaki EC endometriumdaki EC'de gözlemlenen benzer morfolojik özelliktedir. Skuamoz farklılaşma ile glandüler görünümü karşılaşılan en yaygın modeldir [3].

AT'ce zengin etkileşim domaini içeren protein 1A (ARID1A) ve protein fosfataz 2'nin yapısal ve düzenleyici alfa altünitesi (PPP2R1A) mutasyonları hem berrak hücreli karsinoma hem de endometrioid karsinoma da görülür. EC'lerin %30'unda ARID1A mutasyonu, %12'sinde PPP2R1A mutasyonu vardır [3,16].

EC'lerin %38-50'sinde somatik mutasyonlar beta-katenin 1 (CTNNB1) geninin 3. ekzonunda meydana gelir ve vakaların %80'ninden fazlasında nükleer beta-katenin proteini tespit edilmiştir. PTEN geninin 3. ve 8. ekzonları arasında oluşan mutasyonların görülme sıklığı ise %20'dir [3].

PIK3CA mutasyonları da EC'de görülen bir mutasyon tipidir, ancak CCC'de görüldüğünden daha az rastlanır [17].

EC vakalarının yaklaşık %10'u yanlış eşleşme tamir proteinlerinin (MLS1, MSH2, MSH6 ve PMS2) ekspresyonunun kaybı ile ilişkilidir [3].

EC oluşumunda rol oynayan bu mutasyon ve değişimler Tablo 2.3'te belirtilmektedir.

Tablo 2.3: Endometrioid karsinom moleküler özellikleri [3]

PTEN, CTNNB1, ARID1A, PPP2R1A mutasyonları

MSI*

*Mikrosatellit instabilite (MSI) / yanlış eşleşme tamir proteini ekspresyonu kaybı

2.1.2. Yumurtalık Kanserini Araştırmak İçin Kullandığımız Model Hücre Hatları

Çalışmamızda insan yumurtalık kanserinin farklı alt tiplerini modelleyen ve farklı özelliklere sahip iki hücre hattı kullanıldı. Tip 1'e dahil olan ileri derecede seröz karsinoma (HGSC)'yı modelleyen OVCAR-3 ve tip 2 sınıfından endometrioid adenokarsinomayı modelleyen MDAH-2774 hücre hatlarının özellikleri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

2.1.2.1. OVCAR-3 İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı

OVCAR-3 hücre hattı; 60 yaşında, Kafkasya kökenli, ilerlemiş yumurtalık adenokarsinomlu hastanın asit sıvısından elde edilmiştir. Epitelyal morfolojide olan hücreler hem atimik farede tümör hem de agarozda klonlar oluşturabilmektedirler. Kültüre edilen hücreler kendilerine özgü steroid hormon reseptörleri olan sitoplazmik androjen, östrojen [18] ve progesteron [19] bağlama makromolekülleri içermektedir. [18].

Anöploid bir dişiden elde edilen hücre hattı, homojen boyanma bölgesi ve double-minute kromozomu içeren anormal bir karyotipe sahiptir [18]. Karyotip analizinde kromozom sayılarının triploidiye yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. Hücrelerde N11, N13, N14, N15, N16, N17 ve N22 kromozomları genellikle bulunmamaktadır. Bu kayıp kromozomların çoğu sitogenetik analizlerde marker olarak kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak marker olarak bilinmeyen kromozomların

büyük çoğunluğunda yapısal anormallikler görülmüştür. Karyotip analizleri sonucunda hücreler arasında kromozom sayısı ve yapılarının değişkenlik gösterdiği bulunmuştur [20].

Dizi analizleri sonucu OVCAR-3 hücre hattında p53 geninin mutant (248, Arg → Gln) olduğu belirlenmiştir. 743. nükleotidde Guanin'in Adenin'e değişimi nokta mutasyonu, 248. kodonda arjinin yerine glutamin aminoasidinin gelmesine sebep olmuştur [13].

2.1.2.2. MDAH-2774 İnsan Yumurtalık Kanseri Hücre Hattı

İnsan yumurtalık kanseri hücre hattı MDAH-2774; Kafkasya kökenli, endometrioid yumurtalık adenokarsinomlu hastadan elde edilmiştir. Tümörün derecesi ve evresi ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Bu hücre hattının büyüme karakteristikleri ve tümörijenik potansiyeli, endometrioid yumurtalık adenokarsinomunun klinik özellikleri ile paralellik göstermektedir [21].

MDAH-2774 hücre hattında yüksek derecede Wnt sinyal iletimi düzensizliği olduğu gösterilmiştir. Mutasyon analizlerinde Axis inhibitör 1 (AXIN1) geninde missense mutasyon sonucu sekans değişimi olduğu ve PI3K/Akt sinyal ileti yolağında bulunan K-ras geninin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra hücre hattının mutant p53 genine sahip olduğu belirtilmiştir [21].

2.1.3. Yumurtalık Kanseri Tedavi Yaklaşımları

Yeni teşhis edilmiş yumurtalık kanserinde sitoredüktif cerrahinin ardından uygulanan yardımcı tedavi altı seanslık karboplatin ve paklitaksel kemoterapidir. Karboplatin DNA'ya kovalent bağlanarak zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar meydana getiren alkilleyici bir ajandır. Paklitaksel mikrotübüllere nonkovalent olarak bağlanır ve mitotik iğ oluşumunu engelleyerek onların stabilitesini artırır. Her iki ajan da apoptozisi indükler [11].

Antikanser ajanların karboplatin, paklitaksel ve cisplatin ile kombine edilmesi, yumurtalık kanserindeki klasik tedavi yaklaşımlarını daha etkin hale getirir.

2.2. Apoptozis

Apoptozis çok hücreli organizmalarda yaygın olarak görülen programlı, morfolojik bir hücre ölümü tipidir. Organizma homeostazının sağlanmasında ve doku gelişiminde temel bir öneme sahiptir. Embriyogenez, normal yetişkin doku gelişimi ve organ atrofisi gibi farklı durumlarda apoptozis görülür. Ayrıca immün yanıt, enflamasyon ve genotoksik yaralanma sonrası bu hücrelerin ortadan kaldırılması gibi patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesi ve devam etmesi için son derece önemlidir [22,23].

Apoptozis sırasında hücrede birtakım metabolik ve fizyolojik olaylar gerçekleşir. Apoptosis uyarısı alan hücrenin nükleus, sitoplazma ve hücre yüzeyinde değişiklikler meydana gelir. Hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparak uzaklaşır, su kaybederek büzülür ve kalsiyum iyonlarını girişiyle hücre yoğunluğu artar. Kromatin yoğunlaşır, piknotik bir görüntü oluşur ve DNA nükleozomlarından kesilir. Hücre zarındaki fosfolipidlerin zarın iç yüzeyinden dış yüzeyine transloke olur ve hücre yüzeyi blebilenmeye başlar. Bu sırada çekirdek parçalanır. Hücre tomurcuk şeklinde zarla sarılı apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptoziste enflamasyon görülmez [22,23].

Apoptozis intrinsik (mitokondriyal) yol ve ekstrinsik (dış) yol olmak üzere iki şekilde gerçekleşir.

Hücre içinde oluşturulan sinyallerle uyarılan intrinsik yolda proapoptotik Bid tarafından antiapoptotik Bcl-2 inaktive edilir, Bax ve Bak aktifleşir. Bu şekilde mitokondriyon membranında por oluşumu indüklenerek porlardan sitokrom-c, Smac, Endo-G, Ca^{++} ve AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınır. AIF çekirdeği parçalarken Endo-G DNA'yı parçalar. Sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 da efektör kaspazlardan kaspaz-3'ü aktifleştirir ve hücre ölüme gider [23].

Ekstrinsik (dış) yolda hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (FAS, TNFR, TRAILR) ölüm sinyalleri olan ligandları (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanır. Bu

bağlanmadan sonra reseptör adaptör moleküller ve prokaspazlarla birlikte DISC (Death Inducing Signalling Complex) yapısını oluşturur. Başlatıcı kaspazlardan prokaspaz-8 aktive olur ve efektör kaspazlardan kaspaz-3 'ü aktive eder. DNA fragmentasyonun gerçekleşmesi ile hücre ölüme gider [23].

Apoptozis karsinogeneze karşı doğal bir hücrel savunma mekanizmasıdır. Ancak malign neoplasmlarda apoptozis düzenleyici yollar çoğunlukla devre dışı kalmıştır [22].

2.3. Hücre İçi Sinyal İletim Yolları

Hücrelerde sinyal iletimi parakrin, endokrin, otokrin ve sinaptik yollarla olabilir. Sinyal iletiminde rol alan moleküller proteinler, peptidler, steroidler, gazlar, ATP gibi biyomoleküller ve aminoasit türevleridir.

Hücrelerde sinyal iletimi mekanizması genel olarak şu şekilde işler: Molekül formundaki sinyal, reseptörüne bağlanarak aktivasyonu başlatır. Reseptöre bağlanan moleküle ligand denir. Bu ligandlar peptit, hormon, ilaç ya da toksin olabilir. Daha sonra bir dizi sinyal taşıyıcı yoluyla sinyal çekirdeğe iletilir ve hücrel yanıt oluşur. Hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi, metabolizması ve davranışı gibi hayati olayların düzenlenmesi bu hücrel yanıtlarla olur [24].

Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve yaşama özelliklerinin kontrolünü engellediğinden tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde rol oynar [25].

2.3.1. PI3K/Akt Sinyal İletim Yolu

Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal iletim yolu hücre yaşamının anahtar bir bileşenidir. Yumurtalık karsinomunda hücre hareketi ve adezyonu ile ilişkilidir ve çeşitli kanser hücrelerinin metastatik/invaziv fenotiplerine katkıda bulunur. Aynı zamanda hücre büyümesi ve farklılaşmasına katıldığı da bildirilmiştir. PI3K yolunun doğrudan ya da dolaylı düzenlenmesi hücre döngüsünün anormal ilerlemesine ve normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşümüne neden olur. Birçok

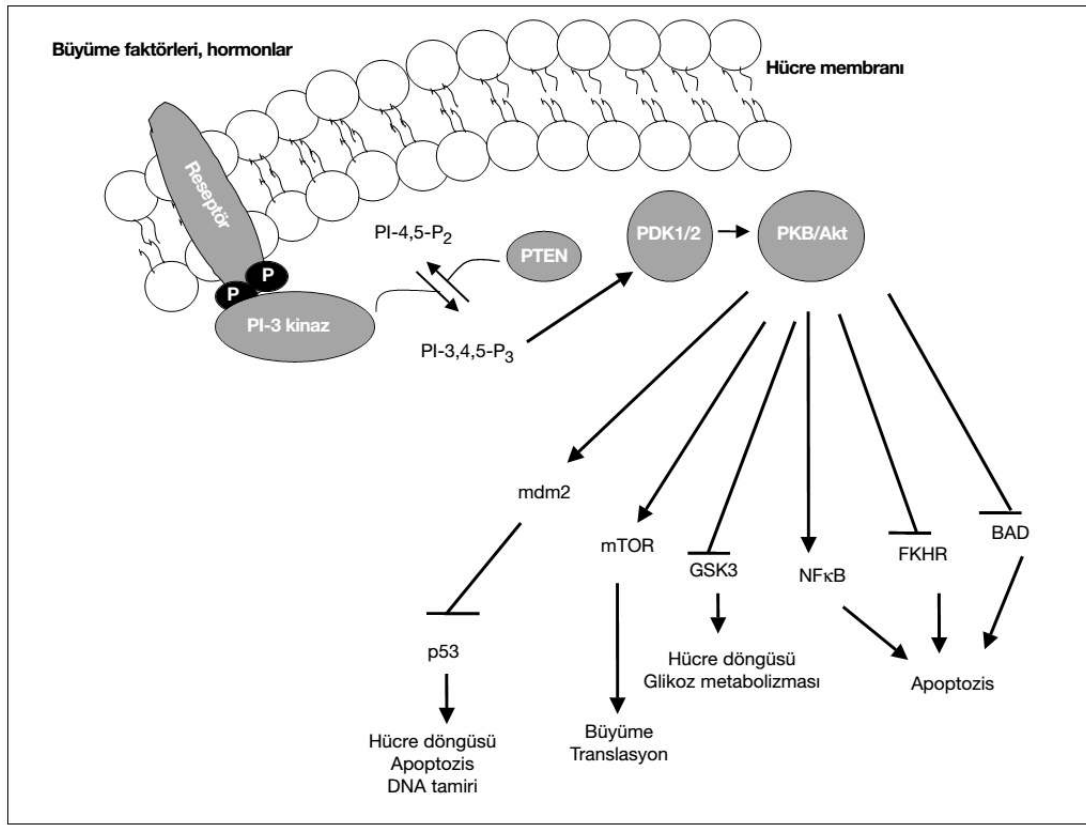
kanserde hiperaktivasyonu ve kanser gelişimindeki çok yönlü rolü nedeniyle PI3K/Akt yolağının inhibisyonu kanser için bir tedavi yolu olarak araştırılmıştır [2].

PI3K, fosfoinositid lipidlerinin inositol halkasının 3' hidroksil grubunu fosforilleyen bir fosfolipid kinazdır. Bir katalitik alt ünite (p110) ve bir düzenleyici alt ünite (p85)'den oluşmuştur. PI3K; p85 alt ünitesi ile etkileşen ve p110 katalitik alt ünitesini aktive eden çeşitli reseptör tirozin kinaz (RTK)'lar aracılığıyla büyüme faktörlerine yanıt olarak aktive olur. Aktive olmuş PI3K, membran lipidi olan fosfotidilinositol 4,5-bifosfat (PIP₂)'yi fosforilleyerek fosfotidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP₃)'e dönüşmesini sağlar. PIP₃, ileriki aktivasyon ve downstream sinyal iletimi için PI3K'nın sitozolik efektörlerini plazma membranına toplar. Bu süreç tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homolog olan PTEN tarafından düzenlenir. PTEN, PIP₃'ü defosforile ederek PIP₂'ye dönüşmesini sağlar ve PI3K sinyal iletimini etkili bir şekilde durdurur [26].

PI3K yolağının temel downstream efektörlerinden biri protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen potent bir onkogenik serin/treonin kinaz olan Akt'dir. Akt ailesi 3 üyeden oluşur (Akt1, Akt2 ve Akt3). Bu üyeler yüksek sekans homolojisi ve benzer domain yapılarına sahiptir. Bu benzerlikler Akt kinaz aktivitesi için önemli bir merkez katalitik domain olan ve protein-protein etkileşimi için gerekli olan N-terminal plekstrin homoloji (PH) domaini ve C-terminal düzenleyici domainidir [26].

Aktive olmuş Akt; hücre canlılığı, çoğalma ve apoptozisi içeren birkaç önemli moleküler yolağın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Akt, proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan BAD'ın önleyici bölgesi Ser¹³⁶'yı fosforilleyerek Bcl-XL ile bağlanmasını azaltır. Böylece mitokondriyal ölüm proteinlerinin salınımını inhibe eder. Akt aynı zamanda Ser¹⁹⁶'yı fosforilleyerek kaspaz-9 aktivitesini inhibe eder. Yine Akt, Thr³² ve Ser²⁵³'ün fosforilasyonu ile forkhead transkripsiyon faktör 1 (FOXO-1)'i fosforile eder ve inhibisyonuna neden olur [26].

PI3K/Akt yolağında sinyal iletimi mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir [25].



Şekil 2.1. PI3K/Akt yolağında sinyal iletimi

2.3.1.1. Yumurtalık Kanserinde PI3K/Akt Sinyal İleti Yolağı

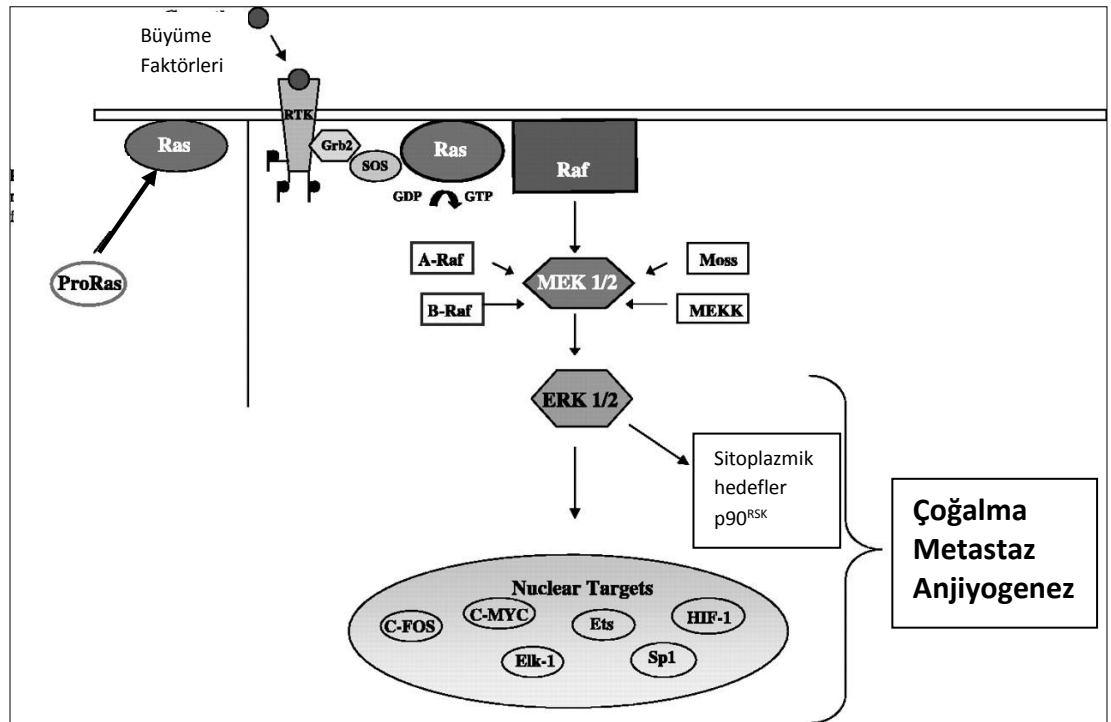
Yumurtalık kanserinde PI3K/Akt/mTOR aktivitesi çoğunlukla artmıştır. Bu durum yumurtalık kanserinin daha agresif olmasına neden olur ve diğer organlara yayılmasını kolaylaştırır. PI3K sinyal iletimindeki anormallikler hem tip 1 hem de tip 2 yumurtalık kanserlerinde tespit edilmiştir. Artmış PI3K aktivitesine sahip hücreler mutasyonlu PTEN'e ve yüksek derecede Akt ve PDK1 aktivitesine sahiptir, bu da protein kinaz C (PKC), ribozomal S6 kinaz, serum/glukokortikoidle düzenlenen kinaz (SGK), rodopsin (Rho) kinaz ve p21 proteiniyle aktive olan kinaz (PAK1)'in dahil olduğu birkaç protein serin/treonin kinazın sırayla aktivasyonuna yol açar, ki bu proteinler artmış invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir [27].

2.3.2. ERK 1/2 Sinyal İleti Yolağı

ERK hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde en çok çalışılan MAPK kaskadıdır. ERK 1 ve 2 bu kaskadın temel bileşenleridir. ERK sinyal

kaskadı; G-protein bağı reseptörler (GPCR), reseptör tirozin kinazlar (RTK), integrinler, ve iyon kanallarını içeren çeşitli reseptörler tarafından aktive edilir. Sinyalin başlatılması genellikle RTK'ların epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri tarafından aktivasyonu ile gerçekleşir [28]. Örneğin EGF, reseptörüne bağlandığında tirozin rezidüleri üzerindeki otofosforilasyona yol açar ve membranla ilişkili Ras'ı etkinleştirecek olan Grb-2-Sos kompleksini çağırır. Daha sonra Ras/Raf-Mek 1/2-ERK 1/2 aktive olur. ERK 1 ve 2 direk olarak nükleusa geçebilir ve DNA sentezini ve hücrelerin bölünme ve gelişmesine yol açan c-fos, c-myc gibi birkaç erken genin ifade edilmesini uyarır [29].

ERK 1/2 yolağında sinyal iletimi mekanizması Şekil 2.2'de gösterilmiştir [25].



Şekil 2.2. ERK 1/2 yolağında sinyal iletimi

Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) sinyal yolağı kanser gelişimi için çok önemlidir ve pek çok kanser tipinde sürekli aktive durumdadır [29].

MAPK yolağı ya Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS) veya v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog-B1 (BRAF) mutasyonunun

bir sonucu olarak kalıcı bir sinyal aktivitesine ya da hücre replikasyonunun indüklenmesine katılma yolu ile onkojenik bir potansiyele sahiptir. KRAS veya BRAF gibi upstream faktörlerin aktivasyonu ya da aşırı ekspresyonu, ERK'nın sürekli aktivasyonuna sebep olabilir ve bu da downstream protein kinazları veya transkripsiyon faktörlerini aktive ederek tümör gelişimini artırabilir [12].

2.3.2.1. Yumurtalık Kanserinde ERK 1/2 Sinyal İleti Yolağı

Tip 1 yumurtalık karsinomlarından özellikle düşük dereceli seröz, müsinöz ve endometrioid karsinomlarda KRAS ve BRAF mutasyonlarının hastalığa özgü olduğu gösterilmiştir [12].

2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Hücre canlılığının belirlenmesinde deoksiribonükleik asit sentez hızının ölçülmesine dayalı yöntemler, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testler, proliferasyon işaretleyicilerinin (marker) ölçümüne dayalı testler ve hücrelerdeki ATP miktarının ölçümüne dayalı yöntemler kullanılır [30].

XTT testi metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı olarak çalışan bir yöntemdir. 2,3-Bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Bu tuz canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrojenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşür ve turuncu renk meydana gelir. Oluşan turuncu rengin yoğunluğu ile metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı doğru orantılıdır. Renk değişimi absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülür [30,31].

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise tripan mavisi ile boyamadır. Canlı hücrelerde membran bütünlüğü olduğundan negatif yüklü olan tripan boyası hücre içine giremez. Ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine aldıklarından mavi renkte görünürler [31].

2.5. Hydroxytyrosol [4-(2-Hidroksietil)-1,2-benzenediol]

Hydroxytyrosol zeytin meyvesinde, yağında ve yapraklarında bulunan oleuropein'in hidrolizi ile açığa çıkan fenolik bir fitokimyasal moleküldür (Şekil 2.3). Aynı zamanda nörotransmitter bir madde olan dopamin'in metaboliti olduğu bilinmektedir [32].

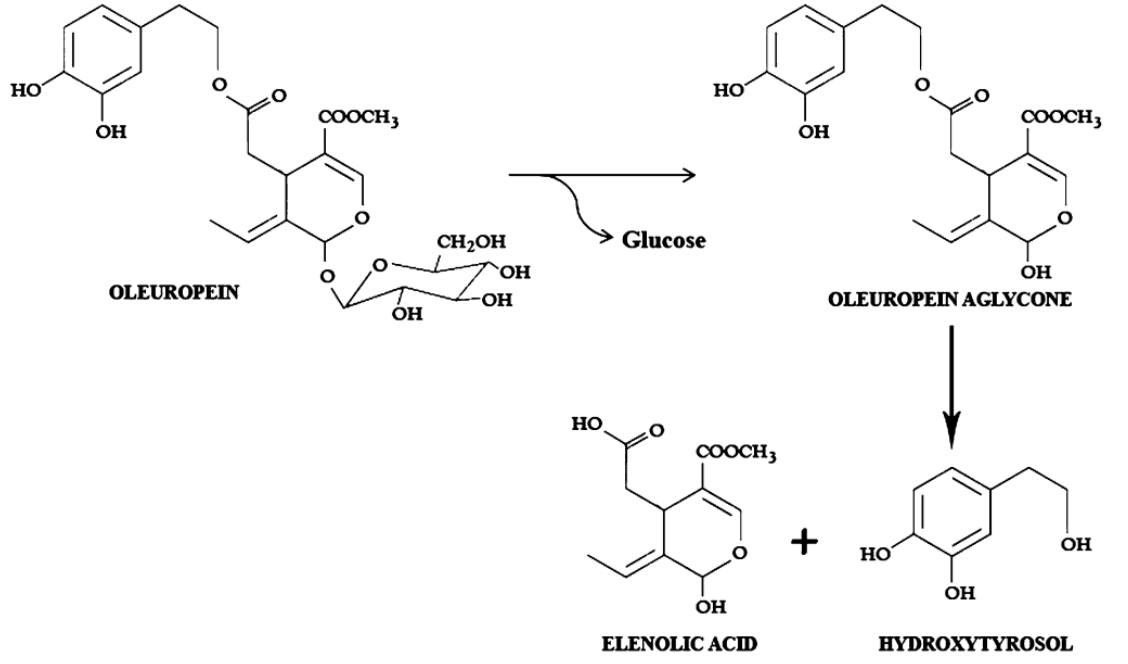
Hydroxytyrosol ilk defa 1950 yılında Stoll ve arkadaşları tarafından ekinakosid (*Echinacea angustifolia* kökü ekstraktından elde edilen ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibiyotik aktivite gösteren fenolik bir glikozid) bileşeni olarak tanımlanmıştır. 1966 yılında ise Panizzi ve arkadaşları ilk defa zeytinden izole ettikleri oleuropein'nin kimyasal yapısını ortaya koymuşlardır [32].

Hydroxytyrosol'ün doğal oluşumunun dışında çeşitli yollarla sentetik olarak üretimi de vardır [32].

Çeşitli kanser hücre hatlarıyla yapılmış *in vitro* çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılmış *in vivo* denemelerle antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar etkileri ve osteoporoz semptomlarının engellenmesinde rolü olduğu ortaya konulmuştur. Hydroxytyrosol'ün ilaçlara karşı önleyici, hücreye özgü sitotoksik ve apoptotik özellikleri ile antikanser etkili olduğu hem *in vitro* hem *in vivo* birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [33]. Antitümöral olarak anjiyogenezin önlenmesinde de rolü olduğu belirtilmiştir [34].

Oleuropein'den Hydroxytyrosol oluşumu mekanizması Şekil 2.3'te gösterilmiştir [35].

Akdeniz beslenmesinin temel bileşenlerinden biri olan zeytinyağının tıbbi yararları olduğu antik çağlardan beri bilinmektedir. Özellikle son 10 yıldır bu konudaki araştırmalar popülerlik kazanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar zeytinyağının hem kardiyovasküler hastalıklar hem de kanser üzerindeki olumlu etkilerini işaret etmektedir.



Şekil 2.3. Oleuropein’den hydroxytyrosol oluşumu mekanizması (35).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından kurulan ve yaklaşık 30 yıl süren ‘Seven Countries Study’ (Yedi Ülke Çalışması) isimli araştırmada 7 farklı ülkeden 40-59 yaş arası 13.000 kişinin beslenme alışkanlıkları incelenmiştir. Bu çalışma Akdeniz ülkelerinde yaşayan insanlarda kanser ve koroner kalp hastalıklarına bağlı ölüm oranlarının diğer ülkelere göre daha düşük olduğunu ortaya koymuştur [36].

Tahminler Batı ülkelerindeki geleneksel Akdeniz beslenmesinin kolorektal kanserlerin oluşumunda %25, meme kanserinde %15, prostat, pankreas ve endometrial kanserlerin oluşumunda %10 oranında azalmaya yol açabileceğini göstermektedir [36].

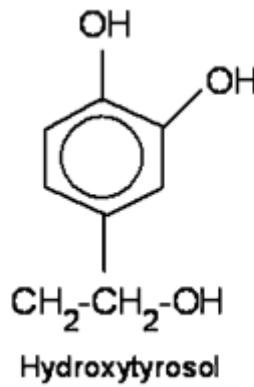
Günümüzde zeytinyağının faydaları içeriğindeki minör fenolik bileşen olan Hydroxytyrosol’e atfedilmektedir.

Her 100 gr zeytinde yaklaşık 2 gr hydroxytyrosol bulunmaktadır. Zeytinyağı, özellikle de ekstra işlenmemiş zeytinyağı diğer bitkisel yağlarla kıyaslandığında oldukça pahalıdır [36]. Bu da çeşitli şirketleri Hydroxytyrosol’ün sentetik olarak üretimine itmiştir.

2.5.1. Kimyasal Yapısı

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) isimlendirme sistemine göre formülü 4-(2-Hidroksietil)-1,2-benzenediol olan Hydroxytyrosol'ün moleküler formülü $C_8H_{10}O_3$ 'tür [37].

Hydroxytyrosol, polar karaktere sahip olmasının yanı sıra amfipatik davranış gösteren fenolik bir bileşiktir (Şekil 2.4) [35]. HT'nin kimyasal yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Hydroxytyrosol'ün kimyasal yapısı (35).

2.5.2. Etki Mekanizmaları

Literatürde Hydroxytyrosol'ün antikanser, antioksidan, antiinflamatuvar etkileri ve osteoporoz semptomlarının engellenmesinde rolü olduğuna dair çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar bulunmaktadır [38].

2.5.2.1. Antikanser Aktivite

Hydroxytyrosol'ün hücreye özgü sitotoksik ve apoptotik özellikleri ile antikanser etkili olduğu, ayrıca antitümöral olarak anjiyogenezin önlenmesinde de rolü olduğu çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda belirtilmiştir [38].

2.5.2.1.1. Anti-proliferatif ve Pro-apoptotik Etkileri ile Hücre Döngüsüne Etkisi

2006 yılında Guichard ve arkadaşları insan kolon karsinomu hücre hattı HT-29 ile yaptıkları çalışmada HT'nin, mitokondrial anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonunun azalmasına, pro-apoptotik Bad, Bak ve Bax ekspresyonlarının artmasına yol açarak apoptozisi teşvik ettiğini göstermişlerdir. Bu apoptotik olayların gerçekleşmesi kaspaz kaskadının aktivasyonunu indükleyerek hücreyi apoptotik ölüme götürmektedir. Aynı çalışmada yine HT-29 hücrelerinde HT'nin apoptozisle ilişkili çeşitli yollarda anahtar rol oynayan serin/treonin protein fosfatazı (PP2A) aktive ederek ve endoplazmik retikulum stresi yanıtını teşvik ederek apoptozise neden olduğu gösterilmiştir [5].

Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinde Hydroxytyrosol'ün p38 ve CREB (cyclic adenosine mono phosphate response element binding protein) aktivitesini inhibe ederek COX-2 (siklooksijenaz-2) ekspresyonunun azalmasına yol açtığı ve böylece hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak çoğalmayı inhibe ettiği gösterilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde COX-2 overekspresedir. Bu overekspresyonun hücre canlılığını, büyümesini, göçünü, invazyonunu ve anjiyogenezi teşvik etmesi ile kolorektal neoplazi arasında güçlü bir ilişki vardır [39].

Siklin bağımlı kinazların (CDK) kendilerine özgü siklinlerinin bağlanması ile aktive veya inaktive olmaları hücre döngüsünü düzenleyen temel mekanizmalardan biridir. Hücre çoğalmasının teşvik edilmesinde rol oynadığı bilinen MAPK sinyal ileti yolağındaki ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktivasyonu, siklin D1 ekspresyonu için gereklidir. Kolorektal kanserlerden elde edilen hücre hatlarında temelde ERK 1/2'nin aktive olduğu kanıtlanmıştır. Corona ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada Caco-2 hücre hattında hydroxytyrsol'ün ERK 1/2 aktivasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve buna paralel olarak siklin D1 seviyesinde belirgin bir azalma olduğu gösterilmiştir [7].

Hücre döngüsünün ilerlemesinin anahtar bileşeni olan CDK'lar, inhibitörleri (CDKi) ile inaktive edilir. CDKi'ler; p21^{WAF1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p15^(INK4B),

p16^(INK4A), p18^(INK4C) ve p19^(INK4D)'dur. p21^{WAF1/Cip1} ve p27^{Kip1}, siklin D/CDK6 kompleksine bağlanarak pRb (retinoblastoma protein) fosforilasyonunu inhibe etme yeteneğine sahiptir. pRb fosforilasyonu transkripsiyon faktörü olan E2F'nin salınımını indükler. E2F, DNA sentezinde ve hücre döngüsünün G1/S fazı geçişinde rol alan genlerin ekspresyonlarını düzenler. Hydroxytyrosol'ün insan promiyelositik lösemi hücrelerinde (HL60) apoptozisi indüklediği, ancak lenfosit ve polimorfonükleer hücreler dahil olmak üzere primer hücrelerde böyle bir etki yaratmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada HT'nin hücrelerde siklin D3, siklin bağımlı kinaz 1A (p21^{WAF1/Cip1}) ve siklin bağımlı kinaz 1B (p27^{Kip1}) ekspresyonlarını artırarak siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) seviyesinin düşmesine neden olduğu böylece G0/G1 fazında hücre döngüsünün ilerlemesini durdurduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada HT'nin S fazındaki HL60 hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği belirtilmiştir [6].

Han ve arkadaşlarının insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) ile yaptıkları çalışmada HT'nin, hücre döngüsünü G1'den S faza geçiş sırasında durdurduğu, böylece hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir [8]. Aynı hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada HT'ce zengin zeytin yaprağı özütünün kanser hücrelerinde peptidyl-prolyl cis-trans izomeraz Pin1 ekspresyonunu baskılayarak G1 fazının anahtar proteini olan siklin D1 seviyesinde azalmaya yol açtığı böylece hücre döngüsünü durdurduğu belirtilmiştir [40].

İnsan kolorektal kanseri hücreleri (SW620) ile yapılan bir çalışmada HT'nin FAS (fatty acid synthase) ekspresyonunu baskılayarak proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. FAS, yağ asitlerinin biyosentezinde anahtar rol oynayan anabolik bir enzimdir. Kolon kanseri dahil olmak üzere yaygın kanser türlerinde yüksek seviyelerde FAS ekspresyonu görülür. Kolon karsinomunun büyümesi ve patogenezinde FAS ekspresyonu önemli rol oynar [9].

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan insan yumurtalık kanseri hücre hatları MDAH-2774 ve OVCAR-3 Celal Bayar Üniversitesi DEFAM Laboratuvarı'nda önceden stoklanan mevcut hücre hatlarından temin edildi. Hücreler deney öncesinde -80°C'de muhafaza edildi; deney işlemleri sırasında ise 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörlere alındı ve hücre kültür işlemleri ultraviyole laminar hava akımlı kabinlerde steril ortamda gerçekleştirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Devamlılığı

Ultraviyole laminar hava akımlı kabinlerde steril ortamda gerçekleştirilen hücre kültürü işlemlerinin basamakları aşağıda belirtilmektedir.

* - 80°C'de dondurucuda muhafaza edilen MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücreleri 37°C sıcaklıkta su banyosunda çözüldü.

* Çözülen hücreler %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, 10.000 unite/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklenen RPMI-1640 besiyeri içerisinde homojenize edilerek 75cm²'lik filtreli hücre kültür flasklarına aktarıldı. Flasklar 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörlere alınarak hücrelerin çoğalması için gerekli koşullar sağlandı.

* Çoğaltılan hücreler canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta her gün kontrol edildi. Hücre yoğunluğunun %80'nin üzerine ulaştığı belirlendiğinde pasajlanarak çoğaltıldı.

3.2.2. Tripan Mavisi Yöntemi ile Hücrelerin Sayımı

Canlı hücrelerin sayımında en çok tercih edilen yöntemlerden biri tripan mavisi ile boyamadır. Bu boya negatif yüklüdür. Canlı olan hücrenin hücre membranı zarar görmemiş ise hücrelerin içine boya girmez. Canlı olmayan hücreler ise boyayı absorbe eder. Yani canlı hücreler boyanmazken, canlı olmayan hücreler boyanarak mikroskop altında mavi renkli görünür.

Hücre sayımı işlemleri;

* MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri döküldü.

* Hücrelerin flask zemininden ayrılmasını sağlamak için üzerlerine 4 ml Tripsin EDTA eklenerek yaklaşık 10 dakika 37°C inkübatörde bekletildi. Hücrelerin flask zemininden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop ile kontrol edildi.

* Hücreler flask zemininden kalkınca 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine alındı.

* 1000 rpm'de 10 dakikia santrifüj edildikten sonra üst fazda biriken süpernatantları atıldı.

* Dibe çöken hücre pelleti 10 ml RPMI-1640 besiyeri içinde tekrar homojenize edildi.

* Canlı hücre ve ölen hücre ayırımını yapabilmek için, homojenize edilen hücre süspansiyonu ve tripan mavisi 1:1 oranında karıştırıldı.

* Bu karışım hücre sayım cihazının (Invitrogen / Countess, ABD) lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı (hücre sayısı/ml) belirlendi.

3.2.3. Hydroxytyrosol'ün Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Hydroxytyrosol toz halinde Panreac Applichem, Almanya'dan temin edildi. Çözmek için 25 mg Hydroxytyrosol'den alındı ve 1 ml DMSO (dimetilsülfoksit) içinde eritilerek 0.16 M'lık stok solüsyonu elde edildi. Hazırlanan stok solüsyon 50 µl'lik miktarlara pay edilerek +4°C'de saklandı. Her deney adımı için bu 50 µl'lik stoklar kullanıldı.

3.2.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Hydroxytyrosol'ün yumurtalık kanseri hücre kültürlerindeki (MDAH-2774 ve OVCAR-3) sitotoksik etkisini araştırmak için XTT testi (Roche, Almanya) ve tripan mavisiyle boyama yöntemi kullanıldı.

3.2.4.1. XTT Yöntemi

Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deneyler 4 kez tekrar edildi ve her deneyde bir doz için 3'er kuyucuk kullanıldı.

Bu işlem için;

* MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücreleri her bir kuyucukta 100 µl RPMI-1640 besiyeri solüsyonu içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi.

* Her iki hücre hattı Hydroxytyrosol'ün 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µM'lık konsantrasyonları ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildi ve her saat diliminde her doz için 3'er kuyucuk kullanıldı.

* Her zaman dilimindeki sitotoksik etkiyi belirlemek için XTT solüsyonu uygulandı.

* XTT solüsyonu, sodyum 3'-[1-(fenil-aminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil

sülfat'ın (işaretleme ajanı/aktivasyon ajanı) 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı.

* Daha önce 96 kuyucuklu plakaya ekilen ve Hydroxytyrosol'ün artan konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin bulunduğu her bir kuyucuğun üzerine 100 µl XTT solüsyonu eklenerek toplam hacim 200 µl'ye tamamlandı.

* Bu işlemten sonra hücre kültür plakaları 37°C'de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat bekletildi.

* İnkübasyondan sonra her kuyucuğun absorbans değeri mikro plaka okuyucuda (Tecan Reader, Beckman Coulter, ABD), 450-690 nm referans dalga boyu aralığında ölçüldü.

* Sitotoksosite yüzdeleri, absorbans değerleri kullanılarak;

% Sitotoksosite = 1 – [(İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması / Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması) x 100] formülü ile hesaplandı.

* Elde edilen veriler CalcuSyn 2.0 (Biosoft, İngiltere) programına aktarıldı. Hydroxytyrosol'ün doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek hücrelerin %50'sini (IC₅₀) ve %75'ini (IC₇₅) öldüren konsantrasyonları belirlendi.

3.2.4.2. Tripın Mavisi ile Boyama Yöntemi

Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deneyler iki kez tekrar edildi ve her deneyde bir doz için 3'er kuyucuk kullanıldı. Tripın mavisi yöntemiyle hücre canlılığının ölçülmesinde aşağıdaki işlem basamakları uygulandı:

* MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücrelerini içeren flasklardaki besiyerleri döküldü.

* Hücrelerin flask zemininden ayrılmasını sağlamak için üzerlerine 4 ml Tripsin EDTA eklenerek yaklaşık 10 dakika 37°C inkübatörde bekletildi. Hücrelerin flask zemininden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskop ile kontrol edildi.

* Hücreler flask zemininden kalkınca 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine alındı.

* 1000 rpm'de 10 dakikia santrifüj edildikten sonra üst fazda biriken süpernatantları atıldı.

* Dibe çöken hücre pelleti 10 ml RPMI-1640 besiyeri içinde tekrar homojenize edildi.

* MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücreleri her bir kuyucukta 500 µl RPMI-1640 besiyeri solüsyonu içerisinde 50.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekildi.

* Her iki hücre hattı Hydroxytyrosol'ün 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 µM'lık konsantrasyonları ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildi.

* 24, 48, 72 ve 96. saatlerin sonunda kuyucuklardaki besiyeri çekildi ve üzerlerine 300 µM Tripsin EDTA eklenerek yaklaşık 10 dakika inkübatörde bekletildi.

* Hücreler flask zemininden ayrılınca 1:1 oranında besiyeri ile nötralize edildi ve 2 ml'lik mikro santrifüj tüplerine alındı.

* Santrifüj işlemi sonunda tüplerdeki süpernatantlar atılarak dipte kalan hücre pelleti 2 ml besiyeri içerisinde homojenize edildi.

* Oluşan hücre süspansiyonundan 50 µM alınarak 50 µM tripan mavisini ile 1:1 oranında karıştırıldı.

* Bu karışım otomatik hücre sayım cihazının (Invitrogen / Countess, ABD) lamına aktarıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı (hücre sayısı/ml) belirlendi.

* Otomatik sayım cihazı ile paralel olarak Thoma lamı ile ışık mikroskopunda hücre sayımı yapıldı.

* Mililitredeki canlı hücre sayısının belirlenmesi için tüm sayımların ortalamaları hesaplandı.

* Hydroxytyrosol eklenen kuyucuklardaki canlı hücre sayısının ortalaması, HT eklenmeyen kontrol kuyucuklarındaki canlı hücre sayısının ortalamasına oranlandı ve bu oran 100 ile çarpılarak yüzde (%) hücre canlılığı belirlendi.

* Yüzde sitotoksosite değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ sitotoksosite} = 100 - [(\text{ilaç uygulanmış kuyucuklardaki canlı hücre sayısının ortalaması} / \text{pozitif kontrol (ilaç uygulanmayan) kuyucuklardaki canlı hücre sayısının ortalaması}) \times 100]$$

3.2.5. DNA Fragmentasyon Testi (Cell Death Detection ELISA) ile Apoptozisin Belirlenmesi

MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatlarında Hydroxytyrosol'ün artan konsantrasyonlarının (50-400 µM) apoptotik etkisinin belirlenmesi için DNA fragmentasyon testi (Cell Death Detection ELISA Plus Kit) kullanıldı. Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deneyler 2 kez tekrar edildi.

* MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücreleri her bir kuyucukta 100 µl RPMI-1640 besiyeri solüsyonu içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildi.

* Hydroxytyrosol'ün artan konsantrasyonlarıyla (50-400 µM) 96 kuyucuklu plakalara ekilen MDAH-2774 hücreleri 72 saat, OVCAR-3 hücreleri 96 saat muamele edildi.

* Hydroxytyrosol ile muamele edilen ve etken madde eklenmeyen hücrelere test kitinde bulunan lizis solüsyonu uygulanarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

* 30 dakika sonunda meydana gelen hücre lizatları, kitte bulunan streptavidin kaplı mikro plakalara aktarıldı.

* Test protokolünde bulunan bilgilere göre uygulanacak kuyucuk sayısına göre Anti-histon biotin ve Anti-DNA-Peroksidaz antikorlarını içeren reaktif hazırlandı.

* Mikro plakadaki her bir kuyucuğa bu reaktiften 80 µl eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.

* İnkübasyon sırasında oluşan reaksiyon şu şekildedir:

> Anti-histon antikorü nükleozom yapısında bulunan histonlara tutunur, oluşan bu immunokompleks de streptavidin kaplı plakalara tutunur.

> Diğer antikor Anti-DNA-Peroksidaz ise nükleozomlar arasındaki DNA'lara bağlanır.

* İnkübasyon sonunda bağlanmayan bileşenler yıkama basamaklarıyla uzaklaştırıldı.

* İmmunokomplekslere tutunmuş olan peroksidaz, ABTS (2,2'-azino-bis-[3 etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit]) substratı ile 405 nm ve 490 nm referans dalga boyunda mikro plaka okuyucuda (Tecan Reader, Beckman Coulter, ABD) ölçülerek nükleozom miktarlarının kantitatif tayini yapıldı.

* Elde edilen absorbans değerlerine göre apoptozis miktarındaki artış belirlendi. Bu artış mikro plakalardaki hücre lizatlarında meydana gelen histon ve nükleozom miktarındaki artış ile doğru orantılıydı.

* Her bir deneme için apoptotik hücre %'si hesaplanırken pozitif kontrol olarak belirlenen %100 apoptotik hücrelerin absorbans değeri baz alındı. %'lik hücre sayısı ile ilgili veri apoptotik açıdan yorumlanırken HT ilave edilmemiş hücre yüzdesi referans alınarak değerlendirildi.

3.2.6. Apoptosis Antikor Array Yöntemi

Hydroxytyrosol'ün yumurtalık kanseri hücre kültürleri üzerindeki apoptotik etkisini hangi olası moleküller üzerinden gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla apoptosis antikor array [Human Apoptosis Antibody Array (R&D Systems, İngiltere)] yöntemi kullanıldı. Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deney 1 kez yapıldı. Kite bulunan apoptotik proteinler Tablo 3.1'de verilmektedir.

* Hydroxytyrosol'ün IC₅₀ dozlarıyla 72 saat muamele edilen MDAH-2774 hücreleri ve 96 saat muamele edilen OVCAR-3 hücrelerinden lizatları elde edebilmek için kite bulunan lizis solüsyonu kullanıldı.

* Kontrol ve her bir sitokine spesifik olan antikorlar kite bulunan nitroselüloz membranlarda (array) ikişer spot şeklinde tutunmuş halde bulunmaktadır.

* İlk önce bu membranlar blok solüsyonuyla bloke edildi. Daha sonra her hücre hattı için HT eklenmemiş ve HT ile muamele edilmiş örnekler ayrı ayrı membranlara eklendi ve +4°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

* Her array 3 defa 10'ar dakika yıkama solüsyonuyla yıkanarak bağlanmayan proteinler uzaklaştırıldı.

* Array'ler biotinlenmiş antikor kokteyli ve streptavidin-HRP ile inkübe edildi.

* Daha önce yapılan yıkama basamakları tekrarlandı.

* Son olarak array'ler plastik levhaya aktarıldı ve üzerlerine kemilüminesant bileşenleri içeren reaktif karışımı (Chemi Reagent Mix) eklendi.

*Array'ler görüntüleme sistemine (Kodak® Gel Logic 1500) alınarak membranlardaki her bir spota bağlanan protein miktarına göre oluşan sinyaller

ölçüldü. Ölçülen verilerin sayısal analizi Koadarray 2.6 (İngiltere) programı kullanılarak yapıldı.

*Artan veya azalan protein miktarları belirlenirken alt limit olarak 1.2 kat baz alındı.

Tablo 3.1. Apoptozis antikor array kitinin içerdiği apoptotik proteinler

Pro-apoptotik	Anti-apoptotik
Bad	Bcl-2
Bax	Bcl-x
Pro-kaspaz-3	Clusterin
Aktif kaspaz-3	HIF-1 alpha
Katalaz	cIAP-1
Claspin	cIAP-2
HTRA2/Omi	HO-1/HMOX1/HSP32
TRAIL R1/DR4	HO-2/HMOX2
TRAIL R2/DR5	HSP27
Sitokrom-c	HSP60
SMAC/Diablo	HSP70
Fas/TNFRSF6/CD95	PON2
TNF RI/TNFRSF1A	p21/CIP1/CDKN1A
FADD	Survivin
p27/Kip1	Livin
Fosfo-p53 (S15)	XIAP
Fosfo-p53 (S46)	
Fosfo-p53 (S392)	
Fosfo-Rad17 (S635)	

3.2.7. Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik Etkilerinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 Sinyal Yolakları ile Bağlantılı Olup Olmadığının Test Edilmesi

Bir antikanser ajanın sitotoksik etkili olduğu belirlendikten sonra, hangi sinyal yolağı üzerinden bu etkisini gösterdiğini belirleyebilmek için, araştırılan sinyal yolağının spesifik inhibitörleri kullanılarak sinyal yolağının susturulmasıyla sitotoksik etkinin ortadan kalkması ya da azalması gözlenirse o yolak üzerinden etkili olduğu söylenebilir.

3.2.7.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı için Yöntem

Hydroxytyrosol'ün PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden sitotoksik etkisinin var olup olmadığını belirlemek için, MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatları yolağın spesifik inhibitörü LY294002 hidroklorid'in 50 ve 100 μM 'lık dozları ile araştırıldı. LY294002 hidroklorid'in 50 ve 100 μM olarak belirlenen dozları Zhang ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak belirlendi [41]. Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deneyler 2 kez tekrar edildi.

İnkübasyon süresi olarak MDAH-2774 için 72 saat ve OVCAR-3 için 96 saat hücre hatları ile çalışıldı. HT'nin MDAH 2774 için IC_{50} değeri olan 102.3 μM , OVCAR-3 için 51.5 μM 'lık dozları kullanıldı. Her iki hücre hattı için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. MDAH-2774 tek başına 102.3 μM HT ile, OVCAR-3 ise tek başına 51.5 μM HT ile kültüre edildi.

2. Hydroxytyrosol ile muamele edilmemiş, sadece yolağa ilişkin spesifik inhibitörü LY294002 hidroklorid'in 50 ve 100 μM 'lık dozları ile hücre hatları kültüre edildi.

3. MDAH-2774 için 102.3 μM HT ile 50 μM LY294002 hidroklorid'in kombinasyonu, OVCAR-3 için ise 51.5 μM HT ile 50 μM LY294002 hidroklorid'in kombinasyonu uygulandı.

4. MDAH-2774 için 102.3 μ M HT ile 100 μ M LY294002 hidroklorid'in kombinasyonu, OVCAR-3 için ise 51.5 μ M HT ile 100 μ M LY294002 hidroklorid'in kombinasyonu uygulandı.

5. Yukarıdaki her bir işlem basamağı XTT yöntemi ile test edildi.

3.2.7.2. ERK 1/2 Sinyal Yolağı için Yöntem

Hydroxytyrosol'ün ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden sitotoksik etkisinin var olup olmadığını belirlemek için, MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatları yolağın spesifik inhibitörü FR180204'ün 50 ve 100 μ M'lık dozları ile araştırıldı. FR180204'ün 50 ve 100 μ M olarak belirlenen dozları Dirican ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak belirlendi [42]. Her iki hücre hattında Hydroxytyrosol'ün bütün dozları için deneyler 2 kez tekrar edildi.

İnkübasyon süresi olarak MDAH-2774 için 72 saat ve OVCAR-3 için 96 saat hücre hatları ile çalışıldı. HT'nin MDAH 2774 için IC₅₀ değeri olan 102.3 μ M, OVCAR-3 için 51.5 μ M'lık dozları kullanıldı. Her iki hücre hattı için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. MDAH-2774 tek başına 102.3 μ M HT ile, OVCAR-3 ise tek başına 51.5 μ M HT ile kültüre edildi.

2. Hydroxytyrosol ile muamele edilmemiş, sadece yolağa ilişkin spesifik inhibitörü FR180204'ün 50 ve 100 μ M'lık dozları ile hücre hatları kültüre edildi.

3. MDAH-2774 için 102.3 μ M HT ile 50 μ M FR180204'ün kombinasyonu, OVCAR-3 için ise 51.5 μ M HT ile 50 μ M FR180204'ün kombinasyonu uygulandı.

4. MDAH-2774 için 102.3 μ M HT ile 100 μ M FR180204'ün kombinasyonu, OVCAR-3 için ise 51.5 μ M HT ile 100 μ M FR180204'ün kombinasyonu uygulandı.

5. Yukarıdaki her bir işlem basamağı XTT yöntemi ile test edildi.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Hydroxytyrosol'ün 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μ M konsantrasyonlarının her biri XTT ve ELISA uygulamaları için üçer kuyucukta test edildi ve her bir konsantrasyon denemesi üç kez tekrarlandı. Her bir konsantrasyon için üçer kuyucuktaki mikropılaka okuyucudan elde edilen absorbans/floresans değerlerinin ortalaması alındı ve $\pm$ SD değerleri hesaplandı. Artan konsantrasyonların her birine ait hesaplanan değerler pozitif kontrol değerleriyle karşılaştırılarak, sitotoksik ve apoptotik etki yüzdesi açısından anlamlı bir farklılığın olup olmadığı tek yönlü ANOVA ve ardından Dunnett's t-test kullanılarak ortaya konuldu. Elde edilen değerler Graphpad Prism 5.0 istatistik yazılımına aktararak Hydroxytyrosol'ün artan konsantrasyonlarına ait doz ve zamana bağlı cevap eğrileri ve grafikleri çizildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Hydroxytyrosol'ün OVCAR-3 ve MDAH-2774 Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri ile İlgili Bulgular

Hydroxytyrosol'ün insan yumurtalık kanseri hücre kültürlerinde (MDAH-2774 ve OVCAR-3) hücre canlılığı üzerindeki etkileri hem artan doza (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μ M) hem de zamana (24., 48., 72. ve 96. saat) bağlı olarak incelendi ve bulgular Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterildi.

HT'nin her iki hücre kültüründe doz ve zamana bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri, XTT testi sonuçlarına göre ölen hücre yüzdesi ve tripan mavisi boyama yöntemi sonuçlarına göre canlı hücre yüzdesi bulguları MDAH-2774 için Tablo 4.1'de, OVCAR-3 için Tablo 4.2'de belirtilmektedir. Her iki hücre hattı için XTT testinden elde edilen veriler tripan mavisi boyama yöntemi ile uyumludur.

Tablo 4.1. MDAH-2774 (72. saat) hücre kültüründe XTT testi sitotoksikite ve tripan mavisi hücre canlılığı bulguları

HT Dozları (μ M)	MDAH-2774 (72. saat)	
	XTT Testi Sitotoksikite (%)	Tripan Mavisi Hücre Canlılığı (%)
50	0	99.1
100	70.5	27.8
150	66.5	31.2
200	63	36.5
250	60.5	38.9
300	55.5	43.8
350	55	45
400	52	45.7

MDAH-2774 hücrelerinin HT ile 50-400 μ M konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat muamelesi sonucunda anlamlı bir sitotoksik etki saptanmazken ($p>0.05$), 72. saatte 100 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p<0.05$). HT'nin 72. saatte 100 μ M konsantrasyonda %70.5 sitotoksik etki ($p<0.05$)

gösterdiği tespit edildi. 100 μM 'dan yüksek dozlarda ise sitotoksitenin azaldığı görüldü. Hydroxytyrosol'ün 200, 300 ve 400 μM konsantrasyonlardaki sitotoksik etki değerleri sırasıyla %63, %55.5 ve %52 olarak belirlendi. 96.saatte ise hem kontrol hem de HT'nin artan dozları ilave edilmiş hücre hatlarında hücre canlılığı çok düşük seviyede bulundu. Bu verilere göre Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 insan yumurtalık kanseri hücre kültürlerinde 72. saatteki HT'nin artan dozlarının sonuçlarına göre CalcuSyn programında hesaplanan IC_{50} değeri 102,3 μM olarak belirlendi ve Şekil 4.1A'da gösterildi.

Tablo 4.2. OVCAR-3 (96. saat) hücre kültüründe XTT testi sitotoksiste ve tripan mavisi hücre canlılığı bulguları

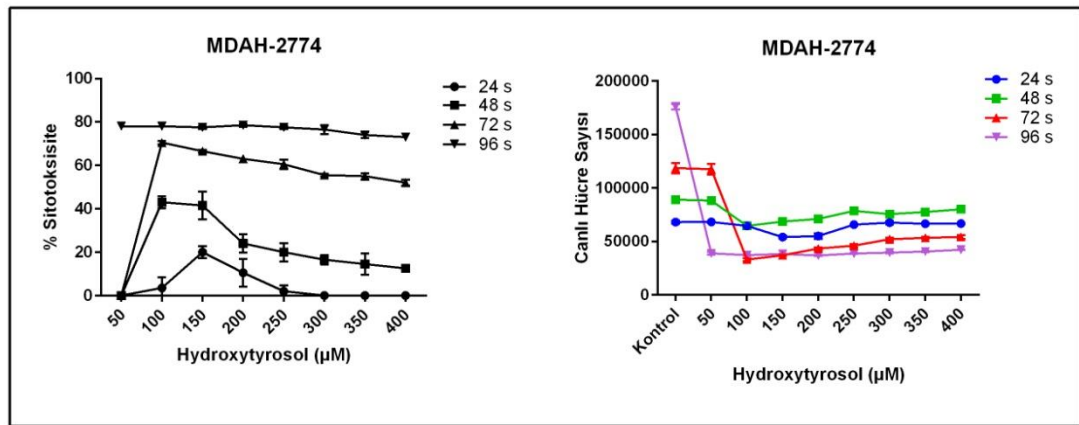
OVCAR-3 (96. saat)		
HT Dozları (μM)	XTT Testi Sitotoksiste (%)	Tripan Mavisi Hücre Canlılığı (%)
50	38	57.6
100	73	25.1
150	70.5	25.1
200	71	25.8
250	70.5	25.2
300	69	24.8
350	71	23.9
400	70.5	23.9

Tripan mavisi ile boyama yöntemi sonuçlarında XTT testi sonuçlarına paralel olarak MDAH-2774 hücre kültürlerinde 24. ve 48. saatlerde hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmazken ($p>0.05$), 72. saatte 100 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma ($p<0.05$) belirlendi ve bulgular şekil 4.1B'de gösterildi. MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatte hücre sayısında 100 μM 'da % 69, 200 μM 'da % 60, 300 μM 'da %51.5, 400 μM 'da % 49.2 azalma tespit edildi. 96. saatte ise hücre canlılığında doza bağlı anlamlı bir azalma görülmedi ($p>0.05$).

OVCAR-3 hücrelerinde ise Hydroxytyrosol 24, 48 ve 72. saatlerde sitotoksik etki göstermezken ($p>0.05$), 96. saatte 50 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki görüldü ($p<0.05$). Hydroxytyrosol'ün 96. saatte 50 μM konsantrasyondaki sitotoksiste değeri %36 iken, 100, 200 ve 400 μM

konsantrasyonlardaki sitotoksik etki sırasıyla %72, %68.5 ve %66.5 olarak hesaplandı. Bu verilere göre OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücre kültürlerinde HT'nin artan dozlarda uygulanmasının sonuçlarına göre CalcuSyn programında hesaplanan 96. saatteki IC₅₀ değeri 51,5 μ M olarak belirlendi ve Şekil 4.2A'da gösterildi.

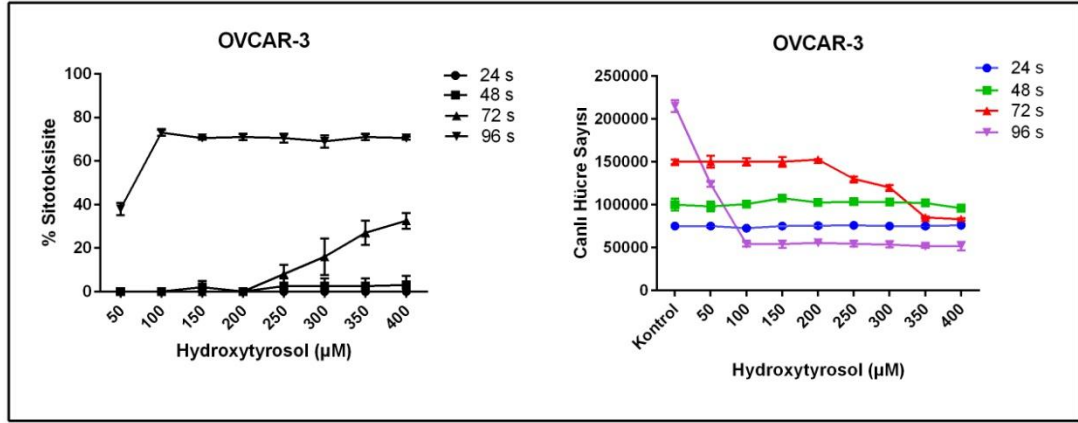
OVCAR-3 hücre kültürlerinde tripan mavisi ile boyama yöntemi sonuçlarında XTT testi sonuçlarına paralel olarak 24., 48. ve 72. saatlerde hücre sayısında anlamlı azalma saptanmazken ($p>0.05$), 96. saatte 50 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda hücre sayısında anlamlı azalma belirlendi ve bulgular şekil 4.2B'de gösterildi ($p<0.05$). OVCAR-3 hücre kültürlerinde 96. saatte hücre sayısında 50 μ M'da % 41, 100 μ M'da % 75, 200 μ M'da %71.1, 400 μ M'da % 67.3 azalma tespit edildi.



A) XTT Testi

B) Tripan mavisi boyama

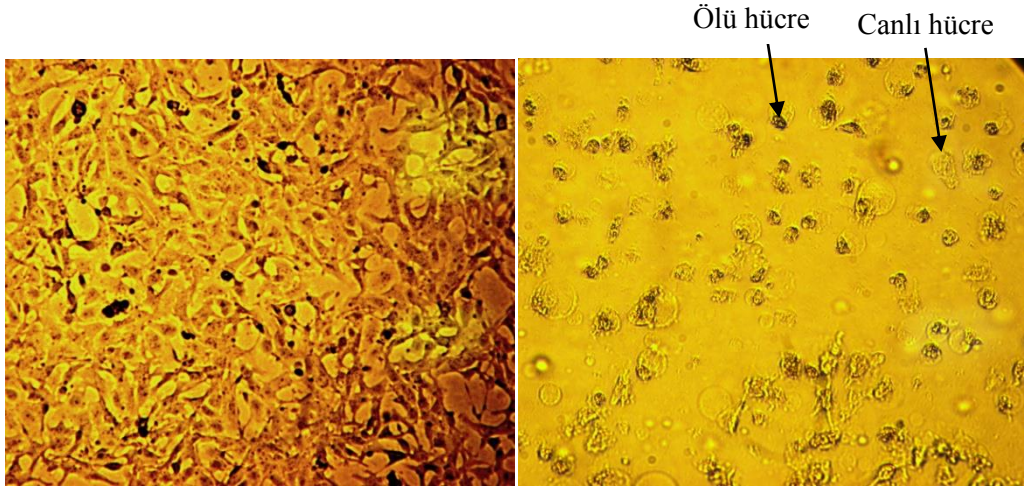
Şekil 4.1: MDAH-2774 hücre kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün farklı dozlarının 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkileri A) XTT sonuçları B) Tripan mavisi ile boyama sonuçları



A) XTT Testi **B) Tripan mavisi boyama**

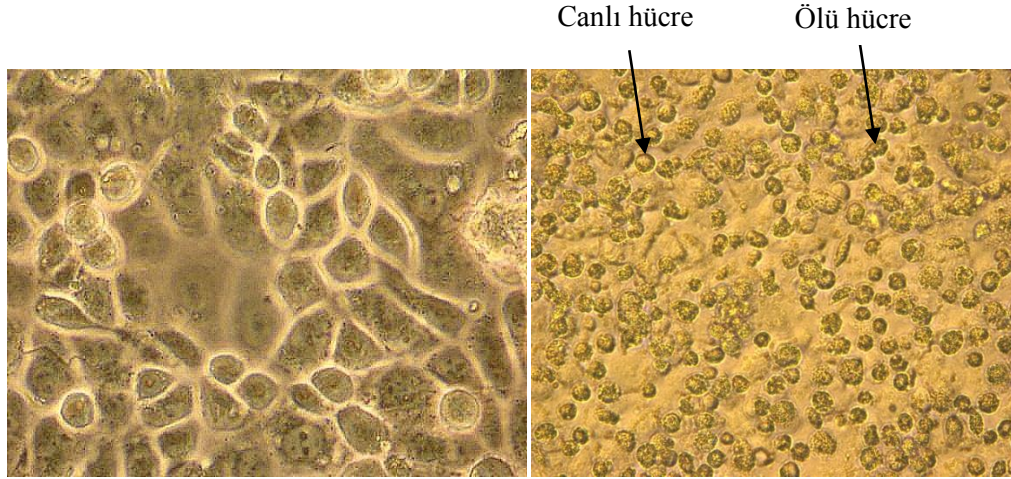
Şekil 4.2: OVCAR-3 hücre kültürlerinde Hydroxytyrosol'ün farklı dozlarının 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkileri A) XTT sonuçları B) Tripan mavisi ile boyama sonuçları

İlaç eklenmeyen ve 100 μ M Hydroxytyrosol eklenen MDAH-2774 hücrelerinin 72. saat (Şekil 4.3), OVCAR-3 hücrelerinin 96. saat (Şekil 4.4) sonunda faz kontrast mikroskopundaki görüntüleri gösterilmiştir. Canlı hücreler şeffaf ve parlak, ölü hücreler ise büzüşük ve koyu renkli görünmektedir.



A) Pozitif kontrol (ilaçsız) **B) 100 μ M Hydroxytyrosol**

Şekil 4.3. MDAH-2774 hücrelerinin ilaçsız (A) ve 100 μ M Hydroxytyrosol ile muamele edilen (B) 72. saat 20X mikroskop görüntüleri



A) Pozitif kontrol (ilaçsız)

B) 100 µM Hydroxytyrosol

Şekil 4.4. OVCAR-3 hücrelerinin ilaçsız (A) ve 100 µM Hydroxytyrosol ile muamele edilen (B) 96. saat 40X mikroskop görüntüleri

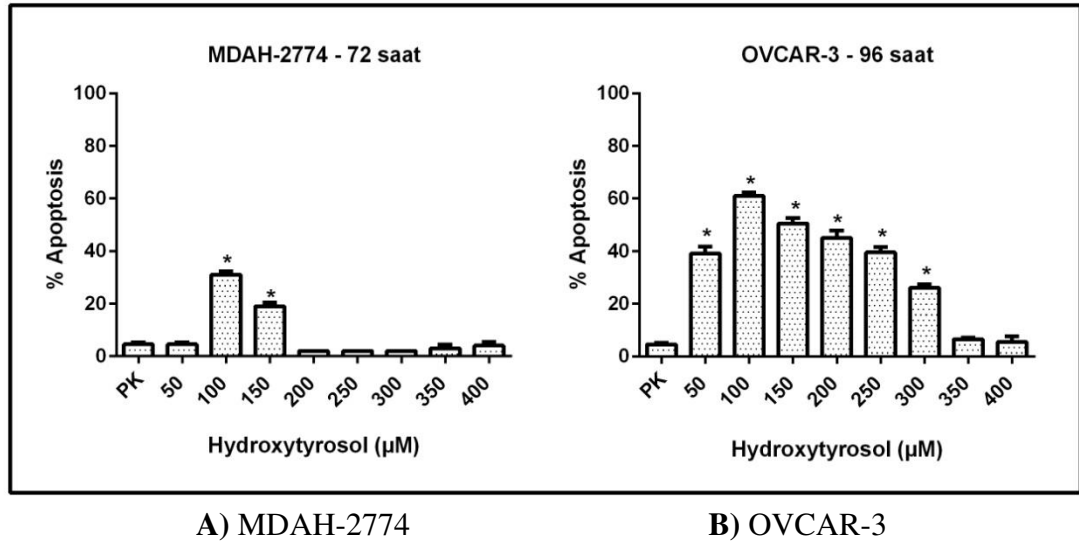
4.1.2. DNA Fragmentasyon Testi Bulguları

Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatteki apoptotik etkisi en yüksek 100 µM konsantrasyonda görülürken, 150 µM'da azaldığı, 200 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise apoptozisin görülmediği tespit edildi (Şekil 4.5A).

Hydroxytyrosol'ün OVCAR-3 hücre kültürlerinde 96. saatte en yüksek apoptotik etkisi 100 µM konsantrasyonda görülürken, apoptozisin 100 µM'dan 300 µM'a kadar azalarak devam ettiği, 350 ve 400 µM konsantrasyonlarda ise apoptotik etkinin olmadığı bulundu (Şekil 4.5B).

4.1.3. Apoptozis Antikor Array Bulguları

Protein antikor array yöntemiyle ölçülen ve istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren apoptotik proteinlerin miktarlarındaki değişim Tablo 4.3 ve 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.5. Hydroxytyrosol'ün MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatteki (A), OVCAR-3 hücre kültürlerinde 96. saatteki (B) apoptotik etki yüzdeleri

MDAH-2774 hücre hattında 72 saat HT'ün $IC_{50} = 102.3\mu M$ dozu ile inkübasyondan sonraki protein antikor array sonuçları Tablo 4.1'de verilmektedir. Pro-apoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif kaspaz-3 ve Htra2/Omi proteinlerinde sırasıyla 2.0, 1.4, 1.2 ve 4.2 kat artış ve ölüm reseptörleri olan TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 ve FAS/TNFRSF6'da sırasıyla 2.1, 1.7 ve 1.6 kat artış bulunmuştur ve bu artışlar istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Aynı hücre hattında apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden Survivin'de 1.6 kat azalma tespit edildi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu veriler Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

OVCAR-3 hücre hattında 96 saat HT'ün $IC_{50} = 51.5\mu M$ dozu ile inkübasyondan sonraki protein antikor array sonuçları Tablo 4.2'de verilmektedir. Anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ve Pro-kaspaz-3'te sırasıyla 3.1 ve 8.2 kat azalış ve AIP ailesinden CIAP-1, CIAP-2, XIAP, Livin ve Survivin'de sırasıyla 6.5, 6.0, 3.2, 2.2 ve 2.7 kat azalış belirlendi ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Pro-apoptotik olan sitokrom-c'de ise 1.2 kat artış tespit edildi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Bu veriler Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Hydroxytyrosol ile muamele edilen MDAH-2774 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren apoptotik proteinler ve değişim oranları.

Proteinin apoptoza etkisi	Proteinin Adı	Değişim Oranı
Pro-apoptotik	Bad	+ 2.0
	Bax	+ 1.4
	Aktif Kaspaz-3	+ 1.2
	Htra2/Omi	+ 4.2
Ölüm reseptörleri	TRAIL R1/DR4	+ 2.1
	TRAIL R2/DR5	+ 1.7
	FAS/TNFRSF6	+ 1.6
Apoptozis inhibitör proteinleri	Survivin	- 1.6

Tablo 4.4. Hydroxytyrosol ile muamele edilen OVCAR-3 hücre kültürlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren proteinler ve değişim oranları.

Proteinin apoptoza etkisi	Proteinin Adı	Değişim Oranı
Anti-apoptotik	Bcl-2	- 3.1
	Pro-kaspaz-3	- 8.2
Apoptozis inhibitör proteinleri	CIAP-1	- 6.5
	CIAP-2	- 6.0
	XIAP	- 3.2
	Livin	- 2.2
	Survivin	- 2.7
Pro-apoptotik	Sitokrom-c	+ 1.2

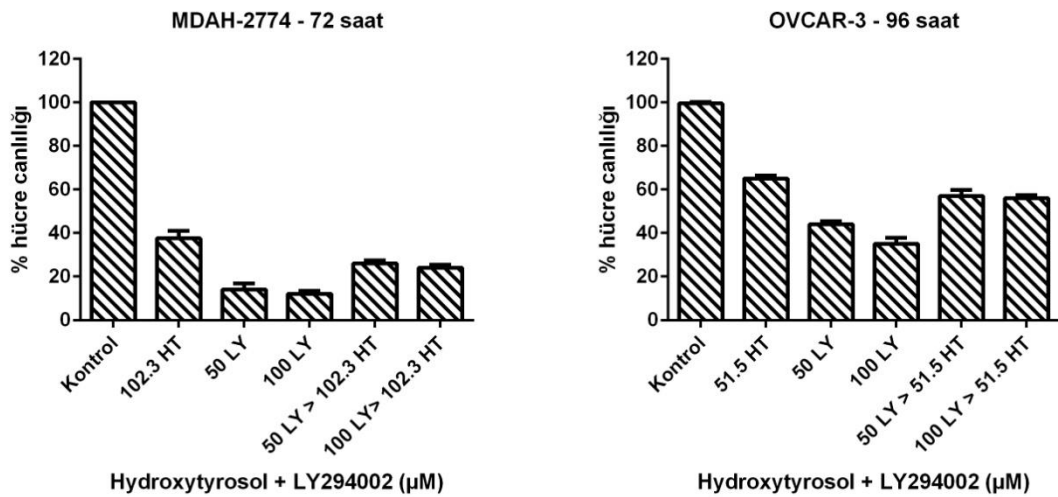
4.1.4. Hydroxytyrosol'ün Sitotoksik Etkilerinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 Sinyal Yolakları ile Bağlantılı Olup Olmadığına İlişkin Bulgular

4.1.4.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı ile İlgili Bulgular

Hydroxytyrosol'ün 102.3 μM konsantrasyonu ile 72 saat inkübe edilmiş MDAH-2774 hücre hattındaki (Şekil 4.6A) ve 51.5 μM konsantrasyonu ile 96 saat inkübe edilmiş OVCAR-3 hücre hattındaki (Şekil 4.6B) PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002 hidroklorid ile ilgili bulgular Şekil 4.6' da gösterildi.

MDAH-2774 hücre hatlarında hücre canlılığı değerleri 72 saat sonunda XTT testi sonuçlarına göre; 102.3 μM HT'de % 37, 50 μM LY294002 hidroklorid'te % 14, 100 μM LY294002 hidroklorid'te % 12, 102.3 μM HT ile 50 μM LY294002 hidroklorid kombinasyonunda % 26, 102.3 μM HT ile 100 μM LY294002 hidroklorid kombinasyonunda % 24 olarak bulundu.

OVCAR-3 hücre hatlarında hücre canlılığı değerleri 96 saat sonunda XTT testi sonuçlarına göre; 51.5 μM HT'de % 65, 50 μM LY294002 hidroklorid'te % 44, 100 μM LY294002 hidroklorid'te % 35, 51.5 μM HT ile 50 μM LY294002 hidroklorid kombinasyonunda % 57, 51.5 μM HT ile 100 μM LY294002 hidroklorid kombinasyonunda % 56 olarak bulundu.



A) MDAH-2774

B) OVCAR-3

Şekil 4.6. MDAH-2774 (72. saat) ve OVCAR-3 (96. saat) hücre hatlarında Hydroxytyrosol ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002 ile ilgili bulgular

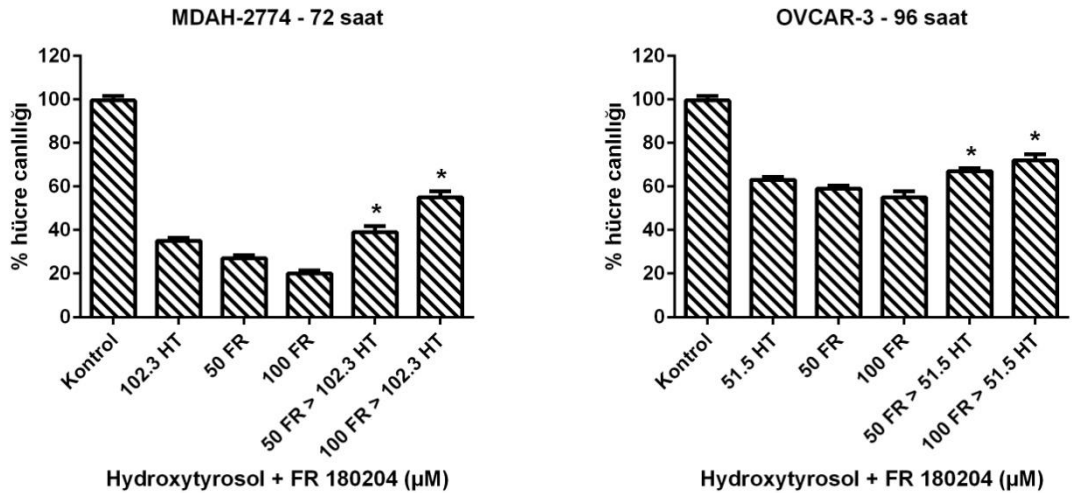
Her iki hücre hattı için HT'nin sitotoksik etkisinin PI3K/Akt yolağı ile bağlantılı olmadığı ile ilgili deneylerden elde edilen bulgular istatistiksel olarak analiz edildiğinde aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

4.1.4.2. ERK 1/2 Sinyal Yolağı ile İlgili Bulgular

Hydroxytyrosol'ün 102.3 μM konsantrasyonu ile 72 saat inkübe edilmiş MDAH-2774 hücre hattındaki (Şekil 4.7A) ve 51.5 μM konsantrasyonu ile 96 saat inkübe edilmiş OVCAR-3 hücre hattındaki (Şekil 4.7B) ERK 1/2 yolağı inhibitörü FR180204 ile ilgili bulgular Şekil 4.7' da gösterildi.

MDAH-2774 hücre hatlarında hücre canlılığı değerleri 72 saat sonunda XTT testi sonuçlarına göre; 102.3 μM HT'de % 35, 50 μM FR180204'te % 27, 100 μM FR180204'te % 20, 102.3 μM HT ile 50 μM FR180204 kombinasyonunda % 39, 102.3 μM HT ile 100 μM FR180204 kombinasyonunda % 55 olarak bulundu.

OVCAR-3 hücre hatlarında hücre canlılığı değerleri 96 saat sonunda XTT testi sonuçlarına göre; 51.5 μM HT'de % 63, 50 μM FR180204'te % 59, 100 μM FR180204'te % 55, 51.5 μM HT ile 50 μM FR180204 kombinasyonunda % 67, 51.5 μM HT ile 100 μM FR180204 kombinasyonunda % 72 olarak bulundu.



A) MDAH-2774

B) OVCAR-3

Şekil 4.7. MDAH-2774 (72. saat) ve OVCAR-3 (96. saat) hücre hatlarında Hydroxytyrosol ve ERK 1/2 yolağı inhibitörü FR180204 ile ilgili bulgular

Her iki hücre hattı için HT'nin sitotoksik etkisinin ERK 1/2 yolağı ile bağlantılı olup olmadığı ile ilgili deneylerden elde edilen bulgular istatistiksel olarak analiz edildiğinde aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur (* $p<0.05$).

4.2. Tartışma

Zeytin meyvesinde, yağında ve yapraklarında bulunan, oleuropein'nin hidrolizi ile açığa çıkan fenolik bir bileşik olan Hydroxytyrosol; antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif ve proapoptotik etkileri ile dikkat çeken, kanser tedavisine yönelik potansiyel bir moleküldür [33]. Hydroxytyrosol'ün meme, kolon, kolorektal, melanom, prostat ve insan promiyelositik lösemi hücre hatlarında sitotoksik, apoptotik etkisi ve bu etkilerinin çeşitli sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [5-10].

Yaptığımız literatür araştırmasında Hydroxytyrosol'ün yumurtalık kanseri tiplerinin herhangi birinde antikanser etkilerinin olup olmadığına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk defa bu tez çalışmasında insan yumurtalık kanseri tiplerinden ileri derecede seröz karsinoma (HGSC) alt sınıfını modelleyen OVCAR-3 ve endometrioid karsinoma (EC) alt sınıfını modelleyen MDAH-2774 hücre hatlarında Hydroxytyrosol'ün sitotoksik, apoptotik etkileri ile sitotoksik etkisinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 yolları üzerinden olup olmadığı araştırılmıştır.

Yumurtalık kanseri erken dönemde herhangi bir belirti göstermemesi ve bu yüzden geç tanı konulabilmesi nedeniyle tüm jinekolojik kanserler arasında en ölümcül olanıdır [26]. Dünyada kansere bağlı ölümler arasında 4. sırada yer almaktadır [2]. Geleneksel tedavi sürecinde ilk basamak olan sitoreduktif cerrahi ardından platin bileşikleri ve taksan ile kombine edilmiş kemoterapi beş yıl hayatta kalım sağlasa da hastalığın tüm aşamaları için toplamda % 40'tan daha az bir tedavi oranına sahiptir [11]. Kanser hücrelerinin tedavide kullanılan kemoterapotik ajanlara direnç geliştirmesi başarılı tedavinin önündeki en büyük engeldir.

Yaptığımız çalışmada HT'nin MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla kullandığımız XTT testi metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı olarak çalışan [30,31] bir yöntemdir. Bu nedenle sitotoksik etkiyi doğrulamak için canlı hücrelerde membran bütünlüğünün tespitine dayalı tripan mavisi ile boyama yöntemi [31] kullanılmış ve bulgular birbirleriyle uyumlu bulunmuştur (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Sitotoksikite ölçümü için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en çok tercih edilenlerden biri

olan MTT testinde işlem basamakları XTT testine göre daha uzundur. MTT’de MTT kesim ürünleri suda çözünmez, tetrazolyumun çözülmesi için DMSO uygulaması gerekir. XTT’de ise kesim ürünleri suda çözünebilir [30]. Bu nedenle ek çözme basamağına ihtiyaç yoktur. Çalışmada XTT testi bu nedenle tercih edilmiştir.

Hydroxytyrosol’ün diğer kanser hücre hatlarındaki sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda dozun μM düzeyde olduğu belirlenmiştir [5-10]. Çalışmamızda HT’nin 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 μM dozlarda **MDAH-2774** hücre hattında 24. ve 48. saatlerde sitotoksik etki göstermediği, 72. saatte sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur. Bu hücre hattı için 96. saatte yapılan deneylerde HT’nin tüm dozları için sabit bir sitotoksikite yüzdesi (% 78) elde edilmiştir (Şekil 4.1). Bunun sebebi besiyerinin 96. saate kadar yetmemiş olabileceği ihtimaline dayandırılmaktadır. **OVCAR-3** hücre hattında ise 24., 48. ve 72. saatlerde anlamlı sitotoksik etkinin olmadığı, 96. saatte anlamlı etkisi olduğu bulunmuştur. Her iki hücre hattı için Hydroxytyrosol’ün artan doza değil zamana bağlı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Notarnicola ve arkadaşları insan kolon kanseri hücre hattı SW620’de Hydroxytyrosol’ün 10-100 μM aralığındaki konsantrasyonlarda 24. saatte anti-proliferatif etki göstermediğini, fakat 72. saatte anti-proliferatif etkili olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada HT-29 hücrelerinde Hydroxytyrosol’ün 24. saatte anti-proliferatif etkisi olmadığı, fakat 72. saatte 100 μM konsantrasyonda anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [9].

50-400 μM doz aralığında IC_{50} değerleri HT’nin en belirgin sitotoksik etkisinin görüldüğü MDAH-2774 için 72. saatte 102,3 μM , OVCAR-3 için 96. saatte 51,5 μM olarak hesaplanmıştır. İki hücre hattında anlamlı sitotoksik etkinin farklı saatlerde görülmesinin, OVCAR-3’ün MDAH-2774’e göre daha dirençli ve agresif yumurtalık kanseri hücre hattı olmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Fabiani ve arkadaşlarının yaptığı RPMI besiyerinin kullanıldığı farklı kanser hücre hatlarında HT’nin anti-proliferatif etkisi araştırılmıştır. Meme, prostat ve kolon kanser tiplerinin her biri için iki ayrı hücre hatları kullanılmış ve farklı IC_{50} değerleri bulunmuştur. Farklı kanser hücre hatlarının kültür ortamında biriken H_2O_2 ’yi uzaklaştırma yeteneklerinin farklı olması, hücrelerin HT’nin anti-proliferatif etkisine

duyarlılığını etkilemektedir [43]. Çalışmamızda iki farklı yumurtalık kanseri hücre hattı kullanılmıştır. HT'nin doz ve zamana bağlı uygulamalarında IC₅₀ değerlerindeki farklılığın besiyeri ortamındaki H₂O₂'yi uzaklaştırma kapasitelerine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Corona ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan kolon kanseri hücre hattı Caco-2'de sulforhodamin B (SRB) yöntemi kullanılarak Hydroxytyrosol'ün 5, 50, 100, 130 ve 162.5 µM konsantrasyonlarda 24., 48., 72. ve 96. saatlerde anlamlı sitotoksosite gösterdiği rapor edilmiştir [7]. Guichard ve arkadaşlarının çalışmasında farklı bir kolon kanseri hücre hattı HT-29'da HT'nin 24. saatteki IC₅₀ değeri flow sitometri ölçümlerine göre yaklaşık 200 µM olarak bulunmuş ve 400 µM konsantrasyonda hücre döngüsünü S ve G2/M fazlarında durdurduğu gösterilmiştir [5]. İnsan promiyelositik lösemi hücreleri HL60 ile yapılan bir çalışmada Hydroxytyrosol'ün 25. saatte 100 µM konsantrasyonda hücre döngüsünü durdurduğu 3H-timidin inkorporasyon testi ile tespit edilmiştir [6]. Çalışmamızda, HT'nin XTT testi sonuçlarına göre IC₅₀ değerleri MDAH-2774 için 72. saatte 102,3 µM, OVCAR-3 için 96. saatte 51,5 µM olarak hesaplanmıştır. Araştırılan molekül ile inkübasyon süresi açısından IC₅₀ değerlerindeki farklılıkların çalışılan model hücre hatlarındaki çeşitlilik ve sitotoksosite ölçümü için tercih edilen yöntemlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında HT'nin **MDAH-2774** hücre kültürlerinde 72. saatte 100 µM'da en yüksek sitotoksosite, bunun üstündeki dozlarda sitotoksitede azalma olduğu bulunmuştur. **OVCAR-3** hücre kültürlerinde ise 96. saatte 100 µM'da en yüksek sitotoksosite, bu dozun üstündeki HT konsantrasyonlarında sitotoksosite değerlerinde değişme olmadığı belirlendi. Corona ve arkadaşları kolon kanseri Caco-2 hücre hattında HT'nin 5, 50, 100, 130, 162,5 µM konsantrasyonları ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonları sonucunda hücre çoğalması inhibisyonunda doza ve zamana bağlı artış olduğunu göstermişlerdir. Ancak HT'nin intestinal metaboliti olan homovanilil alkol (HVA)'ün 5, 50, 100, 150, 200 µM konsantrasyonlarının 48 ve 72. saatlerde çoğalmayı baskılama etkisinin 50 µM'a kadar arttığını, 100 ve 150 µM'da azalarak devam ettiğini göstermişlerdir [7]. Bizim çalışmamızdaki MDAH-2774 hücre kültürlerinde 72. saatte 100 µM'ın üzerindeki dozlarda sitotoksitedeki

azalma, HT'nin belirli bir doz ve zamanın üzerinde parçalanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda, Hydroxytyrosol'ün **MDAH-2774** hücre kültürlerinde 72. saatteki apoptotik etkisi en yüksek 100 μM konsantrasyonda görülürken, 150 μM 'da azaldığı, 200 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise apoptozisin görülmediği tespit edildi. **MDAH-2774** için elde ettiğimiz bu sonuç, Notarnicola ve arkadaşlarının insan kolon kanseri hücre hatlarından HT-29'da 72. saatte 100 μM dozda, SW620 hücre hattında 72. saatte 10 μM 'dan başlayan HT konsantrasyonlarının pro-apoptotik etki gösterdiği belirtilen çalışma [9] ile karşılaştırıldığında doz değil ama zaman açısından uyumlu bulunmuştur. İnsan kolon kanseri (HT-29) hücrelerinde 200 μM konsantrasyonda 24. saatte [5], insan promiyelositik lösemi hücrelerinde yine 100 μM konsantrasyonda 25. saatte [6] ve insan meme kanseri hücre hattı MCF-7'de 50 μM konsantrasyonda 12 saat sonunda [8] HT'nin apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Bu sonuçlarla çalışmamızdan elde ettiğimiz apoptotik etki ile ilgili verilerdeki zaman ve konsantrasyon farklılıkları değişik kanser hücre kültür hatlarıyla çalışılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda HT'nin **OVCAR-3** hücre kültürlerinde ise 96. saatte en yüksek apoptotik etkisi 100 μM konsantrasyonda görülürken, 100 μM 'dan sonra artan dozlarda apoptotik etkinin giderek azaldığı bulunmuştur. XTT testinden elde edilen 50 μM HT dozunda % 38'lik, 100 μM HT konsantrasyonunda % 73'lük sitotoksite değerleriyle apoptozdaki sırasıyla % 39 ve % 61'lik yüzdeler bu konsantrasyonlardaki hücre ölümünün apoptozisle olabileceğini düşündürmektedir. İnsan promiyelositik lösemi hücre hattı HL-60 ile HT uygulamasında 10 ve 25 μM 'lık konsantrasyonlarda apoptotik etki görülmezken, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda 24 saat inkübasyonu sonucunda anlamlı apoptotik etki görülürken, 250 μM 'da apoptoz yüzdesinde azalma olduğu belirtilmiştir. Fabiani ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada 250 μM konsantrasyonda diğer ölüm mekanizmalarından olan nekrozun etkisiyle hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmektedir [44]. Bizim çalışmamızda 100 μM 'dan sonraki artan dozlarda apoptozisteki azalma diğer ölüm mekanizmalarının etkisiyle hücre ölümünün olabileceğini düşündürmektedir.

Della Ragione ve arkadaşlarının çalışmasında 100 μ M HT'nin 24 saat içinde promiyelositik lösemi hücrelerinin (HL-60) %65'inden fazlasında apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. HT aracılı apoptozisin kaspaz 8 aktivasyonu öncesinde mitokondriden erken sitokrom-c salınımı yoluyla gerçekleştiğini belirtmişlerdir [45]. Çalışmamızda apoptozis antikör array yönteminde HT'nin IC₅₀ değeri olan 51.5 μ M ile 96 saat muamelesi sonunda **OVCAR-3** hücre hattında sitokrom-c miktarında 1.2 kat artış bulunmuştur. HT sitokrom-c salınımını indükleyerek apoptozise yol açıyor olabilir.

Yine HL-60 hücre hattı ile yapılan bir başka çalışmada HT'nin apoptotik etkisini, hücre döngüsünü ve apoptozisi düzenleyen önemli proteinlerden CDK6 ekspresyonunu ve CDK inhibitörlerinden p21^{WAF1/Cip1} ve p27^{Kip1}'in ekspresyonlarını azaltarak gösterdiğini bulmuşlardır [6]. **OVCAR-3** hücre hattından elde ettiğimiz apoptozis antikör array sonucuna göre p27^{Kip1} seviyesinde azalma bulduk. HT, p27^{Kip1} ekspresyonunu azaltarak apoptotik etkisini gösteriyor olabilir.

Çalışmamızda Hydroxytyrosol'ün **MDAH-2774** hücre kültürlerinde pro-apoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif kaspaz-3 ve Htra2/Omi proteinleri ile yine pro-apoptotik ölüm reseptörleri olan TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 ve FAS/TNFRSF6 moleküllerinin seviyesinde artışa, apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden Survivin'in miktarında ise azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir.

MDAH-2774 hücre hattından elde ettiğimiz Bad, Bax, aktif kaspaz-3 protein seviyesindeki artış, insan kolon kanseri HT-29 hücre hattında HT'nin pro-apoptotik proteinlerden Bad, Bak ve Bax'ın ekspresyonlarının artışı [5] ve insan melanoma hücrelerinde (M14) HT'nin 600-800 μ M'ın üzerindeki dozlarda kaspaz-3 aktivitesinin artışı [46] sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda Hydroxytyrosol'ün **OVCAR-3** hücre kültürlerinde anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ve Pro-kaspaz-3 ile AIP ailesinden CIAP-1, CIAP-2, XIAP, Livin ve Survivin'in miktarlarında azalmaya, pro-apoptotik olan sitokrom-c miktarında ise artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Bcl-2'nin ekspresyonunun azalması üzerinden HT'nin etkisini gösterdiğinin bulunması insan kolon kanseri HT-29 [5] ve insan kolanjiyokarsinoma hücre hatları (TFK-1 ve KMCB) ile safra kesesi

kanseri hücre hattından (GBC-SD) [10] elde edilen Bcl-2 ekspresyon düzeyindeki azalma bulgusunu desteklemektedir. HT, apoptotik etkisini pro-apoptotik proteinlerin seviyesini artırmanın yanı sıra anti-apoptotik Bcl-2 seviyesini düşürerek gösteriyor olabilir.

Yaptığımız literatür araştırmasında PI3K sinyal iletimindeki anormallikler hem tip 1 hem de tip 2 yumurtalık kanserlerinde tespit edilmiştir [27]. Hydroxytyrosol'ün sitotoksik ve apoptotik etkisini ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden gösteriyor olabileceğine ilişkin farklı kanser hücre hatlarıyla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır [5,7,10]. Çalışmamızda bu nedenlerle tip 1 ve tip 2 yumurtalık kanserini modelleyen sırasıyla OVCAR-3 ve MDAH-2774 hücre hatlarında HT'nin sitotoksik etkisinin PI3K/Akt ve ERK 1/2 yolaklarından üzerinden olup olmadığı araştırılmıştır. Farklı iki yumurtalık kanseri hücre hattında sitotoksikite testlerinden elde ettiğimiz IC₅₀ değerleri dikkate alınarak, yolakların spesifik inhibitörleri ile ilgili deneyler 50 ve 100 µM'lık dozlarda çalışılmıştır.

PI3K/Akt yolağının spesifik inhibitörü olan LY294002 hidroklorid ajanla birlikte kullanıldığında, eğer yolak üzerinden etki söz konusuysa, HT'nin tek başına uygulandığındaki sitotoksik etkisine göre azalma olması beklenir. Ancak çalışmamızda HT ve inhibitörün 50 ve 100 µM'lık dozlarının her birinin tek başına ve kombine edilerek uygulandığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Bu durumda, MDAH-2774 ve OVCAR-3 hücre hatlarında HT'nin sitotoksik etkisini PI3K/Akt yolağı üzerinden göstermediği söylenebilir.

Guichard ve arkadaşları insan kolon karsinoma hücre hattı HT-29'da HT'nin ERK 1/2'nin fosforilasyon durumunu değiştirerek aktivitesini modüle ettiğini bildirmişlerdir [5]. Corona ve arkadaşlarının çalışmasında insan kolon adenokarsinoma hücre hattında (Caco-2) HT'nin (5-162.5 µM) anti-proliferatif etkisini ERK 1/2'nin fosforilasyonunu inhibe ederek ve böylece siklin D1 ekspresyonunda azalmaya sebep olarak gösterdiği belirtilmiştir [7]. Bir başka çalışmada insan meme kanseri hücre hattı MCF-7'de HT'nin estradiol (E2) bağımlı ERK 1/2 aktivasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir [47]. Kolanjiyokarsinoma hücre hatları KMBC ve TFK-1 ile safra kesesi kanseri hücre hattı GBC-SD ile yapılan bir çalışmada ise 75 ve 150 µM HT'nin ERK 1/2 fosforilasyonunu inhibe ettiği

gösterilmiştir [10]. Çalışmamızda MDAH-2774 ve OVCAR-3 yumurtalık kanseri hücre hatlarında ERK 1/2 yolağının spesifik inhibitörü ve HT kombinasyonu uygulandığında, HT'nin tek başına olan sitotoksik etkisine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir. Bu durum ajanın sitotoksik etkisini bu yolak üzerinden gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu yolda rol alan hangi protein üzerinden etkisinin olduğunu ortaya koyacak moleküler biyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hydroxytyrosol'ün sitotoksik, apoptotik etkileri ve sitotoksik etkisinin hücre sinyal yollarından PI3K/Akt ve ERK 1/2 üzerinden olup olmadığı MDAH-2774 ve OVCAR-3 yumurtalık kanser hücre hatlarında ilk kez bu çalışmayla araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre HT'nin;

1- **MDAH-2774** yumurtalık kanser hücre hatlarında 24 ve 48. saatlerde sitotoksik etki göstermediği, 72. saatte 100 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki gösterdiği ($IC_{50}=102.3 \mu$ M),

2- **OVCAR-3** yumurtalık kanser hücre hatlarında 24, 48 ve 72. saatler sitotoksik etki göstermediği, 96. saatte 50 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki gösterdiği ($IC_{50}=51.5 \mu$ M),

3- Sitotoksik etkisinin **MDAH-2774** hücre hattında 100 μ M'dan yüksek dozlarda azalarak devam ettiği, **OVCAR-3** hücre hattında ise 100 μ M'dan yüksek dozlarda sabit olduğu,

4- Apoptotik etkisinin **MDAH-2774** hücre hattında 72. saatte en yüksek 100 μ M konsantrasyonda olduğu, 150 μ M'da azaldığı, 200 μ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda ise apoptozisin görülmediği,

5- Apoptotik etkisinin, **OVCAR-3** hücre hattında 96. saatte 100 μ M konsantrasyonda görülürken, 100 μ M'ın üzerindeki konsantrasyonlarda etkinin azaldığı,

6- **MDAH-2774** hücre kültürlerinde pro-apoptotik moleküllerden Bad, Bax, aktif kaspaz-3, Htra2/Omi ve SMAC/DIABLO proteinleri ile yine pro-apoptotik ölüm reseptörleri olan TRAIL R1/DR4, TRAIL R2/DR5 ve FAS/TNFRSF6 moleküllerinin seviyesinde artışa, apoptozis inhibitör proteinleri (AIP) ailesinden Survivin'in miktarında azalmaya sebep olduğu,

7- **OVCAR-3** hücre kültürlerinde anti-apoptotik moleküllerden Bcl-2 ve Pro-kaspaz-3 ile AIP ailesinden CIAP-1, CIAP-2, XIAP, Livin ve Survivin'in miktarlarında azalmaya, pro-apoptotik olan sitokrom-c miktarında ise artışa sebep olduğu,

8- **MDAH-2774** ve **OVCAR-3** hücre kültürleri üzerinde hücre canlılığı bakımından PI3K/Akt sinyal ileti yolağı üzerinde etkisinin olmadığı,

9- **MDAH-2774** ve **OVCAR-3** hücre kültürleri üzerinde hücre canlılığının azalmasında ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden etkisinin olabileceğı bulunmuştur.

10- Araştırmamızda Hydroxytyrosol'ün sitotoksik etkisini ERK 1/2 sinyal yolağı üzerinden göstermiş olabileceğine ilişkin veriler elde ettik. Ancak ERK 1/2 sinyal yolağındaki hangi molekül üzerinden etkisini gösterdiğine yönelik daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

11- Araştırmamızdan elde ettiğimiz veriler Hydroxytyrosol'ün antikanser etkisini hangi sinyal yolağı üzerinden gösterdiğini açıklayabilecek daha ileri moleküler biyolojik çalışmalara kaynak oluşturabilir.

12- Bu çalışma yumurtalık kanseri ile ilişkili olarak Hydroxytyrosol'ün etkisine yönelik yapılmış ilk *in vitro* çalışmadır. Konuya ilişkin yapılacak *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Parker LP, Taylor DD, Kesterson S, Taylor CG. Gene Expression Profiling in Response to Estradiol and Genistein in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Genomics & Proteomics* 2009, 6, 189-194.
2. Longuespée R, Boyon C, Desmons A, Vinatier D, Leblanc E, Farré I, Wisztorski M, Ly K, D'Anjou F, Day R, Fournier I, Salzet M. Ovarian cancer molecular pathology. *Cancer and Metastasis Reviews* 2012, 31(3-4), 713-732.
3. Gurung A, Hung T, Morin J, Gilks C B. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology* 2013, 62, 59-70.
4. Gao X, Liu Y, Deeb D, Liu P, Liu A, Arbab A S, Gautam S C. ROS Mediate Proapoptotic and Antisurvival Activity of Oleanane Triterpenoid CDDO-Me in Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Research* 2013, 33(1), 215–221.
5. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Marie JC, Braut-Boucher F, Daniel F, Grodet A, Gougerot-Pocidal MA, Chastre E, Kotelevets L, Lizard G, Vandewalle A, Driss F, Ogier-Denis E. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2006 Sep, 27(9), 1812-1827.
6. Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells. *Journal of Nutrition* 2008 Jan, 138(1), 42-48.
7. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi M A, Spencer J P E. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009, 53, 897-903.
8. Han J, Talorete T P N, Yamada P, Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 2009, 59, 45-53.
9. Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid

synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes and Nutrition* 2011 Feb, 6(1), 63-69.

10. Li S, Han Z, Ma Y, Song R, Pei T, Zheng T, Wang J, Xu D, Fang X, Jiang H, Liu L. Hydroxytyrosol inhibits cholangiocarcinoma tumor growth: an in vivo and in vitro study. *Oncology Reports* 2014 Jan, 31(1), 145-152.

11. Romero I and Bast RC. Minireview: Human Ovarian Cancer: Biology, Current Management, and Paths to Personalizing Therapy. *Endocrinology* 2012, 153(4), 1593–1602.

12. Smolle E, Taucher V, Pichler M, Petru E, Lax S, Haybaeck J. Targeting Signaling Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14, 9536-9555.

13. Yaginuma Y and Westphal H. Abnormal Structure and Expression of the p53 Gene in Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 1992, 52, 4196-4199.

14. Press JZ, De Luca A, Boyd N et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic brca1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC Cancer* 2008;8:17.

15. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011 Jun 29, 474(7353), 609-615.

16. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM et al. Arid1a mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England Journal of Medicine* 2010, 363, 1532-1543.

17. Kuo KT, Mao TL, Jones S et al. Frequent activating mutations of pik3ca in ovarian clear cell carcinoma. *American Journal of Pathology* 2009, 174, 1597-1601.

18. Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF. Characterization of a Human Ovarian Carcinoma Cell Line (NIH:OVCAR-3) with Androgen and Estrogen Receptors. *Cancer Research* 1983, 43, 5379-5389.

19. Hamilton TC, Davies P, Griffiths K. Oestrogen receptor-like binding in the surface germinal epithelium of the rat ovary. *Journal of Endocrinology* 1982, 95, 37-385.

20. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-161.aspx?geo_country=tr#characteristics (27.01.2015, 20:57).

21. Dai L, Li C, Shedden KA, Misek DE, Lubman DM. Comparative proteomic study of two closely related ovarian endometrioid adenocarcinoma cell lines using cIEF fractionation and pathway analysis. *Electrophoresis* 2009, 30, 1119–1131.
22. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995, 6, 3–16.
23. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv* 2011, 20, 145.
24. Sümer Turanlıgil NC, Uyanıkgil Y. Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları. *Arşiv* 2010, 19, 180.
25. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004, 35, 34-42.
26. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, Tsang BK. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 2012, 1271, 58-67.
27. Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Ramé C. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *The International Journal of Developmental Biology* 2012, 56, 959-967.
28. http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=MAPK_Family_Pathway (Ref 3, 27.01.2015,21:40).
29. Vesely DL. Cardiac and Renal Hormones Anticancer Effects In Vitro and In Vivo. *Journal of Investigative Medicine* 2009, 57, 22-28.
30. Terzioğlu G, Keskin AÜ, Demirel GY. Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Turkish Journal of Immunology* 2013, 1(3), 74-89.
31. Avcı ÇB, Süslüer Yılmaz S, Şığva Doğan Ö, Söğütlü F, Dünder M, Gündüz C. Rapamisin'in prostat kanseri hücre hatlarındaki etkisi. *Ege Journal of Medicine* 2013, 52(1), 7-14.
32. Bernini R, Merendino N, Romani A, Velotti F. Naturally occurring hydroxytyrosol: synthesis and anticancer potential. *Current Medicinal Chemistry* 2013, 20(5), 655-670.
33. Nan JN, Ververis K, Bollu S, Rodd AL, Swarup O, Karagiannis TC. Biological effects of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: An extra view from genome-wide

transcriptome analysis. Hellenic Journal of Nuclear Medicine 2014 Jan-Apr, 17 Suppl 1, 62-69.

34. Lamy S, Ouanouki A, Béliveau R, Desrosiers RR. Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. Experimental Cell Research 2014, 322(1), 89-98.

35. Granados-Principal S, Quiles J, Ramirez-Tortosa C L, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa M C. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. Nutrition Reviews 2010, 68(4), 191–206.

36. Rafehi H, Ververis K, Karagiannis TC. Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. Journal of Dietary Supplements 2012, 9(2), 96-109.

37. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755#section=Identification>
(27.01.2015, 21:28)

38. Tuğrul B, Oktay LM. Sağlık ve Hastalıkta Hydroxytyrosol'ün Rolü. Türk Onkoloji Dergisi 2014, 29(4), 166-172.

39. Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessi MA, Spencer JP. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. Biochemical and Biophysical Research Communications 2007, 362(3), 606-611.

40. Bouallagui Z, Han J, Isoda H, Sayadi S. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology 2011, 49(1), 179-184.

41. Zhang F, Zhang Z, Kong D, Zhang X, Chen L, Zhu X, Lu Y, Zheng S. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways. Molecular and Cellular Endocrinology 2014, 382, 197-204.

42. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K–AKT pathway. Clinical and Translational Oncology 2015, 17, 145–151.

43. Fabiani R, Sepporta MV, Patrizia R, De Bartolomeo A, Crescimanno M, Morozzi G. Antiproliferative and Pro-apoptotic activities of Hydroxytyrosol on Different Tumour Cells: The Role Extracellular production of Hydrogen Peroxide. European Journal of Nutrition 2012, 51, 455-464

44. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Montedoro GF, Morozzi G. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention* 2002, 11(4), 351-358.
45. Della Ragione F, Cucciola V, Borriello A, Della Pietra V, Pontoni G, Racioppi L, Manna C, Galletti P, Zappia V. Hydroxytyrosol, a Natural Occuring in Olive Oil, Induces Cytochrome c-Dependent Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 278, 733-739.
46. D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galletti P. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2005, 38(7), 908-919.
47. Sirianni R, Chimento A, De Luca A, Casaburi I, Rizza P, Onofrio A, Iacopetta D, Puoci F, Ando S, Maggiolini M, Pezzi V. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK 1/2 activation. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010, 54, 833-840.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Latife Merve OKTAY
Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1987
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : m.latifeoktay@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : İzmir Atatürk Lisesi, 2006
Lisans : Balıkesir Üniversitesi, Biyoloji Eğitimi Bölümü, 2012
Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Programı 2015

Yayınları

Oktay, LM., Tuğrul, B. Investigation of the Effects of Hydroxytyrosol on Cytotoxicity, Apoptosis, PI3K/Akt and ERK 1/2 Pathways in Ovarian Cancer Cell Cultures. 17th International Conference on Molecular Biotechnology and Bioinformatics, 5-6 May, 2015, Rome – Italy.

Tuğrul B, **Oktay LM.** Sağlık ve Hastalıkta Hydroxytyrosol'ün Rolü. Türk Onkoloji Dergisi 2014, 29(4), 166-172.

Kabaca, A., Özgür, S., Kutluer, M., **Oktay, LM.** Development of an Attitude Scale to Assess Using Cartoons in Science Education. 4th World Conference on Educational Sciences, 1-4 February, 2012, Barcelona – Spain.